

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 02/06/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araçatuba
Faculdade de Odontologia



AMANDA CASELATO ANDOLFATTO SOUZA

Ação antimicrobiana e antibiofilme de flavonóis isolados ou incorporados em hidrogéis termossensíveis e sua influência sobre marcadores de mineralização em células odontoblastóides para aplicação em Endodontia

Araçatuba

2022

AMANDA CASELATO ANDOLFATTO SOUZA

Ação antimicrobiana e antibiofilme de flavonóis isolados ou incorporados em hidrogéis termossensíveis e sua influência sobre marcadores de mineralização em células odontoblastóides para aplicação em Endodontia

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para obtenção do título de Doutor em Ciência Odontológica, área de concentração Endodontia.

Orientadora: Prof. Assoc. Cristiane Duque

Araçatuba

2022

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S729a

Souza, Amanda Caselato Andolfatto.

Ação antimicrobiana/antibiofilme de flavonóis isolados ou incorporados em hidrogéis termossensíveis e sua influência sobre marcadores de mineralização em células odontoblastóides para aplicação em endodontia / Amanda Caselato Andolfatto Souza. - Araçatuba, 2022

149 f.: il. ; tab.

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

Orientadora: Profa. Cristiane Duque

1. Flavonóis 2. Anti-infecciosos 3. Biofilmes 4. Hidrogéis
5. Citotoxicidade 6. Odontoblastos I. T.

Black D24
CDD 617.67

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados Curriculares

Amanda Caselato Andolfatto Souza

Nascimento	20.07.1990 – Araçatuba - SP
Filiação	Antônio Roberto Andolfatto de Souza Sirlene de Fátima Caselato Souza
2009/2012	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia da Ribeirão Preto – UNAERP.
2014/2016	Curso de Especialização em Endodontia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia de Araçatuba - FOA
2016/2018	Mestrado em Ciência Odontológica, área de concentração Endodontia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Odontologia – FOA, com bolsa CAPES.
2018/2022	Doutorado em Ciência Odontológica, área de concentração Endodontia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Odontologia – FOA, com bolsa CAPES.
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo. SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

COMISSÃO EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Duque - Orientadora. Professora Associada do Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, Disciplina de Odontopediatria, Faculdade de Odontologia, FOA-UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Prof^ª. Dr^ª. Simone Nataly Busato de Freria – Pesquisadora colaboradora do Departamento de Diagnóstico Oral, Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP-Unicamp, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Prof. Dr. Leopoldo Cosme - Professor Doutor da Disciplina de Endodontia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceió, Brasil.

Prof^ª. Dr^ª. Aimée Maria Guiotti - Professora Doutora do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Disciplina de Materiais Dentários, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, FOA –UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Prof. Dr. Gustavo Sivieri de Araújo - Professor Doutor do Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, FOA – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, meus pais Sirlene e Antônio, meu irmão Vitor Hugo, meus tios Marina e José Roberto, e à minha orientadora Cristiane Duque. Por todo suporte, compreensão, exemplos de vida e carinho que recebi nesses anos de pós-graduação.

Sou muito grata.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, primeiramente, por toda sua grandeza!! Obrigada por me proporcionar a família em que nasci, o ambiente em que vivo e as pessoas da minha vida. Assim tenho a oportunidade de crescer e evoluir. Obrigada pela vida privilegiada. Obrigada por todo discernimento, felicidade, caráter e luz no meu caminho! Sou eternamente grata pela Sua companhia!

Aos meus amados pais, **Sirlene de Fátima Caselato Souza** e **Antônio Roberto Andolfatto de Souza**. Obrigada por tanto amor, carinho, dedicação, educação, respeito e alegria! Por mostrar a importância disso a mim e ao meu irmão! Isto é, com toda certeza, fundamental para formação do nosso caráter. Obrigada por todos os bons exemplos sempre transmitidos a nós, como generosidade, amor ao próximo e humildade. Obrigada por serem a minha base! Me sinto privilegiada diante de tanto amor e acolhimento! E por ter tido uma infância, a melhor fase da minha vida, tão alegre! Obrigada por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos! Obrigada por me incentivarem a seguir meus sonhos e batalhar junto comigo para que eles se tornem realidade. Obrigada por, na maioria das vezes, passarem por cima de suas vontades para que as minhas sejam feitas! Sou eternamente grata por me ensinarem que sem a perseverança não há nada que possamos conseguir e sem ela não chegaremos a lugar algum. Obrigada por serem tão humanos, atenciosos e amorosos comigo! Poderia tentar explicar o amor que sinto por vocês com palavras, mas estas são pequenas perto do meu sentimento! A conquista desse trabalho é nossa. Muito obrigada por tudo! Amo vocês incondicionalmente! Peço desculpas pelas minhas falhas.

Ao meu querido irmão, **Vitor Hugo Caselato Andolfatto Souza**, pela companhia, pela força, pelos momentos felizes, por tantos ensinamentos e pelo seu jeito de ser. Obrigada por ser um dos meus alicerces. Eu te amo incondicionalmente!! Conte comigo para o que você precisar! À minha querida cunhada, **Eduarda Sayeg Corbucci**, pela delicadeza, pela educação e pelas conversas! Obrigada por estar ao lado do meu irmão, fazê-lo feliz e amado. Por ajudá-lo tanto! Amo você!

Aos meus queridos tios, **Marina Aparecida Colaferro** e **José Roberto de Souza Andolfatto**, por me acolherem em sua residência como uma verdadeira filha, por tamanho zelo e proteção desde a época da especialização que se iniciou em 2014, aliás por sempre receber a mim e minha família. Muito obrigada por serem tão atenciosos comigo. O amor que sinto por vocês é imensurável! Contem sempre comigo. Obrigada por não me deixarem cair nos momentos de dificuldade durante esse tempo, quando meus pais estavam em São José do Rio Preto, e por toda ajuda, carinho e união! A conquista desse trabalho é nossa!

Essa homenagem se estende à minha prima **Camila Colaferro**. Obrigada pelas conversas, pelos conselhos e pelos momentos de risadas. Muito obrigada, Mi, por ser esse presente na minha vida! Amo muito vocês!

Às minhas queridas famílias **Caselato** e **Andolfatto**, por apoiarem meus sonhos, mesmo sem entender muito o porquê de algumas coisas, por estarem sempre presentes, por me fazerem rir mesmo em tempos de agonia, por me ensinarem a ver a beleza da vida. Muito obrigada pelas orações, pelo tempo e pelo amor dedicado a mim!! A cada um de vocês o meu muito obrigada! Amo muito vocês!

À minha querida orientadora, **Cristiane Duque**! Professora, sempre admirei o jeito carinhoso com que trata as pessoas, a admiração que tenho por você vai além de simples palavras. Pois a senhora é muito mais que um exemplo profissional, é exemplo de caráter, de humildade, de bondade, de perseverança, de dedicação e de ser humano. Serei eternamente grata a todos os ensinamentos transmitidos a mim. Obrigada pelo cuidado e delicadeza nesses anos de doutorado. Desculpa minhas falhas, sei que posso não ser a pessoa mais fácil de lidar em certos momentos. Muito obrigada por tudo!

Agradeço aos meus queridos companheiros de equipe que se tornaram amigos a quem sou muito grata! **Jesse Augusto Pereira**, obrigada por me ensinar com seu jeito tranquilo, que energia boa a sua. **Rafaela Laruzo Rabelo**, obrigada pelo seu jeito descontraído e amigo. **Karina Sampaio Caiaffa**, obrigada pela sua disposição e pelos ensinamentos, pelas conversas no laboratório, sempre que precisei você esteve ao meu lado. **Vanessa Rodrigues dos Santos**, obrigada por me ensinar calmamente os procedimentos que fizemos juntas e pelo seu senso de humor ímpar. **Gabriela Braga Pacheco**, um agradecimento especial para você, por me ajudar e me acompanhar cuidadosamente nesses últimos meses do doutorado, que foram bem intensos, sem você não teria dado certo, muito obrigada! Obrigada por ser tão prestativa e amorosa. Contem sempre comigo!

Agradeço aos meus amigos do laboratório de odontopediatria, **Letícia Capalbo**, **Heitor Ceolin**, **Igor Zen**, **Francienne Castro**, **Priscila Toniatto**, **Caio Sampaio**, **Gabriel Nunes** e **Leonardo Morais**, por proporcionarem um ambiente harmonioso e leve mesmo com todas as responsabilidades, às vezes tensas, da pós-graduação. Além disso, por toda ajuda que eu precisei. Obrigada por serem tão prestativos e amigos dentro ou fora do ambiente de trabalho! Contem sempre comigo!

Aos meus queridos amigos da época do mestrado, quando ainda frequentava o laboratório de endodontia, **Cristiane Cantiga** e **Pedro Henrique Chaves**, obrigada por serem bons amigos, me darem tanto suporte e compartilhar momentos alegres comigo. Contem sempre comigo!

À minha grande e querida amiga, **Carolina Cardoso de Moraes Barros**, que esteve ao meu lado em todos os momentos da pós-graduação, que se tornou uma irmã. Obrigada pelos conselhos, pelas conversas, pelo acolhimento em horas difíceis, pela amizade e por se fazer tão presente na minha vida! Amo você!

À grande e querida amiga **Carina dos Santos Souza**, pelo seu jeito sossegado e amigo de ser! Muito obrigada por deixar meus dias mais leves, com nossas conversas depois de um longo dia ou durante os nossos treinos funcionais na sua casa ou na academia. Obrigada pelo companheirismo e por ser tão presente!!! Amo você!

À professora **Thayse Hosida e Marcelle Danelon**, pelo aceite para fazer parte da banca examinadora do meu exame geral de qualificação tão prontamente. Tive a oportunidade de conhecê-las dentro do laboratório de odontopediatria quando comecei o mestrado, e desde então as admiro muito pelo trabalho e dedicação de vocês. Obrigada! O agradecimento se estende aos suplentes **Natalia Leal Vizoto e Gustavo Sivieri de Araújo**, obrigada pela disponibilidade e atenção.

À **Profa. Dra. Simone Nataly Busato de Freiria**, pela disponibilidade e aceite ao convite de participar da banca examinadora.

Ao **Prof. Dr. Gustavo Sivieri de Araújo**, obrigada pela disponibilidade e aceite do convite para participar da banca examinadora da defesa da tese do meu doutorado. Tive o prazer de conhecer o senhor durante o meu mestrado, o senhor foi sempre muito solícito, dando dicas nos seminários e encorajando os alunos a buscarem sua melhor versão. Admiro sua trajetória e seu trabalho, professor.

À **Profa. Dra. Aimée Maria Guiotti**, com quem tive o prazer de conviver em algumas disciplinas durante a pós. Obrigada por ter aceito o convite para participar da banca examinadora, professora. Sempre admirei seu trabalho, seu jeito atencioso e dócil foi bem marcante para mim durante as disciplinas, professora.

Ao **Prof. Dr. Leopoldo Cosme**, com quem tive o prazer de conviver por um período no departamento de endodontia da FOA. Aprendi muito com você, obrigada pelos momentos alegres no departamento e por me ajudar com alguns trabalhos. Obrigada por compartilhar essa energia boa que você tem e por ter aceitado o convite da banca examinadora na defesa da tese.

Aos **professores José Antonio Santos Souza, Thiago Cruvinel da Silva e Ana Claudia Okamoto**, pela disponibilidade e aceite do convite para participar da minha banca examinadora de defesa da minha tese de doutorado.

A todos os **professores da Pós-Graduação** pelos ensinamentos transmitidos nas disciplinas da pós-graduação. Vocês contribuíram muito para meu crescimento, agradeço por me ajudarem a chegar até aqui. Foi uma honra ter a oportunidade de conhecê-los. Meus sinceros agradecimentos!

Aos **Funcionários da FOA-UNESP**, por serem acolhedores, por desejarem bom-dia, até amanhã, bom trabalho. Agradeço pelo cafezinho e as bolachinhas no departamento. Pelos momentos de descontração pelas risadas. Por sempre se disporem a nos ajudar, muito obrigada. Aos vigilantes, por cuidar da instituição com tanta responsabilidade. As funcionárias da seção de pós-graduação, **Cris, Lilian e Valéria**, por trabalharem para que toda a burocracia seja executada corretamente, pela paciência de sempre esclarecendo todas as minhas dúvidas e pelos e-mails informando o que era importante.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes – Código de Financiamento 001** – que apoiou a realização do presente trabalho. Agradeço por me concederem recursos fundamentais para minha manutenção na pós-graduação e para a conclusão do doutorado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, processo: #2017/10940-1, pela concessão da bolsa, que permitiu a realização deste estudo. Agradeço pelo auxílio-pesquisa que foi fundamental para o desenvolvimento desta tese.

Epígrafe

“Um dia, quando olhar para trás, os dias de luta serão os mais bonitos”

Sigmund Freud

Resumo Geral

SOUZA, A.C.A. **Ação antimicrobiana/antibiofilme de flavonóis isolados ou incorporados em hidrogéis termossensíveis e sua influência sobre marcadores de mineralização em células odontoblastóides para aplicação em Endodontia.** 2022. 149f. Tese (Doutorado) em Ciência Odontológica - área Endodontia, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

Ainda não foi encontrado um medicamento capaz de desinfetar os canais radiculares e permitir a recuperação celular e a regeneração tecidual em dentes permanentes jovens com comprometimento endodôntico. Dois importantes flavonóis detectados no vinho tinto, morina (MO) e miricetina (MY), são atualmente estudados por suas amplas propriedades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana. No entanto, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada pode ser útil para a liberação desses flavonóis para fins de terapia endodôntica. Este estudo avaliou a citocompatibilidade e os efeitos antimicrobianos/antibiofilme de MO e MY, isolados ou incorporados em hidrogéis termorreversíveis de quitosana-poloxamer- β -glicerofosfato de sódio (CPG), além dos efeitos de MO e MY, isolados e combinados sobre a viabilidade, atividade de ALP e produção de nódulos de mineralização em células MDPC-23. A atividade antimicrobiana dos compostos foi avaliada em *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii* e *Fusobacterium nucleatum* em condições planctônicas, em biofilmes dual-espécies e multiespécies e analisadas por contagem bacteriana e microscopia de varredura. Os hidrogéis CPG foram caracterizados por reometria de fluxo e oscilatória, temperatura de gelificação, perfil de textura e análise de bioadesão em espécimes de dentina. MO, MY e controles (hidróxido de cálcio – CH e clorexidina – CHX) foram incorporados em hidrogéis de CPG e o efeito do antibiofilme sobre biofilmes multiespécies formados em amostras de dentina radicular foi avaliado por microscopia confocal. O efeito de toxicidade dos compostos isolados ou incorporados em hidrogéis de CGP foi determinado em cultura de fibroblastos por ensaios de resazurina. Os dados foram analisados estatisticamente pelos testes ANOVA e Tukey considerando $p < 0,05$. A combinação de MO e MY foi sinérgica ou aditiva contra bactérias endodônticas testadas a partir de concentrações de 0,03 mg/mL MO + 0,06 mg/mL MY e não foram tóxicas para fibroblastos até 0,125mg/mL. MO + MY apresentou melhor efeito sobre biofilmes dual-espécies e multiespécies considerando suas menores concentrações quando comparados com os flavonóis isolados. Os hidrogéis CPG foram caracterizados como termorreversíveis e com propriedades mecânicas e bioadesivas adequadas. Hidrogéis de CPG carregados com MO+MY, CH e CHX apresentaram efeitos inibitórios semelhantes quando aplicados em biofilmes multiespécies formados no interior dos túbulos dentinários radiculares por 48h e seus extratos apresentaram citotoxicidade acima de 50% de diluição. As células semelhantes a odontoblastos (MDPC-23) foram expostas a diferentes concentrações de MO, MY, isoladamente ou em combinação e CH como controle positivo por 24h e 48h,

e troca contínua de meio osteogênico por 8 dias e 14 dias. As combinações de MO+MY ou CH também foram incorporadas em hidrogéis de quitosana-poloxamer- β -glicerofosfato e seus extratos em meio de cultura celular foram coletados após 48h e 7 dias. Viabilidade celular, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e ensaios de deposição de nódulos mineralizados (MN) foram realizados pelo método de resazurina, ensaios de monofosfato de timolftaleína e coloração com vermelho de alizarina, respectivamente. Todos os compostos não causaram citotoxicidade nas concentrações testadas em 24h e 8 dias e 0,5 mg/mL MO e MY isolados reduziram a viabilidade celular em 48h. A atividade de ALP e a deposição de MN foram aumentadas para a combinação MO+MY e CH em células MDPC-23. Extratos de hidrogel de 7 dias contendo ou não MO+MY não foram citotóxicos até diluição de 25% em 48h e em baixas concentrações estimularam a atividade de ALP e deposição de MN aos 8 e 14 dias de avaliação. Em conclusão, a combinação de morina e miricetina incorporada ou não em hidrogéis de CPG apresentou efeito antibiofilme sobre patógenos orais e baixa toxicidade sobre fibroblastos. Morina e miricetina em baixas concentrações, isoladas, em combinação ou em hidrogéis CPG não foram citotóxicas e foram eficazes na indução de marcadores de mineralização em células semelhantes a odontoblastos.

Palavras-chave: flavonóis, atividade antimicrobiana, biofilmes, hidrogel, citotoxicidade, odontoblastos, mineralização dentinária.

General Abstract

SOUZA, A.C.A. **Antimicrobial/antibiofilm action of flavonols alone or incorporated in thermosensitive hydrogels and their influence on mineralization markers in odontoblast-like cells for endodontic applications.** 2022. 149f. Tese (Doutorado) em Ciência Odontológica - área Endodontia, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

A drug capable of disinfecting the root canals and allow cell recovery and tissue regeneration in permanent young teeth with endodontic problems has not been found yet. Two important flavonols detected in red wine, morin (MO) and myricetin (MY), are currently studied for their wide biological properties including antimicrobial activity. However, the development of controlled release systems could be useful for the delivery of these flavonols for endodontic therapies. This study evaluated the cytocompatibility and antimicrobial/antibiofilm effects of MO and MY, alone or incorporated in thermoreversible chitosan-poloxamer hydrogels containing sodium β -glycerophosphate (CPG), in addition to the effects of isolated and combined morin and myricetin flavonols on viability, ALP activity and production of mineralization nodules in MDPC-23 cells. Antimicrobial activity of the compounds was evaluated on *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii*, and *Fusobacterium nucleatum* under planktonic conditions, on dual-species and multispecies biofilms and analyzed by bacterial counts and scanning microscopy. CPG hydrogels were characterized by flow and oscillatory rheometry, gelation temperature, texture profile and bioadhesion analysis in dentin specimens. MO, MY and controls (calcium hydroxide – CH and chlorhexidine – CHX) were incorporated in CPG hydrogels and antibiofilm effect on multispecies biofilms formed in radicular dentin samples were evaluated by confocal microscopy. Cytotoxicity of the compounds alone or incorporated in CGP hydrogels was determined on fibroblasts culture by resazurin assays. Data were statistically analyzed by ANOVA and Tukey considering $p < 0.05$. The combination of MO and MY had synergistic or additive against oral bacteria tested starting at concentrations of 0.03 mg/mL MO + 0.06 mg/mL MY and they were not toxic to fibroblasts up to 0.125mg/mL. MO + MY had better effect on dual-species and multispecies biofilms considering their lower concentrations when compared with the flavonols alone. CPG hydrogels were characterized as thermoreversible and with adequate mechanical and bioadhesive properties. CPG hydrogels loaded with MO+MY, CH and CHX have similar inhibitory effects when applied on multispecies biofilms formed inside root dentin tubules for 48h and their extracts were cytotoxicity above 50% dilution. Furthermore, the effects of morin, myricetin, alone or in combination or incorporated in chitosan-based hydrogels on cytotoxicity and expression of mineralization markers in odontoblast-like cells. The MDPC-23 cells were exposed to different concentrations of morin (MO), myricetin (MY), alone or in combination and calcium hydroxide (CH) as a positive control for 24h and 48h, and continuous osteogenic medium changing for 8 days and 14 days. The combinations of MO+MY or CH were also incorporated in chitosan-poloxamer- β -

glycerophosphate hydrogels and their extracts in cell culture media were collected after 48h and 7 days. Cell viability, alkaline phosphatase (ALP) activity and assays mineralized nodules (MN) deposition were performed using resazurin method, thymolphthalein monophosphate assays and alizarin red staining, respectively. Data were statistically analyzed considering $p < 0.05$. All compounds were non-toxic at the concentrations tested at 24h and 8 days and 0.5 mg/mL MO and MY alone reduced cell viability at 48h. ALP activity and deposition of MN were increased for MO+MY combination and CH in MDPC-23 cells. 7 days hydrogel extracts containing or not MO+MY were not cytotoxic up to 25% dilution at 48h and at low concentrations stimulated ALP activity and MN deposition at 8 and 14 days of evaluation. In conclusion, the combination of morin and myricetin incorporated or not in CPG hydrogels presented antibiofilm effect on oral pathogens and low cytotoxicity on fibroblasts. Morin myricetin at low concentrations, alone, in combination or in CPG hydrogels were not cytotoxic and were effective in inducing mineralization markers in odontoblast-like cells.

Key words: flavonols, antimicrobial activity, biofilms, hydrogel, cytotoxicity, odontoblasts, dentin mineralization.

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figure 1** Effect of the flavonoids morin (MO) and myricetin (MY) alone or in combination (MO + MY) and controls calcium hydroxide (CH) and chlorhexidine (CHX) on the viability of fibroblasts (3T3) after 24h of exposure, using staining with resazurin. Concentrations in mg/mL. **51**
- Figure 2** Effect of flavonoids and controls on dual-species biofilms (48-72h) of oral bacteria after 36h of treatment. Graphics on the left side represent microbial total counts and graphics on the right side represent *E. faecalis* counts. **52**
- Figure 3** Representative scanning electron microscopy images of 14-day multispecies biofilms under 1000x magnification. Biofilms were treated for 48 hours with A: Morin (MO) - 5 mg/mL; B - Myricetin (MY) – 5 mg/mL, C - Morin + Myricetin (MO+MY) – 2,5 mg/mL each one, D - Calcium hydroxide (CH) – 1 mg/mL, E - CHX - 0.5 mg/mL, and F - Control – Bacterial growth without antimicrobial agents. G. Mean (SD) of the bacterial counts detected after 48h of the biofilm treatment with flavonoids and controls. **54**
- Figure 4** Continuous rheological behavior of hydrogels composed of chitosan, poloxamer, and β -glycerophosphate (CPG). Empty symbols indicate an upward curve, and full symbols, a downward curve. **55**
- Figure 5** Frequency sweep profile of storage modulus G' (opened symbols) and loss modulus G'' (closed symbols) of hydrogels composed of chitosan, poloxamer and β -glycerophosphate (CPG). (A) Analyzes performed at 25°C, (B) Analyzes performed at 37 °C. **56**
- Figure 6** Temperature sweep analyses demonstrating of storage modulus G' (blue symbol) and loss modulus G'' (green symbol) and loss tangent (Tan δ) (red symbol) of hydrogels composed of chitosan, poloxamer and β -glycerophosphate (CPG). **57**
- Figure 7** Representative confocal microscopy images of bovine root dentin specimens contaminated for 14 days with multispecies biofilms and treated for 48 hours with the following groups with A: Hydrogel (CPG) with Morin + Myricetin (MO+MY) – 2,5 mg/mL each one, B – CPG **58**

with calcium hydroxide (CH) – 1 mg/mL, C – CPG with CHX - 0.5 mg/mL, D – CPG alone, E - Control – Bacterial growth without antimicrobial agents. F. Mean (SD) of the percentages of dead cells of multispecies biofilms after 48h of treatment with flavonoids and controls. Bacterial counts were obtained by Image J analysis.

Figure 8 Effect of the 48h (A) and 7 days (B) extracts of chitosan-poloxamer hydrogels with glycerophosphate (CPG) containing morin and myricetin in combination (MO+MY) and controls calcium hydroxide (CH) and chlorhexidine (CHX) on the viability of fibroblasts (3T3) after 24h of exposure, using staining with resazurin. Concentrations in mg/mL. **59**

Capítulo 2

Figure 1 Experimental design of the study. A. MDPC-23 treatments with MO, MY, combination of MO+MY and CH. B. MDPC-23 treatments with 48h and 7 days extracts of hydrogels containing MO+MY and CH **78**

Figure 2 Percentage of MDPC-23 viability after 24 and 48h of treatment with morin (MO), myricetin (MY), combinations of MO + MY and calcium hydroxide (CH). **82**

Figure 3 Percentage of MDPC-23 viability at 8 and 14 days of evaluation after 48h treatment with morin (MO), myricetin (MY), combinations of MO + MY and calcium hydroxide (CH). **83**

Figure 4 ALP activity of MDPC-23 cells at 8 days of evaluation after 48h of the treatment with morin (MO), myricetin (MY), combinations of MO + MY and calcium hydroxide (CH). **84**

Figure 5 Mineralized nodules deposition of MDPC-23 cells at 14 days of evaluation after 48h of the treatment with morin (MO), myricetin (MY), combinations of MO + MY and calcium hydroxide (CH). **85**

Figure 6 Percentage of MDPC-23 viability after 48 h treatments with 48h and 7 days hydrogels extracts containing or not morin (MO) + myricetin (MY) or calcium hydroxide (CH). **86**

- Figure 7** Percentage of MDPC-23 viability after 48 h treatments with 48h and 7 days hydrogels extracts containing or not morin (MO) + myricetin (MY) or calcium hydroxide (CH). **87**
- Figure 8** Percentage of MDPC-23 viability at 14 days of evaluation after 48h treatments with 48h and 7 days hydrogels extracts containing or not morin (MO) + myricetin (MY) or calcium hydroxide (CH). **88**
- Figure 9** ALP activity of MDPC-23 cells at 8 days of evaluation after 48h treatments with 48h and 7 days hydrogels extracts containing or not morin (MO) + myricetin (MY) or calcium hydroxide (CH). **89**
- Figure 10** Mineralized nodules deposition by MDPC-23 cells at 14 days of evaluation after 48h treatments with 48h and 7 days hydrogels extracts containing or not morin (MO) + myricetin (MY) or calcium hydroxide (CH). The values are expressed in means/standard deviations. CPG - Qitosan, poloxamer and β -glicerophosphate hydrogels. **90**
- Suppl. 1** **Suppl.1.** Images of alizarin red staining obtained by inverted light microscope, indicating the bioactive effect of flavonols on the MDPC-23 cells relative to mineralized nodules formations. The greatest nodules deposition can be seen in the groups MY, MO+MY and CH, compared to the control (DMEM). **99**
- Suppl. 2** Images of alizarin red staining obtained by inverted light microscope, indicating the bioactive effect of 7 days-CPG hydrogels extracts containing the flavonols and controls on the MDPC-23 cells relative to mineralized nodules formations. All groups (CPG + MOMY, CPG CH and CPG) presented greater nodules deposition when compared to the control (DMEM). **100**

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1	Flavonols and controls used in the present study	41
Table 2	Minimal inhibitory concentration (MIC), minimal bactericidal/fungicidal concentration (MBC) and fractional inhibitory concentration (FIC) in mg/mL for the flavonoids and control chlorhexidine against the oral microorganisms tested	50

Sumário

SUMÁRIO

<i>Introdução Geral</i>	29
<i>Capítulo 1</i>	36
Abstract	38
Introduction	39
Material and Methods	41
Results	50
Discussion	60
Conclusions	63
References	63
<i>Capítulo 2</i>	71
Highlights	72
Abstract	72
Introduction	76
Material and Methods	77
Results	82
Discussion	91
References	95
<i>Conclusão</i>	102
<i>Anexos</i>	103
<i>Anexo A</i>	104
<i>Anexo B</i>	109
<i>Anexo C</i>	110

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

Após a erupção de um dente permanente na cavidade bucal, ainda são necessários por volta de quatro anos para o desenvolvimento completo dos canais e o fechamento dos ápices radiculares. Dessa forma, o tratamento de dentes permanentes jovens que sofreram danos pulpares, por vezes irreversíveis, antes do fechamento fisiológico normal do ápice radicular é um desafio em Endodontia, pois além de eliminar a infecção, o medicamento deve permitir ou até estimular o fechamento do ápice e a estimulação da mineralização do local da lesão periapical (Iglesias-Linares et al., 2013; Andreasen & Kahler, 2015).

Quando ocorre uma infecção endodôntica, as bactérias no canal radicular ficam aderidas às paredes dentinárias formando biofilmes e certos fatores como ambiente anaeróbio, interações entre microrganismos e disponibilidade de nutrientes estabelecem a composição dessa microbiota residente (Ricucci e Siqueira, 2010 a,b; Swimberghe et al., 2019). Devido às irregularidades anatômicas do sistema de canais radiculares, as bactérias podem se proliferar para as ramificações apicais, canais laterais, istmos, túbulos dentinários o que dificulta o desbridamento e a desinfecção durante o tratamento endodôntico (Ricucci e Siqueira, 2010 a,b; Swimberghe et al., 2019). Consequentemente, uma alta frequência e abundância das mesmas espécies de bactérias comumente encontradas em infecções primárias, como estreptococos e actinomyces, foram encontradas em infecções pós-tratamento. Uma das espécies mais prevalentes encontradas nessas condições é *Enterococcus faecalis*, um coco Gram-positivo aeróbio, considerado um patógeno oportunista associado à cavidade oral, trato gastrointestinal e vagina humanos conhecido por sua capacidade de se estabelecer em ambientes hostis com baixos níveis de oxigênio e complexas comunidades microbianas (Lee e Tan, 2014; Alghamdi e Shakir 2020). A capacidade de *E. faecalis* de se proliferar rapidamente e formar biofilme nas paredes do canal radicular e a grande resistência a agentes antimicrobianos, torna esse patógeno um dos mais difíceis de ser eliminado durante o tratamento endodôntico (Estrela et al., 2008; Murad et al. 2012).

A pasta de hidróxido de cálcio é largamente utilizada para o tratamento de dentes permanentes imaturos, seja em situações de pulpíte reversível, em procedimentos de terapia pulpar vital (como capeamento pulpar direto ou pulpotomia) em que se busca a apicigênese ou completa formação da raiz, seja em casos de dentes com pulpíte irreversível/necrose pulpar em que se tradicionalmente realiza-se procedimentos de

apicificação para induzir a formação de barreira apical de tecido duro (Rafter, 2005; AAE, 2022). As desvantagens da apicificação residem nas múltiplas sessões de troca da medicação ao longo de um extenso período, a citotoxicidade do medicamento que impede a proliferação de células remanescentes e a incompleta formação das raízes que consequentemente aumentam o risco de reinfecções e de fraturas dentárias (Rafter et al., 2005; Andreasen et al.; 2002; Khoshkhounejad et al., 2019).

A busca por tratamentos capazes de bioestimular as células remanescentes (fibroblastos, odontoblastos, entre outras) ou induzir a diferenciação de células tronco da polpa dentária (Asgary et al., 2014; Chen et al., 2015; Huang et al., 2008; Yuan et al., 2011), promover uma desinfecção eficaz sem causar citotoxicidade (Bottino et al., 2013; Kim et al., 2008; Park et al., 2008), ou ainda criar um arcabouço capaz de manter a liberação adequada de biomoléculas e também ser suporte para proliferação e diferenciação celular (Bottino et al., 2015) tem sido alvo de diversos estudos no campo da terapia endodôntica regenerativa (RET). Diferentes abordagens da RET estão sendo estudadas como alternativas aos procedimentos de apicificação, comumente realizados em dentes permanentes jovens, pois visam continuar a deposição de tecido duro nas paredes dentinárias e dessa forma, permitir o adequado comprimento e resistência à raiz evitando fraturas (Banchs e Trope, 2004; Pulyodan et al., 2020).

A análise de marcadores de mineralização em células diferenciadas ou indiferenciadas tem sido amplamente realizada com o intuito de analisar a capacidade bioestimulatória de diferentes materiais, visando induzir o processo de reparo ou regeneração (Da Silva et al., 2010; Wang et al., 2017). Dentre esses marcadores de mineralização estão a enzima fosfatase alcalina (ALP) e as proteínas não-colagenosas denominadas de proteína da matriz dentinária (DMP-1) e sialofosfoproteína dentinária (DSPP), que participam da mineralização da dentina e maturação das fibras colágenas durante o processo de dentinogênese. Essas proteínas permanecem no interior do substrato dentinário, sendo liberadas em resposta às injúrias teciduais, para estimular odontoblastos primários a produzirem dentina terciária reacional, ou ainda para estimular a diferenciação de células pulpares em células semelhantes a odontoblastos que irão produzir dentina terciária reparadora (De Souza et al., 2014; Douglas et al., 2014).

Compostos bioativos derivados de plantas como os flavonoides, têm recebido destaque na literatura devido à sua amplitude terapêutica. Flavonoides constituem as classes mais importantes de polifenóis, com mais de 5.000 compostos já descritos na literatura (Shi et al., 2006; Ponce-Vargas et al., 2013). Estão presentes em pequenas

quantidades em frutas e vegetais, geralmente como metabólitos secundários e apresentam papel importante para defesa das plantas contra agentes externos. Estudos tem apontado diversas propriedades farmacológicas dos polifenóis, como ação antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, osteogênica e anti-osteoclastogênica (Rafter et al., 2005; Shi et al., 2006; Domitrovic et al., 2011; Ponce-Vargas et al., 2013). Eles apresentam uma estrutura comum (flavona), sendo constituídos por um núcleo 2-phenyl-1,4-benzopyrone consistindo de dois anéis benzênicos ou aromáticos (A e B) unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado de anel C. De acordo com as variações no anel C, os flavonoides são divididos nas seguintes classes: flavonas, flavonóis, flavanonas (3-hidroxi-flavona), flavanonol (2,3-dihydroflavonol), flavonóis (ou catequinas), antocianidinas e chalconas.

Dois importantes flavonóis detectados no vinho tinto, a morina e a miricetina, têm sido estudado atualmente por sua biodisponibilidade e propriedades biológicas (Fang et al., 2007). A morina (3,5,7,2',4'-pentahydroxiflavona) é um flavonol encontrado em *Morus alba* L (amoreira branca), vinho tinto, amêndoa (*Prunus dulcis*, família *Rosaceae*), castanha (*Castanea sativa*), *Acridocarpus orientalis*, e outras frutas (Gopal, 2013). A miricetina (3,5,7-Trihidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil)-4-cromenona) é um flavonol presente em muitos vegetais, bagas e frutas, chás e vinho tinto, principalmente na forma de glicosídeos, ao invés de agliconas livres (Song et al., 2021). Estudos demonstraram o potencial *in vitro* da morina e seus complexos na diferenciação de osteoblastos e no aumento dos níveis de marcadores gênicos osteogênicos (Vimalraja et al., 2019), bem como a prevenção *in vivo* de defeitos ósseos (Wan et al., 2020). A miricetina também estimula a diferenciação osteoblástica de células mesenquimais da medula óssea com aumento na atividade de ALP, na deposição de colágeno e mineralização óssea (Hsu et al., 2007) e também aumentou a proliferação e expressão de DMP-1 em células odontoblastóides (Baldion et al., 2021).

Polímeros naturais ou sintéticos e materiais inorgânicos têm sido utilizados para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada para engenharia endodôntica (Rahmanian-Devin et al., 2021). Esses carreadores poliméricos podem ser utilizados em diferentes formas: scaffolds, hidrogéis e nanopartículas ou combinações dessas formas (Yao et al., 2016; Tentor et al., 2017; Serna et al., 2021). Os hidrogéis são um tipo de polímero poroso tridimensional com alta flexibilidade, baixa toxicidade, adequada biocompatibilidade e biodegradabilidade e podem ser usados como *scaffolds* ou sistemas injetáveis de liberação de moléculas (Dhivya et al 2015; Rahmanian-Devin et al., 2021).

Um dos polímeros naturais mais utilizados é a quitosana, uma mistura de d-glucosamina ligada a β -1,4 N-acetilglucosamina, adquirida pela desacetilação da quitina. A quitosana tem sido aplicada em curativos de lesões, implantes ósseos e sistemas de carreamento de moléculas (Ito & Hidaka, 1997; Felt et al., 1998; Jarry et al., 2001). Possui amplo espectro de aplicação e atividade biológica, como biocompatibilidade, biodegradação a bioprodutos não tóxicos, atividade de reparo tecidual, funcionalidade e propriedades antimicrobianas (Peers et al., 2021).

A quitosana é um dos polímeros mais naturais usados para o desenvolvimento de sistemas de liberação lenta de fármacos. Outro polímero, o poloxamer 407 (mistura de óxido de etileno e óxido de propileno), também foi adicionado ao hidrogel à base de quitosana, para promover propriedades termorreversíveis e otimizar a formulação do medicamento (Dumortier et al., 2006; Giuliano et al., 2018). Outras vantagens desse copolímero são a baixa toxicidade, biocompatibilidade, facilidade de preparação de gel, boa compatibilidade com uma ampla gama de biomoléculas, incluindo flavonóides, aumentando sua solubilização e prolongando seu perfil de liberação para muitos tipos de aplicações (Dumortier et al., 2006; Giuliano et al., 2018; Yu et al., 2018).

Hidrogéis à base de quitosana contendo flavonóides foram desenvolvidos como curativos no tratamento de feridas (Soares et al., 2020), como hidrogéis injetáveis para atividade antibacteriana e regeneração óssea (Lišková et al., 2015; Arpornmaeklong et al., 2021) e outras aplicações médicas e são considerados uma fonte sustentada para liberação desses compostos. Esta combinação de flavonóis foi incorporada em hidrogéis de quitosana-poloxamer 407-beta-glicerofosfato e foi avaliada sua citocompatibilidade e efeitos antibiofilme em canais radiculares. Este estudo avaliou os efeitos da morina, miricetina, isoladamente ou em combinação ou incorporada em hidrogéis à base de quitosana na citotoxicidade e expressão de marcadores de mineralização em células semelhantes a odontoblastos

Conclusão Geral

CONCLUSÃO GERAL

1. A combinação dos flavonóis apresenta efeito antimicrobiano/antibiofilme sobre patógenos orais e baixa citotoxicidade. Esta foi incorporada com sucesso em hidrogéis de poloxamer 407-quitosana contendo beta-glicerofosfato, caracterizado como termorreversível e com propriedades mecânicas e bioadesivas adequadas, e reduziu biofilmes multiespécies formados em túbulos dentinários, bem como, afetou minimamente a viabilidade dos fibroblastos.

2. A combinação de morina e miricetina em baixas concentrações, isoladamente ou em hidrogéis à base de quitosana, não apresentou citotoxicidade e foi eficaz na indução de marcadores de mineralização em células semelhantes a odontoblastos.

Anexos

Anexo A

REFERÊNCIAS - INTRODUÇÃO GERAL

1. AAE Position Statement on Vital Pulp Therapy. *J Endod.* 2021 Sep;47(9):1340-1344. doi: 10.1016/j.joen.2021.07.015. Epub 2021 Aug 3. PMID: 34352305.
2. Alghamdi F, Shakir M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus.* 2020; 13; 12:e7257. doi: 10.7759/cureus.7257.
3. Andreasen FM, Kahler B. Pulpal response after acute dental injury in the permanent dentition: clinical implications-a review. *J Endod.* 2015; 41:299-308. doi: 10.1016/j.joen.2014.11.015.
4. Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol.* 2002; 18:134-7. doi: 10.1034/j.1600-9657.2002.00097.x.
5. Arpornmaeklong P, Sareethammanuwat M, Apinyauppatham K, Boonyuen S. Characteristics and biologic effects of thermosensitive quercetin-chitosan/collagen hydrogel on human periodontal ligament stem cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2021; 109:1656-1670. doi: 10.1002/jbm.b.34823.
6. Asgary S, Nazarian H, Khojasteh A, Shokouhinejad N. Gene expression and cytokine release during odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by 2 endodontic biomaterials. *J Endod.* 2014; 40: 387-92.
7. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod.* 2004; 30:196-200.
8. Baldion PA, Cortes CC, Castellanos JE, Betancourt DE. Effect of myricetin on odontoblast-like cells and its potential to preserve resin-dentin Bonds. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2021; 117:104392. doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104392.
9. Bottino MC, Kamocki K, Yassen GH, Platt JA, Vail MM, Ehrlich Y, Spolnik KJ, Gregory RL. Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *J Dent Res.* 2013; 92: 963-9.
10. Bottino MC, Yassen GH, Platt JA, Labban N, Windsor LJ, Spolnik KJ, Bressiani AH. A novel three-dimensional scaffold for regenerative endodontics: materials and biological characterizations. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015; 9: E116-23

11. Chen YJ, Zhao YH, Zhao YJ, Liu NX, Lv X, Li Q, Chen FM, Zhang M. Potential dental pulp revascularization and odonto-/osteogenic capacity of a novel transplant combined with dental pulp stem cells and platelet-rich fibrin. *Cell Tissue Res.* 2015; 361: 439-55.
12. Da Silva LA, Nelson-Filho P, da Silva RA, Flores DS, Heilborn C, Johnson JD, Cohenca N. Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibioticintra canal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109:779-87.
13. De Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dental Materials.* 2014 30:769-784.
14. Dhivya S, Saravanan S, Sastry TP, et al. Nanohydroxyapatite-reinforced chitosan composite hydrogel for bone tissue repair in vitro and in vivo. *J Nanobiotechnol.* 2015; 13: 40.
15. Domitrovic R. The molecular basis for the pharmacological activity of anthocyanins. *Curr Med Chem.* 2011; 18: 4454-69.
16. Douglas TEL, Pilarek M, Kalaszczynska I, Senderek I, Skwarczynska A, Cuijpers VMJI. Enrichment of chitosan hydrogels with per fluorodecalin promotes gelation and stem cell vitality. *Mater Lett.* 2014; 128:79-84.
17. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res.* 2006; 23:2709-28. doi: 10.1007/s11095-006-9104-4.
18. Estrela C, Silva JÁ, de Alencar AH, Leles CR, Decurcio DA. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexine against *Enterococcus faecalis*: a systematic review. *J Appl Sci.* 2008; 16:364-368. doi:10.1590/s1678-775772008000600002
19. Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm.* 1998;24:979–993.
20. Giuliano E, Paolino D, Fresta M, Cosco D. Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels: An Overview. *Pharmaceutics.* 2018; 10:159. doi: 10.3390/pharmaceutics10030159.
21. Gopal JV. Morin hydrate: botanical origin, pharmacological activity and its applications. *Pharmacog J.* 2013; 5:123–126.

22. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008; 34: 645-51.
23. Iglesias-Linares A, Yáñez-Vico RM, Sánchez-Borrego E, Moreno-Fernández AM, Solano-Reina E, Mendoza-Mendoza A. Stem cells in current paediatric dentistry practice. *Arch Oral Biol.* 2013; 58:227-38. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.11.008
24. Ito M, Hidaka Y. A chitosan-bonded hydroxyapatite bone filling material. In: Muzzarelli RAA, Peter MG, editors. *Chitin handbook. Grottammare: European Chitin Society.* 1997; 373–382.
25. Jarry C, Chaput C, Chenite A, Renaud MA, Buschmann M, Leroux JC. Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels. *J Biomed Mater Res.* 2001; 58:127-35. doi: 10.1002/1097-4636(2001)58:1<127::aid-jbm190>3.0.co;2-g.
26. Khoshkhounejad M, Sobhi Afshar M, Jabalameli F, Emaneini M, Sharifian M. Cytotoxicity Evaluation of Minimum Antibacterial Values of Different Medicaments Used in Endodontic Regenerative Procedures. *Eur J Dent.* 2019; 13:514-520. doi: 10.1055/s-0039-3401369.
27. Kim IY, Seo SJ, Moon HS, et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv.* 2008; 26:1-21.
28. Lee P, Tan KS, Effects of Epigallocatechin gallate against *Enterococcus faecalis* biofilm and virulence. *Arch Oral Biol.* 2014; doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.11.014
29. Lišková J, Douglas TE, Beranová J, Skwarczyńska A, Božič M, Samal SK, Modrzejewska Z, Gorgieva S, Kokol V, Bačáková L. Chitosan hydrogels enriched with polyphenols: Antibacterial activity, cell adhesion and growth and mineralization. *Carbohydr Polym.* 2015; 129:135-42. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.04.043.
30. Murad CF, Sassone LM, Souza MC, Fidel RAS, Fidel SR, Junior RH. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite, chlorxidine and MTAD[®] against *Enterococcus faecalis* biofilm on human dentine matrix in vitro. *Rev Bras Odontol.* 2012, 9:143-150.
31. Park HH, Lee S, Son HY, Park SB, Kim MS, Choi EJ, Singh TS, Ha JH, Lee MG, Kim JE, Hyun MC, Kwon TK, Kim YH, Kim SH. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch Pharm Res.* 2008; 31:1303-11.

32. Peers S, Montembault A, Ladavière C. Chitosan hydrogels for sustained drug delivery. *J Control Release*. 2020; 326:150-163. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.06.012
33. Ponce-Vargas, SM, Cortez-Lemus, NA, and Licea-Claver.e, A. Preparation of Poly(NVinylcaprolactam) (NVCL) and Statistical Copolymers of NVCL with Variable Cloud Point Temperature by Using A Trithiocarbonate RAFT Agent. *Macromol Symp*. 2013; 56:325-326.
34. Pulyodan MK, Paramel Mohan S, Valsan D, Divakar N, Moyin S, Thayyil S. Regenerative Endodontics: A Paradigm Shift in Clinical Endodontics. *J Pharm Bioallied Sci*. 2020; 12(Suppl 1):S20-S26. doi: 10.4103/jpbs.JPBS_112_20
35. Rafter M. Apexification: a review. *Dent Traumatol*. 2005; 21:1-8.
36. Rahmanian-Devin P, Baradaran Rahimi V, Askari VR. Thermosensitive Chitosan- β -Glycerophosphate Hydrogels as Targeted Drug Delivery Systems: An Overview on Preparation and Their Applications. *Adv Pharmacol Pharm Sci*. 2021; 2021:6640893. doi: 10.1155/2021/6640893.
37. Ricucci, D, Siqueira JF Jr, Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod*. 2010; 36 1277-88. doi: 10.1016/j.joen.2010.04.007.
38. Serna JA, Rueda-Gensini L, Céspedes-Valenzuela DN, Cifuentes J, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. Recent Advances on Stimuli-Responsive Hydrogels Based on Tissue-Derived ECMs and Their Components: Towards Improving Functionality for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery. *Polymers (Basel)*. 2021 25;13:3263. doi: 10.3390/polym13193263.
39. Shi Z, Neoh KG, Kang ET, et al. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials*. 2006 27:2440–9.
40. Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *Int Endod J*. 2019; 52:604-628. doi: 10.1111/iej.13050
41. Soares RDF, Campos MGN, Ribeiro GP, Salles BCC, Cardoso NS, Ribeiro JR, Souza RM, Leme KC, Soares CB, de Oliveira CM, Elston LB, da Fonseca CCP, Ferreira EB, Rodrigues MR, Duarte SMS, Paula FBA. Development of a chitosan hydrogel containing flavonoids extracted from *Passiflora edulis* leaves and the evaluation of its antioxidant and wound healing properties for the treatment of skin lesions in diabetic mice. *J Biomed Mater Res A*. 2020; 108:654-662. doi: 10.1002/jbm.a.36845

42. Song X, Tan L, Wang M, Ren C, Guo C, Yang B, Ren Y, Cao Z, Li Y, Pei J. Myricetin: A review of the most recent research. *Biomed Pharmacother.* 2021; 134:111017. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111017.
43. Tentor FR, de Oliveira JH, Scariot DB, Lazarin-Bidóia D, Bonafé EG, Nakamura CV, Venter SAS, Monteiro JP, Muniz EC, Martins AF. Scaffolds based on chitosan/pectin thermosensitive hydrogels containing gold nanoparticles. *Int J Biol Macromol.* 2017; 102:1186-1194. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.106.
44. Vimalraja S, Rajalakshmi S, Saravanan S, Deepak T, Murugand K, Rajkumare AV, Dhanasekaran A. Zinc chelated morin promotes osteoblast differentiation over its uncomplexed counterpart. *Proc Bioch.* 2019; 82:167-172.
45. Wan J, Ma T, Jin Y, Qiu S. The effects of morin on bone regeneration to accelerate healing in bone defects in mice. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2020; 34:2058738420962909. doi: 10.1177/2058738420962909.
46. Wang YJ, Zhang HQ, Han HL, Zou YY, Gao QL, Yang GT. Taxifolin enhances osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells partially via NF- κ B pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 490: 36-43.
47. Yao Y, Xia M, Wang H, Li G, Shen H, Ji G, Meng Q, Xie Y. Preparation and evaluation of chitosan-based nanogels/gels for oral delivery of myricetin. *Eur J Pharm Sci.* 2016;25;91:144-53. doi: 10.1016/j.ejps.2016.06.014.
48. Yuan Z, Nie H, Wang S, et al. Biomaterial selection for tooth regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2011;17:373–88.
49. Yu Y, Feng R, Yu S, Li J, Wang Y, Song Y, Yang X, Pan W, Li S. Nanostructured lipid carrier-based pH and temperature dual-responsive hydrogel composed of carboxymethyl chitosan and poloxamer for drug delivery. *Int J Biol Macromol.* 2018; 15;114:462-469. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.117.