

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/07/2024.



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



GABRIELA PACHECO DE ALMEIDA BRAGA

**Propriedades microbiológicas e indutoras
de mineralização de flavonoides isolados ou
carreados em hidrogéis termorreversíveis
para aplicação como medicação
endodôntica**

Araçatuba

2022

GABRIELA PACHECO DE ALMEIDA BRAGA

**Propriedades microbiológicas e indutoras
de mineralização de flavonoides isolados ou
carreados em hidrogéis termorreversíveis
para aplicação como medicação
endodôntica**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba,
para obtenção de título de Mestre em Ciência
Odontológica - Área de Concentração:
Endodontia.

Orientadora: Profa. Assoc. Cristiane Duque

Araçatuba

2022

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

B813p	Braga, Gabriela Pacheco de Almeida. Propriedades microbiológicas e indutoras de mineralização de flavonoides isolados ou carregados em hidrogéis termorreversíveis para aplicação como medicação endodôntica / Gabriela Pacheco de Almeida Braga. - Araçatuba, 2022 106 f. : il. ; tab. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientadora: Profa. Cristiane Duque 1. Flavonoides 2. Anti-infecciosos 3. Biofilmes 4. Células Cultivadas; 5. Hidrogel; 6. Fosfatase Alcalina I. Título Black D24 CDD 617.67
-------	--

Dados Curriculares

Gabriela Pacheco de Almeida Braga

Nascimento	05.11.1996 – Goiânia – GO
Filiação	Marcos Pedro da Silva Braga Adriana Pacheco de Almeida Braga
2015 -2019	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, FOA/UNESP.
2018 - 2019	Desenvolvimento de Projeto de Iniciação Científica, com bolsa PIBIC-CNPq.
2020 -2022	Desenvolvimento de Projeto de Mestrado com auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo. SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

COMISSÃO EXAMINADORA

Defesa de Dissertação

Profa. Dra. Cristiane Duque – Orientadora, Professora Associada do Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, Disciplina de Odontopediatria, Faculdade de Odontologia - Araçatuba, UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Profa. Dra. Anuradha Prakki - Professora Associada do Departamento de Dentística Restauradora, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade de Toronto, Canadá.

Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto – Professor associado do Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, Disciplina de Endodontia, Faculdade de Odontologia - Araçatuba, UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, por nunca me desamparar e traçar os planos da minha vida.. Aos meus pais *Marcos e Adriana*, que são meu porto seguro, obrigada por sempre batalharem e nunca medirem esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos, à minha irmã *Joanna*, por todo companheirismo, amizade, por ser alguém que eu sei que sempre posso contar. Ao *Ricardo*, por me acompanhar em toda minha trajetória da faculdade, por me apoiar em cada decisão não medindo esforços para me ajudar no que fosse preciso, meu maior incentivador.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Adriana Pacheco de Almeida Braga** e **Marcos Pedro da Silva Braga** que sempre estiveram ao meu lado. Fazendo com que meus sonhos e os da minha irmã fossem realizados. Os responsáveis por eu estar aqui onde estou. Sou eternamente grata em tê-los como meus pais.

À minha irmã **Joanna Pacheco de Almeida Braga**, minha amiga que sei que sempre estará ao meu lado. O amor grandioso que sinto por você é único.

Ao meu namorado **Ricardo Braga Rocchi Filho**, que me acompanhou desde a graduação nos bons e maus momentos. Obrigada por ter deixado tudo isso mais leve. Meu companheiro de todas as horas, meu melhor amigo, que torce e confia em mim. Gratidão em ter você comigo.

Às minhas amigas, **Ana Beatriz Maciel**, **Julia Paião** e **Lorena Pontes** que foram minha família em Araçatuba. Levarei comigo muitos aprendizados e maravilhosos momentos que tivemos juntas. Vocês foram meus presentes de 2021, sou grata a Deus por ele ter colocado vocês no meu caminho.

À toda minha **família, tios, tias, primos e primas** que sempre vibraram pelas minhas conquistas, torceram e rezaram para que elas fossem realizadas.

À minha orientadora **Profa. Dra. Cristiane Duque**, que é um verdadeiro exemplo de profissional e ser humano. Obrigada por ter me incluído nesse time, por toda paciência e atenção dada quando precisei. Acredito que assim como eu, todos reconhecem e agradecem a dedicação que tem conosco. Tenho enorme admiração pela senhora.

À **Profa. Dra. Karina Caiaffa**, pela presença na banca avaliadora e por ter me ensinado muito tanto na parte da pesquisa quanto pessoal. Você fez com que tudo ficasse agradável, obrigada pela parceria. Você merece todas as conquistas realizadas até hoje e sei que ainda tem muito sucesso te aguardando. Obrigada por tudo, Ka!

Aos meus colegas de laboratório, **Vanessa Rodrigues**, **Rafaela Laruzo**, **Amanda Andolfatto**, **Jesse Pereira** e **Rafael Rios** obrigada pela amizade e parceira. Em especial a **Amanda Andolfatto**, que acompanhou de perto essa caminhada do mestrado, obrigada por tudo.

Aos meus amigos e colegas de pós graduação, **Ana Claudia Rodrigues, Bharbara Moura, Larissa Nunes, Marcelo Seron, Lucas Chalub, Julia Andrade, Camila Arantes, Cristiane Cantiga, Caroline Loureiro, Carol Barros, Lara Teschi, Ana Paula Fernandes, Isabela Prado e Henrique Banci**, obrigada por toda troca de conhecimento, vocês foram essenciais para meu crescimento nesses anos.

A equipe de docentes da Endodontia FOA/UNESP, **Eloi Dezan Junior, João Eduardo Gomes Filho, Luciano Tavares Angelo Cintra, Gustavo Sivieri de Araújo e Rogério de Castilho Jacinto**. Obrigada por todo ensinamento, vocês são inspirações, verdadeiros exemplos de educadores e pesquisadores.

À **Banca do Exame Geral de Qualificação**, composta pelo professor **Luciano Tavares Angelo Cintra e Natália Vizzoto**, que tanto compartilharam e contribuíram para compor esse trabalho.

Agradeço a toda equipe do **Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade do Estado de São Paulo - UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, na pessoa dos professores: Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara, digníssimo Diretor e Prof. Titular Alberto Botazzo Delbem, digníssimo Vice-Diretor. sinto orgulho dos aprendizados que tive aqui.

À **disciplina de Odontopediatria** e ao **Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade do Estado de São Paulo - UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) Código de Financiamento 001 - por financiar a minha bolsa de mestrado durante esse período de dois anos para que esse trabalho pudesse ser realizado.

**“E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode
ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.”**

(William Shakespeare)

Braga, G.P.A. **Propriedades microbiológicas e indutoras de mineralização de flavonoides isolados ou carregados em hidrogéis termorreversíveis para aplicação como medicação endodôntica**. 2022. 106 f. Dissertação (Mestrado) em Ciência Odontológicas - área Endodontia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, 2022.

RESUMO

Este trabalho foi dividido em dois capítulos que apresentaram como objetivo: 1) avaliar a ação antibiofilme e citotoxicidade de hidrogéis termorreversíveis de poly-n-vinylcaprolactama (PNVCL) carregados com flavonoides e 2) avaliar o efeito de flavonoides isolados ou incorporados em hidrogéis de PNVCL sobre a viabilidade e na indução de marcadores de mineralização em células odontoblastóides. No capítulo 1 foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e as concentrações bactericidas mínimas (CBM) dos flavonoides ampelopsina (AMP), isoquercitrina (ISO) e rutina (RUT) sobre *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israeli*, *Lactobacillus casei* e *Fusobacterium nucleatum*. O flavonoide que obteve os menores valores de CIM/CBM foi avaliado quanto a toxicidade em fibroblastos e foi incorporado em hidrogel de PNVCL para análises posteriores. A síntese do hidrogel de PNVCL foi realizada a partir da polimerização radicalar dos monômeros N-vinylcaprolactama e acetato de vinil e sua caracterização por transmitância e ensaios de liberação dos compostos. Como controles positivos foram avaliados hidrogéis de PNVCL contendo clorexidina (CHX) e hidróxido de cálcio (HC) e controle negativo o hidrogel de PNVCL sem antimicrobianos. Os hidrogéis de PNVCL, PNVCL+AMP, PNVCL+CHX, PNVCL+HC foram avaliados quanto ao seu efeito sobre biofilmes multiespécies por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os extratos dos hidrogéis foram coletados após 48h e 7 dias em meio de cultura e avaliados quanto a toxicidade sobre os fibroblastos L-3T3 por meio do ensaio colorimétrico com resazurina. Os resultados do capítulo 1 mostraram que AMP apresentou os menores valores de CIM/CBM contra os microrganismos avaliados e reduziu o metabolismo das células L-3T3 em concentrações acima de 0,125 mg/mL. A análise de MEV mostrou que PNVCL+AMP causou redução bacteriana significativa e desorganização do biofilme multiespécie, similar ao observado para o PNVCL+CH. Na análise de MCVL, PNVCL+AMP levou à significativa redução das células bacterianas viáveis no interior dos túbulos dentinários, superior aos demais grupos. Baseado nos resultados do capítulo 1, conclui-se que dentre os flavonóides testados, AMP apresentou o melhor efeito antimicrobiano e quando incorporada no hidrogel de PNVCL mostrou ação contra os biofilmes multiespécies avaliados, com efeito superior ou semelhante ao PNVCL+CH.

No capítulo 2, células odontoblastóides (MDPC-23) foram tratadas com flavonoides AMP, ISO e RUT, em três concentrações diferentes (100 µM, 50 µM e 25 µM) e avaliada sua citotoxicidade em 48 h, 8 dias e 14 dias. Após 48h de tratamento e trocas de meio osteogênico por 8 e 14 dias, foram determinadas a atividade de fosfatase alcalina (ALP), produção de proteína total (PT) e deposição de nódulos mineralizados (NM). Os resultados mostraram que AMP, ISO e RUT não afetaram a viabilidade celular em nenhum dos períodos avaliados. A atividade de ALP foi superior ao controle meio osteogênico quando MDPC-23 foram tratadas com AMP a 100 e 50 µM, ISO a 50 µM e RUT a 100 µM. Maior deposição de NM em comparação ao controle foi observada nas concentrações 100 a 25 µM para AMP, 25 µM para ISO e entre 100 e 25 µM para RUT. Após 48 h de exposição, os extratos de 48 h de PNVCL+AMP e de PNVCL+HC, independente da diluição, não afetaram a viabilidade das células, o que não foi observado para os extratos de 7 dias, que causaram citotoxicidade entre as diluições 1/2 e 1/8. Após 8 e 14 dias de exposição, somente os extratos de 7 dias dos hidrogéis causaram redução da viabilidade celular, porém, não diferiram entre si. A atividade de ALP foi superior ao controle para os extratos de 48 h e 7 dias de PNVCL+AMP e PNVCL+HC, independente da diluição. Para a produção de NM, efeito superior de ambos os extratos (48 h e 7 dias) de PNVCL+AMP foi observado em comparação ao PNVCL+HC. A partir dos resultados do capítulo 2, pode-se concluir que a AMP isolada ou incorporada ao hidrogel de PNVCL apresentou citocompatibilidade e capacidade de induzir marcadores de mineralização em células odontoblastóides. Este estudo demonstrou que AMP carregada em hidrogel de PNVCL apresentou efeito antibiofilme e capacidade de estimular marcadores de mineralização dentinária, propriedades interessantes para aplicação como medicação intracanal.

Palavras-chaves: Flavonoides; Antimicrobianos; Biofilmes; Células cultivadas; Hidrogel; Fosfatase Alcalina.

Braga, G.P.A. **Microbiological and mineralization-inducing properties of flavonoids alone or carried in thermoreversible hydrogels for application as endodontic medication**. 2022. 106 p. Dissertação (Mestrado) em Ciência Odontológica - área Endodontia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, 2022.

ABSTRACT

This dissertation was divided into two chapters that aimed to: 1) evaluate the antibiofilm action and cytotoxicity of thermoreversible poly-n-vinylcaprolactam hydrogels (PNVCL) containing flavonoids and 2) evaluate the effect of flavonoids alone or incorporated in PNVCL hydrogels on the viability and induction of mineralization markers in odontoblast-like cells. In chapter 1, the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) of the flavonoids ampelopsin (AMP), isoquercitrin (ISO) and rutin (RUT) were determined on *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israeli*, *Lactobacillus casei* and *Fusobacterium nucleatum*. The flavonoid that had the lower MIC/MBC values was evaluated for fibroblast toxicity and was incorporated into PNVCL hydrogel for further analysis. The synthesis of the PNVCL hydrogel was carried out from the radical polymerization of the monomers N-vinylcaprolactam and vinyl acetate and its characterization by transmittance and release assays of the compounds. As positive controls were evaluated PNVCL hydrogels containing chlorhexidine (CHX) or calcium hydroxide (CH) and PNVCL hydrogel without antimicrobials as negative control. PNVCL, PNVCL+AMP, PNVCL+CHX, PNVCL+HC hydrogels were evaluated for their effect on multispecies biofilms by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and scanning electron microscopy (SEM). The hydrogel extracts were collected after 48h and 7 days in culture medium and evaluated for toxicity on L-3T3 fibroblasts by colorimetric assay with resazurin. The results of chapter 1 showed that AMP presented the lowest MIC/MBC values against the evaluated microorganisms and reduced the metabolism of L-3T3 cells at concentrations above 0.125 mg/mL. SEM analysis showed that PNVCL+AMP caused significant bacterial reduction and disorganization of the multispecies biofilm, similar to what was observed for PNVCL+CH. CLSM analysis demonstrated that PNVCL+AMP led to a significant reduction of viable bacterial cells inside the dentinal tubules, higher than the other groups. Based on the results of chapter 1, it is concluded that among the flavonoids tested, AMP showed antimicrobial activity and effect against multispecies biofilms when incorporated into the PNVCL hydrogel, and this effect was superior or similar to PNVCL+CH. In chapter 2, odontoblastoid cells (MDPC-23) were treated with flavonoids AMP, ISO and RUT at three different concentrations (100 μ M, 50 μ M and 25 μ M) and their cytotoxicity was evaluated at 48 h, 8 days and 14

days. After 48 h of treatment and changes of osteogenic medium for 8 and 14 days, alkaline phosphatase (ALP) activity, total protein production (PT) and mineralized nodule deposition (NM) were determined. The results showed that AMP, ISO and RUT did not affect cell viability in any of the periods evaluated. ALP activity was superior to the osteogenic medium control when MDPC-23 were treated with AMP at 100 and 50 μ M, ISO at 50 μ M and RUT at 100 μ M. Higher NM deposition compared to the osteogenic control medium was observed at concentrations 100 to 25 μ M for AMP, 25 μ M for ISO and between 100 and 25 μ M for RUT. After 48 h of exposure, the 48 h extracts of PNVCL+AMP and PNVCL+HC, regardless of dilution, did not affect the viability of MDPC-23 cells, which was not observed for the 7 days extracts, which caused cytotoxicity between 1/2 and 1/8 dilutions. After 8 and 14 days of exposure, only the 7 days extracts of the hydrogels caused a reduction in cell viability, but they did not differ from each other. The ALP activity was superior to the control for the 48 h and 7 days extracts of PNVCL+AMP and PNVCL+CH, regardless of the dilution. For NM production, a higher effect of both (48 h and 7 days) extracts of PNVCL+AMP compared to PNVCL+CH. From the results of chapter 2, it can be concluded that AMP alone or incorporated into the PNVCL hydrogel showed cytocompatibility and the ability to induce mineralization markers in odontoblastoid cells. In general, this study demonstrated that AMP carried in PNVCL hydrogel presents antibiofilm effect and the ability to stimulate dentinal mineralization markers, interesting properties for application as intracanal medication.

Keywords: Flavonoids; Antimicrobials; Biofilms; Cell culture; Hydrogel; Alkaline Phosphatase.

Lista de Figuras

Capítulo 1

- Figure 1.** Effect of the flavonoid ampelopsin (AMP) 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. ^a Different letters show statistical difference among the antimicrobials groups and concentrations, according to ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$).40
- Figure 2.** Variation of G' and G'' with time for PNVCL – L (20% w/v) hydrogel at 25 °C and 37 °C, indicated by the temperature profile with time.41
- Figure 3.** In vitro percent drug release vs time profile for PNVCL hydrogels containing ampelopsin (AMP), chlorhexidine (CHX) and calcium hydroxide (CH) at pH 7 and pH 1042
- Figure 4.** Representative scanning electron microscopy images of 7-days multispecies biofilms under 5000x magnification. Biofilms were treated for 48 hours with A: PNVCL containing ampelopsin (AMP) at 2.5 mg/mL; B – PNVCL containing calcium hydroxide (CH) at 1 mg. C – PNVCL containing chlorhexidine (CHX) at 0.5 mg/mL; D – PNVCL without antimicrobials; E - Control – Bacterial growth without antimicrobial agents. F. Mean (SD) of the bacterial counts detected after 48h of the biofilm treatment with flavonoids and controls. ^a Different letters show statistical difference among the antimicrobials groups and concentrations, according to ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$).44
- Figure 5.** 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: PNVCL containing ampelopsin (AMP) at 2.5 mg/mL; B – PNVCL containing calcium hydroxide (CH) at 1 mg/m. C – PNVCL containing chlorhexidine (CHX) at 0.5 mg/mL; D – PNVCL without antimicrobials; E - Control – Bacterial growth without antimicrobial agents. G. Mean (SD) of the percentages of dead cells of *E. faecalis* biofilm formed in root dentin of bovine teeth, after 48h of treatment with antimicrobial agents and controls. ^a Different letters show statistical difference among the antimicrobials groups and concentrations, according to ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$).45
- Figure 6.** Effect of the 48h (A) and 7 days (B) extracts of PNVCL hydrogels containing ampelopsin (AMP), calcium hydroxide (CH) and chlorhexidine (CHX) on the viability of fibroblasts (3T3) after 24h of exposure, using staining with resazurin. Concentrations in mg/mL. ^a Different letters show statistical difference among the antimicrobials groups and concentrations, according to ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$).46

Capítulo 2

- Figure 1.** Experimental design of the study. A. MDPC-23 treatments with ampelopsin (AMP), isoquercitrin (ISO), rutin (RUT) and calcium hydroxide (CH). B. MDPC-23 treatments with 48h and 7 days extracts of the hydrogels: PNVCL, PNVCL +AMP and PNVCL + CH63
- Figure 2.** Percentage of MDPC-23 viability after 48h treatment with ampelopsin (AMP), isoquercetrin (ISO), rutin (RUT) and calcium hydroxide (CH) and evaluation at 48h (A), 8 days (B) and 14 days (C) of evaluation. The values are expressed in means/standard deviations67
- Figure 3.** ALP activity of MDPC-23 cells after 48h of the treatment with ampelopsin (AMP), isoquercetrin (ISO), rutin (RUT) and calcium hydroxide (CH) and 8 days of evaluation. The values are expressed in means/standard deviations.....68
- Figure 4.** Mineralized nodules deposition of MDPC-23 cells at 14 days of evaluation after 48h of the treatment with ampelopsin (AMP), isoquercetrin (ISO), rutin (RUT) and calcium hydroxide (CH). The values are expressed in means/standard deviations69
- Figure 5.** Percentage of MDPC-23 viability after 48 h treatments with 48h (A) and 7 days (B) PNVCL hydrogels extracts containing or not ampelopsin (PNVCL+AMP) and calcium hydroxide (PNVCL+CH). The values are expressed in means/standard deviations.....70
- Figure 6.** Percentage of MDPC-23 viability after 48h of treatments with 48h (A) and 7 days (B) PNVCL hydrogels extracts containing or not ampelopsin (PNVCL+AMP) and calcium hydroxide (PNVCL+CH) and evaluation at 8 days. The values are expressed in means/standard deviations.....71
- Figure 7.** Percentage of MDPC-23 viability after 48h of treatments with 48h (A) and 7 days (B) PNVCL hydrogels extracts containing or not ampelopsin (PNVCL+AMP) and calcium hydroxide (PNVCL+CH) and evaluation at 14 days. The values are expressed in means/standard deviations.....72
- Figure 8.** ALP activity of MDPC-23 cells after 48h treatments with 48h (A) and 7 days (B) hydrogels extracts containing or not ampelopsin (AMP) and calcium hydroxide (CH) and evaluation at 8 days. The values are expressed in means/standard deviations.....74
- Figure 9.** Mineralized nodules deposition by MDPC-23 cells at 14 days of evaluation after 48h treatments with 48h (A) and 7 days (B) hydrogels extracts containing or not ampelopsin (AMP) and calcium hydroxide (CH). The values are expressed in means/standard deviations.....75
- Suppl.1.** Images of alizarin red staining obtained by inverted light microscope, indicating the bioactive effect of flavonoids on the MDPC-23 cells relative to mineralized nodules formations. All groups induced high nodules deposition dependent on the concentration. AMP at 10 μ M (A), AMP at 50 μ M (B), AMP at 25 μ M (C), ISO at 100 μ M (D), ISO at 50 μ M (E), ISO at 25 μ M (F), RUT at 100 μ M (G), RUT at 50 μ M (H), RUT at 25 μ M (I) and CH at 100 μ M (J), CH at 50 μ M (K), CH at 25 μ M (L)

Control DMEM (M). 4x magnification79

Suppl.2. Images of alizarin red staining obtained by inverted light microscope, indicating the bioactive effect of 48 h hydrogels extracts on the MDPC-23 cells relative to mineralized nodules formations. The greatest nodules deposition can be seen in the groups PNVCL+AMP 1/32 and both dilutions of PNVCL+CH (1/16 and 1/32) PNVCL+AMP 1/16 (A), PNVCL+AMP 1/32 (B), PNVCL+CH 1/16 (C), PNVCL+CH 1/32 (D), PNCVL 1/16 (E), PNVCL 1/32 (F) and control DMEM (G). 4x magnification80

Suppl.3. Images of alizarin red staining obtained by inverted light microscope, indicating the bioactive effect of 7 days hydrogels extracts on the MDPC-23 cells relative to mineralized nodules formations. The greatest nodules deposition can be seen in the groups PNVCL+AMP and PNVCL+CH , both at 1/16 and 1/32 dilutions. PNVCL+AMP 1/16 (A), PNVCL+AMP 1/32 (B), PNVCL+CH 1/16(C), PNVCL+CH 1/32 (D), PNCVL 1/16 (E), PNVCL 1/32 (F) and control DMEM (G). 4x magnification81

Lista de Tabelas

Table 1. Flavonoids used in this study: codes, synonyms, chemical structure, empirical formula, and molecular weight.....32

Table 2. Minimal inhibitory concentration (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC) in mg/mL for the flavonoids and control chlorhexidine against the oral bacteria tested39

SUMÁRIO

Sumário	
Introdução Geral	18
Objetivos	27
Capítulo 1	28
Abstract	29
Introduction	30
Material and Methods	32
Results	39
Discussion	47
References	50
Capítulo 2	57
Abstract	58
Introduction	59
Material and Methods	61
Results	66
Discussion	76
Supplementary material	79
References	82
Anexo A	88
Anexo B	93
Anexo C	99
Anexo D	100

Introdução Geral

O tratamento endodôntico de dentes permanentes jovens que sofreram danos pulpares ainda é um desafio clínico, visto que o dente ainda não completou a formação radicular e existe a necessidade de preservar as células remanescentes, principalmente as células da bainha epitelial de Hertwig, responsáveis por guiar a formação das raízes, e também células adjacentes a ela como odontoblastos recém-diferenciados, que sintetizam dentina, o que remete à necessidade do uso de materiais e soluções biocompatíveis e que possam estimular a regeneração tecidual (Rafter et al., 2005; Iglesias-Linares et al., 2013).

Para o preparo químico-mecânico tradicional são utilizadas substâncias químicas irrigadoras como o hipoclorito de sódio ou a clorexidina que, nas altas concentrações indicadas, não são consideradas biocompatíveis, podendo inviabilizar as células remanescentes presentes do tecido pulpar ou periapical, interrompendo a proliferação celular e posterior secreção de dentina e continuação da formação da raiz (Ring et al., 2008). Além disso, embora o preparo químico-mecânico reduza significativamente os microrganismos presentes nos canais radiculares, bactérias residuais podem permanecer no interior de túbulos dentinários, canais secundários e istmos devido à dificuldade de limpeza desse complexo sistema de canais radiculares e a resistência microbiana ao tratamento, o que pode gerar infecções persistentes ou secundárias (Siqueira et al., 2007a; Siqueira et al., 2007b).

As bactérias Gram-positivas facultativas têm sido consideradas as mais resistentes ao preparo químico-mecânico, dentre elas, espécies de *Streptococcus*, *Actinomyces* (*A. israelii* e *A. odontolyticus*), *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, e *Enterococcus faecalis*. Entretanto, algumas espécies Gram-negativas como *Fusobacterium* spp, *Prevotella* spp. também podem ser detectadas, mostrando que ainda há certa diversidade microbiana, mesmo após o uso das soluções antimicrobianas de rotina (Sakamoto et al., 2007; Siqueira et al., 2007a; Siqueira & Rôças, 2009). Por este motivo, medicações intracanaís são frequentemente utilizadas visando eliminar a microbiota remanescente, sendo que a pasta de hidróxido de cálcio (HC) é a mais indicada, principalmente para dentes permanentes jovens, por suas

propriedades biológicas e físico-químicas (Sheehy & Roberts, 1997; Da Silva et al., 2010).

Os tratamentos endodônticos convencionais preconizados para dentes permanentes jovens frequentemente conduzem à resolução dos sinais e sintomas das patologias pulpaes/periapicais (Parirokh et al., 2010), porém, promovem pouco ou nenhum benefício para a continuidade da apicigênese, processo de desenvolvimento radicular (Diogenes et al., 2014). Dessa forma, novos protocolos biológicos vêm sendo estudados buscando combinar materiais que possam reduzir substancialmente a microbiota residual e permitir a regeneração tecidual natural preservando as células remanescentes e a continuação da formação radicular (Iglesias-Linares et al., 2013).

Um desses protocolos biológicos é baseado no conceito de revascularização pulpar que combina a irrigação passiva com hipoclorito de sódio em baixa concentração (1,5%) e a aplicação de medicação intracanal com uma pasta antibiótica (1-5mg/mL) ou pasta de hidróxido de cálcio (1mg/mL) (AAE, 2018) em uma primeira sessão. Essa técnica propõe a indução de sangramento intracanal, formação de coágulo sanguíneo e aplicação de matriz de colágeno reabsorvível em uma segunda sessão (até um mês depois) para estimular a revascularização pulpar e o reparo periapical (AAE, 2018). O uso de antibióticos apresenta algumas limitações como o desenvolvimento de resistência bacteriana, descoloração da coroa (Kim et al., 2010), além de toxicidade sobre as células indiferenciadas (Althumairy et al., 2014). Além disso, esses medicamentos são mais efetivos quando os microorganismos estão em estado ativo de síntese das paredes celulares, proteínas e DNA, do que em fase estacionária, como ocorre no interior dos espaços radiculares quando bactérias resistem ao preparo químico-mecânico (Saoud et al., 2016). O hidróxido de cálcio também apresenta limitações para eliminar as bactérias intracanaís e parte está relacionada aos efeitos inibitórios da dentina e hidroxiapatita sobre a sua atividade antimicrobiana (Haapasalo et al., 2007).

O princípio da revascularização embora tenha se mostrado favorável em alguns estudos clínicos promovendo o reparo dos tecidos periapicais em dentes permanentes imaturos com periodontite apical (Banchs & Trope, 2004; Thibodeaud

et al., 2007; Jung et al., 2008; Ding et al., 2009; Reynolds et al., 2009; Kim et al., 2010; Taneja et al., 2010; Iwaya et al., 2011), tem sido considerado de baixa previsibilidade desde que o desenvolvimento radicular pode variar de 21% a 100%, e existem algumas controvérsias quanto ao tecido formado no canal radicular que consistiria em um tecido conjuntivo com cemento associado à bactéria residual (Schmalz et al., 2020). Assim, embora a técnica de revascularização pulpar pareça promissora, ainda são necessários novos medicamentos que possam permanecer dentro do canal radicular reduzindo as bactérias residuais aos procedimentos de irrigação passiva e ainda consigam estimular as células remanescentes a continuarem a síntese das paredes dentinárias e completarem a formação radicular (Iglesias-Lineares et al., 2013).

Flavonoides são metabólitos secundários responsáveis pela cor, fragância e sabor de diversas espécies vegetais. Além disso, eles regulam o crescimento celular, protegem as plantas contra espécies bióticas e abióticas, atuam como moléculas de sinalização, e são sequestradores de espécies reativas de oxigênio, entre outras funções (Dias et al., 2021). A ampelopsina (2,3-dihydrochromen-4-one), também conhecida como dihidromiricetina, é um flavanonol extraído das folhas da *Ampelopsis grossendata*. Dentre as suas propriedades biológicas e farmacológicas, foram relatados efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos, antioxidantes, anti-tumores, cardioprotetores, neuroprotetores, dermoprotetores, além de atuar na regulação da insulina e colesterol (Zhang et al., 2016; Ran et al., 2019; Chen et al., 2020; Liang et al., 2020). A ampelopsina também aumenta a atividade da fosfatase alcalina, a deposição mineral e a expressão de genes específicos de osteoblastos, sem apresentar citotoxicidade e efeito negativo sobre a proliferação celular (Zhang et al., 2016; Weng et al., 2017). Outro flavonoide, a isoquercitrina (quercetin 3-O-beta-Dglucofuranoside), é um composto fenólico encontrado em plantas como *Mangifera indica* (Wu et al., 2020) e ervas como a *Camellia sinensis* (Sakakibara et al., 2003) apresentando propriedades terapêuticas, como ação anti-inflamatória, antioxidante, antialérgica, antifúngica e antibacteriana (Yun et al., 2018). A rutina (quercetin-3-O-rutinoside), um biflavonoide presente em algumas hortaliças e frutas cítricas tem sido indicado como um promissor agente antibiofilme (Al-Shabib et al., 2017). Além disso,

possui propriedades antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, antialérgica, entre outras (Yong et al., 2020). Embora os flavonoides são promissores biomoléculas devido a sua amplitude terapêutica, seu uso clínico é limitado, desde que apresentam baixa solubilidade, baixa estabilidade e degradação em ambientes ácidos o que reduz sua biodisponibilidade ao longo do tempo (Ferreira et al., 2022).

Polímeros naturais ou sintéticos têm sido usado como carreadores de biomoléculas desde que promovem a liberação controlada desses compostos e prolongam seu efeito biológico. No caso da atividade antimicrobiana, por exemplo, esses carreadores reduzem a necessidade de doses excessivas, exposição frequente e probabilidade de resistência bacteriana (Liet al., 2018). Os principais carreadores poliméricos atualmente estão sendo empregados em diferentes formas: *scaffolds*, hidrogéis e nanopartículas ou combinações dessas formas. Hidrogéis são capazes de transitar do estado líquido para o estado gel pela formação de uma rede tridimensional polimérica como resultado de estímulos externos e interações físicas, como calor, pH ou ligações químicas (Li et al., 2018; Chenite et al., 2000).

Os hidrogéis termossensíveis transitam do estado físico em temperatura específica, baseada nas interações hidrofílicas-hidrofóbicas entre as cadeias de polímeros e moléculas de água (Ponce-Vargas et al., 2013). Além de termossensíveis, alguns polímeros podem ser considerados termorreversíveis, como o poly(N-vinylcaprolactam) (PNVCL), pois apresentam valores críticos de temperatura de conversão similares à temperatura fisiológica corporal humana podendo transitar do estado líquido para gel quando injetados dentro do corpo humano e retornar ao estado líquido quando resfriados (Sala et al., 2017; Chenite et al., 2000). Além disso, esses hidrogéis quando sofrem hidrólise não produzem compostos tóxicos e têm apresentado boa compatibilidade celular, quando comparados a outros géis de similar característica química, podendo ser um adequado veículo para o carregamento de medicamentos (Liang et al., 2012). O hidrogel PNVCL também tem mostrado aumentar a solubilidade de alguns fármacos em solução aquosa, facilitando seu carregamento, além de minimizar os efeitos colaterais associados a eles (Paramenswara-Thankam et al., 2018). O presente estudo foi dividido em dois

capítulos e tem por objetivos: 1) avaliar a ação antibiofilme e citotoxicidade de hidrogéis termorreversíveis de poly-n- vinylcaprolactama (PNVCL) contendo flavonoides e 2) avaliar o efeito de flavonoides isolados ou incorporados em hidrogéis de PNVCL sobre a viabilidade e na indução de marcadores de mineralização em células odontoblastóides.

*Referências da Introdução Geral em **Anexo A**

ANEXOS

REFERÊNCIAS – INTRODUÇÃO GERAL

ANEXO A

1. Iglesias-Linares, A., Yáñez-Vico, R. M., Sánchez-Borrego, E., Moreno-Fernández, A. M., Solano-Reina, E., & Mendoza-Mendoza, A. (2013). Stem cells in current paediatric dentistry practice. *Archives of oral biology*, 58(3), 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.11.008>
2. Rafter M. (2005). Apexification: a review. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*, 21(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2004.00284.x>
3. Siqueira, J. F., Jr, Paiva, S. S., & Rôças, I. N. (2007). Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *Journal of endodontics*, 33(5), 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.01.008>
4. Siqueira, J. F., Jr, Magalhães, K. M., & Rôças, I. N. (2007). Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *Journal of endodontics*, 33(6), 667–672. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.01.004>
5. Ring, K. C., Murray, P. E., Namerow, K. N., Kuttler, S., & Garcia-Godoy, F. (2008). The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. *Journal of endodontics*, 34(12), 1474–1479. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.09.001>
6. Sakamoto, M., Siqueira, J. F., Jr, Rôças, I. N., & Benno, Y. (2007). Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral microbiology and immunology*, 22(1), 19–23. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00315.x>
7. Siqueira, J. F., Jr, & Rôças, I. N. (2009). Diversity of endodontic microbiota revisited. *Journal of dental research*, 88(11), 969–981. <https://doi.org/10.1177/0022034509346549>
8. Sheehy, E. C., & Roberts, G. J. (1997). Use of calcium hydroxide for apical barrier formation and healing in non-vital immature permanent teeth: a review. *British dental journal*, 183(7), 241–246. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4809477>
9. da Silva, L. A., Nelson-Filho, P., da Silva, R. A., Flores, D. S., Heilborn, C., Johnson, J. D., & Cohenca, N. (2010). Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 109(5), 779–787. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.12.046>

10. Parirokh, M., & Torabinejad, M. (2010). Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *Journal of endodontics*, 36(1), 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.006>
11. Diogenes, A. R., Ruparel, N. B., Teixeira, F. B., & Hargreaves, K. M. (2014). Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *Journal of endodontics*, 40(4 Suppl), S52–S57. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.01.015>
12. Jung, I. Y., Lee, S. J., & Hargreaves, K. M. (2008). Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *Journal of endodontics*, 34(7), 876–887. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.03.023>
13. Ding, R. Y., Cheung, G. S., Chen, J., Yin, X. Z., Wang, Q. Q., & Zhang, C. F. (2009). Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *Journal of endodontics*, 35(5), 745–749. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.02.009>.
14. Taneja, S., Kumari, M., & Parkash, H. (2010). Nonsurgical healing of large periradicular lesions using a triple antibiotic paste: A case series. *Contemporary clinical dentistry*, 1(1), 31–35. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.62519>
15. Reynolds, K., Johnson, J. D., & Cohenca, N. (2009). Pulp revascularization of necrotic bilateral bicusps using a modified novel technique to eliminate potential coronal discolouration: a case report. *International endodontic journal*, 42(1), 84–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2008.01467.x>
16. American Association of Endodontists (AAE) (2018) Clinical Considerations for a Regenerative Procedure. Revised 2018. <https://www.aae.org/specialty/publications-research/research/regenerative-database/>
17. Kim, J. H., Kim, Y., Shin, S. J., Park, J. W., & Jung, I. Y. (2010). Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *Journal of endodontics*, 36(6), 1086–1091. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.03.031>
18. Iwaya, S., Ikawa, M., & Kubota, M. (2011). Revascularization of an immature permanent tooth with periradicular abscess after luxation. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*, 27(1), 55–58. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2010.00963.x>
19. Sato, T., Hoshino, E., Uematsu, H., & Noda, T. (1993). In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs on bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. *Oral microbiology and immunology*, 8(3), 172–176. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1993.tb00661.x>
20. Hoshino, E., Kurihara-Ando, N., Sato, I., Uematsu, H., Sato, M., Kota, K., & Iwaku, M. (1996). In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of

ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *International endodontic journal*, 29(2), 125–130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1996.tb01173.x>

21. Sato, I., Ando-Kurihara, N., Kota, K., Iwaku, M., & Hoshino, E. (1996). Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *International endodontic journal*, 29(2), 118–124. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1996.tb01172.x>
22. Trope M. (2010). Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. *Dental clinics of North America*, 54(2), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2009.12.006>
23. Althumairy, R. I., Teixeira, F. B., & Diogenes, A. (2014). Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *Journal of endodontics*, 40(4), 521–525. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.11.008>
24. Saoud TMA, Ricucci D, Lin LM, Gaengler P. Regeneration and Repair in Endodontics-A Special Issue of the Regenerative Endodontics-A New Era in Clinical Endodontics. *Dent J (Basel)*. 2016 Feb 27;4(1):3. doi: 10.3390/dj4010003. PMID: 29563445; PMCID: PMC5851202.
25. Haapasalo, M., Qian, W., Portenier, I., & Waltimo, T. (2007). Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *Journal of endodontics*, 33(8), 917–925. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.04.008>
26. Banchs, F., & Trope, M. (2004). Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol?. *Journal of endodontics*, 30(4), 196–200. <https://doi.org/10.1097/00004770-200404000-00003>
27. Thibodeau, B., Teixeira, F., Yamauchi, M., Caplan, D. J., & Trope, M. (2007). Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *Journal of endodontics*, 33(6), 680–689. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.03.001>
28. Schmalz, G., Widbiller, M., & Galler, K. M. (2020). Clinical Perspectives of Pulp Regeneration. *Journal of endodontics*, 46(9S), S161–S174. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.037>
29. Dias, M. C., Pinto, D., & Silva, A. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(17), 5377. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
30. Zhang, W., Wang, S., Yin, H., Chen, E., Xue, D., Zheng, Q., Gao, X., & Pan, Z. (2016). Dihydromyricetin enhances the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro partially via the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Fundamental & clinical pharmacology*, 30(6), 596–606. <https://doi.org/10.1111/fcp.12225>
31. Ran, L., Wang, X., Lang, H., Xu, J., Wang, J., Liu, H., Mi, M., & Qin, Y. (2019). Ampelopsis grossedentata supplementation effectively ameliorates the glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *European journal of clinical nutrition*, 73(5), 776–782. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0282-z>

32. Chen, L., Yang, Z. S., Zhou, Y. Z., Deng, Y., Jiang, P., & Tan, S. L. (2020). Dihydromyricetin inhibits cell proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis *via* regulating miR-21 in Human Cholangiocarcinoma Cells. *Journal of Cancer*, 11(19), 5689–5699. <https://doi.org/10.7150/jca.45970>
33. Liang, H., He, K., Li, T., Cui, S., Tang, M., Kang, S., Ma, W., & Song, L. (2020). Mechanism and antibacterial activity of vine tea extract and dihydromyricetin against *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports*, 10(1), 21416. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78379-y>
34. Weng, L., Zhang, H., Li, X., Zhan, H., Chen, F., Han, L., Xu, Y., & Cao, X. (2017). Ampelopsin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response through the inhibition of the NF- κ B and JAK2/STAT3 signaling pathways in microglia. *International immunopharmacology*, 44, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.12.018>
35. Wu, L., Wu, W., Cai, Y., Li, C., & Wang, L. (2020). HPLC fingerprinting-based multivariate analysis of phenolic compounds in mango leaves varieties: Correlation to their antioxidant activity and in silico α -glucosidase inhibitory ability. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 191, 113616. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113616>
36. Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., & Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(3), 571–581. <https://doi.org/10.1021/jf020926l>
37. Yun, J., Woo, E. R., & Lee, D. G. (2018). Effect of isoquercitrin on membrane dynamics and apoptosis-like death in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1860(2), 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.11.008>
38. Al-Shabib, N. A., Husain, F. M., Ahmad, I., Khan, M. S., Khan, R. A., & Khan, J. M. (2017). Rutin inhibits mono and multi-species biofilm formation by foodborne drug resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 79, 325–332. doi:10.1016/j.foodcont.2017.03.0
39. Yong, D., Saker, S. R., Chellappan, D. K., Madheswaran, T., Panneerselvam, J., Choudhury, H., Pandey, M., Chan, Y. L., Collet, T., Gupta, G., Oliver, B. G., Wark, P., Hansbro, N., Hsu, A., Hansbro, P. M., Dua, K., & Zeeshan, F. (2020). Molecular and Immunological Mechanisms Underlying the Various Pharmacological Properties of the Potent Bioflavonoid, Rutin. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 20(10), 1590–1596. <https://doi.org/10.2174/1871530320666200503053846>
40. Li, S., Dong, S., Xu, W., Tu, S., Yan, L., Zhao, C., Ding, J., & Chen, X. (2018). Antibacterial Hydrogels. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 5(5), 1700527. <https://doi.org/10.1002/advs.201700527>
41. Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M. D., Hoemann, C. D., Leroux, J. C., Atkinson, B. L., Binette, F., & Selmani, A. (2000). Novel injectable neutral solutions of chitosan form

biodegradable gels in situ. *Biomaterials*, 21(21), 2155–2161. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00116-2](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00116-2)

42. Ponce-Vargas, S.M., Cortez-Lemus, N.A., Licea-Claver, A. (2013). Preparation of Poly (N-Vinylcaprolactam) (NVCL) and Statistical Copolymers of NVCL with Variable Cloud Point Temperature by Using A Trithiocarbonate RAFT Agent. *Macromolecular Symposia*, 325-326(1):56-70. <https://doi.org/10.1002/masy.201200045>
43. Sala, R. L., Kwon, M. Y., Kim, M., Gullbrand, S. E., Henning, E. A., Mauck, R. L., Camargo, E. R., & Burdick, J. A. (2017). * Thermosensitive Poly(N-vinylcaprolactam) Injectable Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue engineering. Part A*, 23(17-18), 935–945. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0464>
44. Liang, X., Kozlovskaya, V., Chen, Y., Zavgorodnya, O., & Kharlampieva, E. (2012). Thermosensitive multilayer hydrogels of poly(N-vinylcaprolactam) as nanothin films and shaped capsules. *Chemistry of materials : a publication of the American Chemical Society*, 24(19), 3707–3719. <https://doi.org/10.1021/cm301657q>
45. Parameswaran-Thankam, A., Parnell, C. M., Watanabe, F., RanguMagar, A. B., Chhetri, B. P., Szvedo, P. K., Biris, A. S., & Ghosh, A. (2018). Guar-Based Injectable Thermo-responsive Hydrogel as a Scaffold for Bone Cell Growth and Controlled Drug Delivery. *ACS omega*, 3(11), 15158–15167. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01765>