

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 24/10/2024.

Vanessa Rodrigues dos Santos

**EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DE ÁCIDOS FENÓLICOS
ISOLADOS, COMBINADOS E INCORPORADOS
EM HIDROGÉIS DE QUITOSANA PARA
APLICAÇÃO ENDODÔNTICA**

Araçatuba - SP
2022

Vanessa Rodrigues dos Santos

Vanessa Rodrigues dos Santos

**EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DE ÁCIDOS FENÓLICOS
ISOLADOS, COMBINADOS E INCORPORADOS
EM HIDROGÉIS DE QUITOSANA PARA
APLICAÇÃO ENDODÔNTICA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para obtenção de título de Doutora em Ciência Odontológica - Área de Concentração: Saúde bucal da criança.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristiane Duque

Coorientador: Prof. Dr Antonio Hernandes Chaves Neto

**Araçatuba - SP
2022**

Vanessa Rodrigues dos Santos

Catálogo-na-Publicação

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S237e Santos, Vanessa Rodrigues dos.
Efeito antimicrobiano e anti-inflamatório de ácidos fenólicos isolados, combinados e incorporados em hidrogéis de quitosana para aplicação endodôntica / Vanessa Rodrigues dos Santos. - Araçatuba, 2022
117 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Cristiane Duque
Coorientador: Prof. Antonio Hernandes Chaves Neto

1. Cinamatos 2. Ácidos cafeicos 3. Anti-infecciosos
4. Biofilmes 5. Anti-inflamatórios 6. Quitosana I. T.

Black D27
CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados Curriculares

Vanessa Rodrigues dos Santos

Vanessa Rodrigues dos Santos

Nascimento	22.07.1992 – Santa Helena de Goiás - GO
Filiação	Antonio Roberto dos Santos Euciene Rodrigues da Silva dos Santos
2012-2016	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba –UNESP.
2017-2019	Mestrado em Ciência Odontológica, área de concentração Saúde bucal da criança, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Odontologia – FOA, com bolsa CNPq e FAPESP.
2019-2022	Doutorado em Ciência Odontológica, área de concentração Saúde bucal da criança, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Odontologia – FOA, com bolsa CAPES e FAPESP.
2019-2022	Especialização em Odontopediatria pelo Instituto Sul-Americano de Pesquisa e Ensino - INSPE
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo. SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

Comissão Examinadora

Vanessa Rodrigues dos Santos

Defesa de Tese

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

Profa. Dra. Letícia Helena Theodoro – Professora Associada do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia – FOA/UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba/SP.

Prof. Dr. José Antonio Santos Souza – Professor Doutor do Departamento de Clínica Odontológica, Disciplina de Estágio em Odontopediatria da Universidade Brasil, Fernandópolis/SP.

Profa. Dra. Nancy Tomoko Sacono – Professora Adjunta do Departamento de Clínica Infantil, Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia – FO/UFG - Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO.

Profa. Dra. Fabiola Galbiatti de Carvalho Carlo – Professora Associada do Departamento de Odontologia, Disciplina de Odontopediatria e Clínica Integrada Infantil I e II da Faculdade de Odontologia – FO/UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora – Governador Valadares/MG.

Epígrafe

Vanessa Rodrigues dos Santos

"Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos."

Provérbios 16:3

Vanessa Rodrigues dos Santos

Dedicatória

Vanessa Rodrigues dos Santos

À Deus,

Pois acredito que cada vitória e conquista em nossas vidas acontece por sua permissão e graça. Reconheço o Seu cuidado durante todos os dias da minha vida inclusive durante essa trajetória. Por muitas vezes precisei de forças e ânimo para chegar até aqui e foi a Sua mão que me sustentou. Ao Senhor dedico esta conquista!

"Seja forte e corajoso! Não tenha medo, nem fique assustado, porque o Senhor, seu Deus, estará com você por onde quer que você andar." Josué 1:9

Aos meus pais,

Aqueles sem os quais nada disso seria possível. Por estarem comigo em cada fase dessa trajetória. Por todo amor e carinho dedicados a mim. Saber que tenho o apoio de vocês faz toda a diferença. Faz-me sentir segura e capaz de realizar grandes sonhos, pois sei que estão sonhando ao meu lado. Esta vitória é por vocês e para vocês!

"...honra a teu pai e a tua mãe, como o SENHOR, teu Deus, te ordenou, para que se prolonguem os teus dias e para que te vá bem na terra que o SENHOR, teu Deus, te dá." Deuteronômio 5:16

Agradecimentos

Vanessa Rodrigues dos Santos

Aos meus pais Roberto e Euciene, obrigada por estarem sempre ao meu lado, ajudando a realizar meus sonhos. Sei que lutam todos os dias para dar o melhor futuro para mim e para meus irmãos. Não medem esforços para nos ver felizes. Obrigada pelos princípios e valores ensinados a mim. Orgulho-me imensamente de fazer parte dessa família e de ser filha de vocês. Te amo Pai! Te amo Mãe!

Aos meus irmãos Victor e Renata, obrigada maninhos por sempre poder contar com vocês e por todo apoio dado a mim. Mesmo de longe sei que torcem por mim, assim como desejo que alcancem sempre o que há de melhor nesse mundo. Amo vocês!

A minha querida amiga Morganna, muito obrigada pela amizade e companheirismo. Sempre pronta para o que eu precisasse. Sua amizade é muito importante nessa trajetória. Sou feliz em saber que sempre poderei contar com você. Obrigada por ser minha família. Te amo amiga!

A minha querida orientadora Cristiane Duque, muito obrigada pela confiança que tem depositado em mim por todos esses anos. Agradeço por toda paciência e ajuda. Uma professora e orientadora dedicada, e que ama o que faz. Uma mulher com coração generoso, humilde e sempre disposto a ajudar. O seu jeito de ser traz admiração por todos aqueles que têm o privilégio de conviver ao seu lado. Sempre guardarei tudo o que construímos com muito carinho no meu coração.

Ao meu coorientador Antonio Hernandes Chaves Neto, muito obrigada por toda colaboração.

As minhas queridas amigas Karina e Rafaela, agradeço a Deus por ter colocado vocês na minha vida. Vocês foram muito importantes nessa trajetória. O laboratório nunca foi o mesmo depois que vocês seguiram seus caminhos. Mas apesar de não tê-las presente todos os dias sei que nossa amizade permanece e sempre estaremos torcendo umas pelas outras. Amo vocês!

Aos amigos Isabela, Caio, Amanda, Gabriela, Jesse, Warley e Igor. Obrigada, queridos amigos por nossa amizade! Bem mais fácil levar a vida com amigos do lado. Muitas vezes foram a família que eu não tinha por perto. Vou sempre levá-los em meu coração.

Aos colegas de laboratório Nayara, Mayra, Gabriel, Heitor, Leonardo, Priscila, Francienne, Tamires, Geórgia, Jéssica e Viviane. Obrigada pela excelente convivência no laboratório e toda prestatividade quando foi necessária.

Ao meu namorado Rodrigo por seu companheirismo e amor. É muito bom encontrar na mesma pessoa seu amor e melhor amigo. Obrigada por estar presente quando precisei e por toda ajuda seja com palavras ou atitudes. Te amo!

Aos professores e alunos colaboradores: Prof. Dr. Marlus Chorili, Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, aos alunos Gabriel Flores Abuna, Tais de Cássia Ribeiro e Igor Mendes Soares, obrigada pela parceria e por toda colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP Prof. Dr. Alberto Carlos B. Delbem, Prof. Dr. Robson Federico Cunha, Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan, Profa. Dra. Thayse Yumi Hosida, muito obrigada por todo conhecimento transmitido, pela fácil acessibilidade, assim como a ótima convivência.

À 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 Banca do Exame Geral de Qualificação, Muito obrigada por toda contribuição no trabalho e pelos conhecimentos trocados.

Aos professores José Antonio Santos Souza, Letícia Helena Theodoro, Nancy Tomoko Sacono, Fabiola Galbiatti de Carvalho Carlo, pela disponibilidade e aceite do convite para participar da minha banca examinadora de defesa de tese de doutorado.

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.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP, Ana Cláudia, Luzia, Ivone, Cláudio, Maria Cláudia, Luiz, Denise e Izamar pela atenção e disponibilidade com que nos recebem.

À Valéria, Cristiane e Eduardo da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, pelo profissionalismo e atenção sempre carinhosa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão de recursos que possibilitou a realização deste Curso de Doutorado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo 2019/01949-0) pela concessão de recursos que possibilitou a realização deste Curso de Doutorado.

Resumo Geral

Vanessa Rodrigues dos Santos

Santos VR. Efeito antimicrobiano e anti-inflamatório de ácidos fenólicos isolados, combinados e incorporados em hidrogéis de quitosana para aplicação endodôntica [Tese]. Doutorado em Ciência Odontológica, área Saúde bucal da criança, Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2022.

Resumo Geral

O objetivo do tratamento endodôntico é manter a integridade da raiz, bem como, prevenir ou resolver doenças periapicais, pela erradicação dos microrganismos e de suas fontes de nutrientes provenientes do sistema de canais radiculares. A complexidade da anatomia dos canais radiculares e dos biofilmes multiespécies aumenta a dificuldade em eliminar os microrganismos e controlar a inflamação por procedimentos químico-mecânicos convencionais, o que justifica o uso de medicações intracanáis. Novos compostos com amplo efeito antimicrobiano e potencial antiinflamatório, como os ácidos fenólicos, poderiam ser explorados como princípios ativos de medicamentos intracanáis. Entretanto, para aumentar a solubilidade, controlar a liberação e estender os efeitos biológicos dos ácidos fenólicos, seria interessante incorporá-los em carreadores de medicamentos como os hidrogéis de quitosana. Este estudo foi dividido em dois capítulos que apresentaram como objetivos: 1) avaliar as atividades antimicrobiana, antibiofilme e antiinflamatória e a citotoxicidade do ácido cinâmico e seus derivados; 2) sintetizar e caracterizar as propriedades químicas e físico-mecânicas de hidrogéis termossensíveis de quitosana e poloxamer contendo ácidos fenólicos, e avaliar o efeito desses hidrogéis sobre biofilmes multiespécies e na viabilidade de macrófagos e fibroblastos. No capítulo 1, a atividade antimicrobiana do ácido cinâmico (CI) e seus derivados ácido cumárico (CO), ácido cafeico (CA), ácido ferúlico (FE) e ácido sinápico (SI) foi avaliada pela determinação da concentração inibitória e bactericida mínima (CIM/CBM) e Concentração Inibitória Fracionada (CIF) sobre *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces israelii* e *Fusobacterium nucleatum*. Os ácidos fenólicos foram selecionados e seu efeito em biofilmes dual-espécies e multiespécies com as mesmas cepas padrão ou cepas clínicas foram avaliados por contagem bacteriana, microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal. A viabilidade de fibroblastos L929 e macrófagos RAW 264.7 na presença desses ácidos fenólicos foi

avaliada por ensaios de resazurina. Além disso, os níveis de mRNA dos marcadores pró-inflamatórios TNF- α , IL-1 β , iNOS e COX-2 foram determinados por PCR quantitativo TaqMan após exposição de macrófagos aos ácidos fenólicos e ao lipopolissacarídeo (LPS). No capítulo 2, foi realizada a síntese e caracterização físico-mecânica de hidrogéis de quitosana-poloxamer (CPH) contendo ácidos fenólicos e avaliado seus efeitos no biofilme multiespécies e na viabilidade de macrófagos e fibroblastos. Os dados foram analisados estatisticamente considerando $p < 0,05$. O ácido cinâmico e o ácido cafeico apresentaram efeito inibitório e bactericida contra todas as espécies bacterianas testadas, com os menores valores de CIM e CBM. Entretanto, não houve efeito sinérgico entre eles ($FICI > 0,5$). Ambos os compostos (5x a CIM mais alta) foram eficazes na eliminação de biofilmes dual-espécies e na redução significativa de biofilmes multiespécies, especialmente o ácido cinâmico. O ácido cinâmico causou toxicidade mínima para ambas as culturas celulares nas concentrações de CIM e o ácido cafeico não foi citotóxico em concentrações abaixo de 0,125 mg/mL. Ambos os compostos reduziram significativamente TNF- α , IL-1 β , iNOS e COX-2, de maneira dose-dependente. Os CPH foram caracterizados como termorreversíveis e com propriedades mecânicas e bioadesivas desejáveis. O efeito dos hidrogéis CPH+CA (77,8%) e CPH+CI (73,2%) em reduzir os biofilmes multiespécies foi superior ao CPH+ hidróxido de cálcio (CH) (53,6%) e CPH+ clorexidina (CHX) (39,9%). Em geral, CPH + CI causou menor citotoxicidade quando comparado a CPH + CA, para ambas as linhagens celulares. Conclui-se que o ácido cinâmico e ácido cafeico apresentaram efeito bactericida e contra biofilmes formados por bactérias associadas com infecções endodônticas, causando baixa citotoxicidade. Ambos os compostos apresentaram efeito antiinflamatório, inibindo a expressão de marcadores pró-inflamatórios em macrófagos estimulados por LPS. Os hidrogéis de quitosana-poloxamer foram termorreversíveis e apresentaram adequadas propriedades mecânicas e adesivas para aplicação clínica, e quando combinados principalmente com ácido cinâmico, promoveram a redução de biofilmes multiespécies formados nos túbulos dentinários, causando baixa toxicidade em fibroblastos e macrófagos.

Palavras-chave: Cinamatos, Ácidos cafeicos, Anti-infecciosos, Biofilmes, Anti-inflamatórios, Quitosana

General Abstract

Vanessa Rodrigues dos Santos

Santos VR. Antimicrobial and anti-inflammatory effect of phenolic acids, alone, combined and incorporated in chitosan hydrogels for endodontic application [Tese]. Doutorado em Ciência Odontológica, área Saude bucal da criança, Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2022.

General Abstract

The objective of endodontic treatment is to maintain the integrity of the root, as well as to prevent or resolve periapical diseases, by eradicating microorganisms and their sources of nutrients from the root canal system. The complexity of root canal anatomy and multispecies biofilms increases the difficulty in eliminating microorganisms and controlling inflammation by conventional chemical-mechanical procedures, which justifies the use of intracanal medications. New compounds with broad antimicrobial effect and anti-inflammatory potential, such as phenolic acids, could be explored as active principles of intracanal medications. However, to increase the solubility, control the release and extend the biological effects of phenolic acids, it would be interesting to incorporate them into drug carriers such as chitosan hydrogels. This study was divided into two chapters with the following objectives: 1) to evaluate the antimicrobial, antibiofilm and anti-inflammatory activities and the cytotoxicity of cinnamic acid and its derivatives; 2) synthesize and characterize chemical and physico-mechanical properties of thermosensitive chitosan and poloxamer hydrogels containing phenolic acids and evaluate the effect of these hydrogels on multispecies biofilms and on the viability of macrophages and fibroblasts. In chapter 1, the antimicrobial activity of cinnamic acid (CI) and its derivatives coumaric acid (CO), caffeic acid (CA), ferulic acid (FE) and sinapic acid (SI) was evaluated by determining the minimum inhibitory and bactericidal concentration (MIC/MBC) and Fractional Inhibitory Concentration (FIC) on *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces israelii* and *Fusobacterium nucleatum*. Phenolic acids were selected and their effect on bispecies and multispecies biofilms with the same standard or clinical strains were evaluated by bacterial counts, scanning electron microscopy and confocal microscopy. The viability of L929 fibroblasts and RAW 264.7 macrophages in the presence of these phenolic acids was evaluated by resazurin assays. In addition, mRNA levels of the pro-inflammatory markers TNF- α , IL-1 β , iNOS and COX-2 were determined by quantitative

TaqMan PCR after macrophage exposure to phenolic acids and lipopolysaccharide (LPS). In chapter 2, the synthesis and physical-mechanical characterization of chitosan-poloxamer (CPH) hydrogels containing phenolic acids were performed and their effects on multispecies biofilm and on the viability of macrophages and fibroblasts were evaluated. Data were statistically analyzed considering $p < 0.05$. Cinnamic acid and caffeic acid showed an inhibitory and bactericidal effect against all bacterial species tested, with the lowest MIC and MBC values. However, no synergistic effect was observed between the compounds ($FICI > 0.5$). Both compounds (at 5x the highest MIC) were effective in eliminating dual-species biofilms and significantly decreasing multispecies biofilms, especially cinnamic acid. Cinnamic acid caused minimal toxicity to both cell cultures at MIC concentrations and caffeic acid was not cytotoxic at concentrations below 0.125 mg/mL. Both compounds significantly reduced TNF- α , IL-1 β , iNOS and COX-2, in a dose-dependent manner. CPH were characterized as thermoreversible and with adequate mechanical and bioadhesive properties. The effect of CPH+CA (77.8%) and CPH+CI (73.2%) hydrogels against multispecies biofilms was superior to CPH + calcium hydroxide (CH) (53.6%) and CPH + chlorhexidine (CHX) (39.9%). In general, CPH + CI caused less cytotoxicity when compared to CPH + CA, for both cell lines. In conclusion, cinnamic acid and caffeic acid showed bactericidal effect and against biofilms of bacteria associated with endodontic infections, causing minimal cytotoxicity. In addition, both compounds showed an anti-inflammatory effect, inhibiting the expression of pro-inflammatory markers in LPS-stimulated macrophages. The chitosan-poloxamer hydrogels were thermoreversible and presented adequate mechanical and bioadhesive properties for clinical application, and when combined specially with cinnamic acid, they promoted the reduction of multispecies biofilms formed in the dentinal tubules, causing low toxicity to fibroblasts and macrophages.

Keywords: Cinnamates, Caffeic Acids, Anti-infectives, Biofilms, Anti-inflammatories, Chitosan.

Lista de figuras

Vanessa Rodrigues dos Santos

Lista de figuras

Figura 1	Estrutura química do ácido cinâmico e seus derivados hidroxicinâmicos	28
-----------------	---	----

Capítulo 1

Figure 1	Effect of phenolic acids and controls on 2 weeks dual-species biofilms of oral bacteria combined with <i>E. faecalis</i> after 48h of treatment. Graphics represent total bacterial counts in Log CFU/mL+1. Values are presented as means and standard deviations.	50
Figure 2	Representative scanning electron microscopy images of 7 days multispecies biofilms under 1000x magnification. Biofilms were treated for 48 hours with A: Cinnamic acid (CI) - 5 mg/mL; B – Caffeic acid (CA) – 5 mg/mL, C – Calcium hydroxide (CH) – 1 mg/mL, D - CHX - 0.5 mg/mL, and E - Control – Culture medium without antimicrobial agents. F. Mean (SD) of the total bacterial counts detected after 48h of the biofilm treatment with the compounds.	51
Figure 3	Representative confocal microscopy images of bovine root dentin specimens contaminated for 14 days with multispecies biofilms isolated from necrotic human pulps and treated for 48 hours. The groups of the study were: A - Cinnamic acid (CI) - 5 mg/mL; B – Caffeic acid (CA) – 5 mg/mL, C - Calcium hydroxide (CH) – 1 mg/mL, D - CHX - 0.5 mg/mL, and E - Control – Culture medium without antimicrobial agents. F. Mean (SD) of the percentages of dead cells of multispecies biofilms after 48h of treatment with phenolic acids and controls. Bacterial counts were obtained by Image J analysis.	52
Figure 4	Effect of the cinnamic acid (CI) and caffeic acid (CA)	53

and controls calcium hydroxide (CH) and chlorhexidine (CHX) on the viability of fibroblasts (L929) (A) and macrophages (B) after 24h of exposure, using staining with resazurin. Concentrations in mg/mL.

- Figure 5** Effect of cinnamic acid (CI) and caffeic acid (CA) and control dexamethasone (DEX) on the expression of pro-inflammatory cytokines in macrophages (RAW 264.7) after 8 h of exposure to LPS. Concentrations in mg/mL. 54

Capítulo 2

- Figure 1** Continuous rheological behavior of chitosan-poloxamer hydrogels. Empty symbols indicate an upward curve, and full symbols, a downward curve. 76
- Figure 2** Frequency sweep profile of storage modulus G' (opened symbols) and loss modulus G'' (closed symbols) of chitosan-poloxamer hydrogels. (A) Analyzes performed at 25°C, (B) Analyzes performed at 37 °C. 77
- Figure 3** Temperature sweep analyses demonstrating of storage modulus G' (blue symbol) and loss modulus G'' (green symbol) and loss tangent (Tan d) (red symbol) of chitosan-poloxamer hydrogels. 78
- Figure 4** Scanning electron microscopy representative images of chitosan-poloxamer hydrogels. A – 1000x; B – 2.500x and C – 5000x. 79
- Figure 5** Representative confocal microscopy images of bovine root dentin specimens contaminated for 14 days with multispecies biofilms and treated for 48 hours with 80

the following groups with A: Hydrogel (CPH) with cinnamic acid (CI) at 5 mg/mL, B – CPG with caffeic acid (CA) at 5 mg/mL, C – CPG with calcium hydroxide (CH) at 1mg/mL, D – CPG with chlorhexidine (CHX) at 0.5 mg/mL, E – CPH without antimicrobial agents, F - Control – Bacterial growth without antimicrobial agents. G. Mean (SD) of the percentages of dead cells of multispecies biofilms after 48h of treatment with hydrogels and controls. Bacterial counts were obtained by Image J analysis.

Figure 6 Effect of the 48h **(A)** and 7 days **(B)** extracts of chitosan-poloxamer hydrogels (CPH) containing cinnamic acid (CI) or caffeic acid (CA) 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. 81

Figure 7 Effect of the 48h **(A)** and 7 days **(B)** extracts of chitosan-poloxamer hydrogels (CPH) containing cinnamic acid (CI) or caffeic acid (CA) and controls calcium hydroxide (CH) and chlorhexidine (CHX) on the viability of macrophage (RAW 264.7) after 24h of exposure, using staining with resazurin. Concentrations in mg/mL. 82

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Table 1	Flavonols and controls used in the present study.	39
Table 2	Minimal inhibitory concentration - MIC and minimal bactericidal concentration - MBC in mg/mL for the phenolic acids and chlorhexidine against the oral bacteria tested.	48
Tabela 3	Fractional inhibitory concentration (FIC) in mg/mL and FIC index (FICI) for the phenolic acids against the oral bacteria tested.	49

Capítulo 2

Table 1	Flow behavior (n) and consistency index (K), mechanical properties (hardness, compressibility, adhesiveness, and cohesiveness) and bioadhesion in vitro of chitosan-poloxamer hydrogels.	78
----------------	--	----

Lista de abreviaturas

Lista de abreviaturas

<i>A. israelii</i>	<i>Actinomyces israelii</i>
<i>A. odontolyticus</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Staphylococcus pyogenes</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
CFU	Colony Forming Unit
µm	Micrometro
LPS	Lipopolissacarídeo
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
NO	Óxido nítrico
NF-kB	Fator nuclear-kB
min	minuto
s	segundo
TNF-α	Fator de necrose tumoral

h	hora
mM	Micromolar
BHIA	Brain Heart Infusion Agar
µg	Micrograma
mm	Milimetro
mg	Miligrama
ng	Nanograma
g	Gramma
BHI	Brain Heart Infusion
MH	Miller Hinton
mL	Mililitro
IL-6	Interleucina 6
IL-1β	Interleucina 1β
CHX	Chlorexidina digluconate
ROS	Reactive oxygen species
p-CA	Ácido p-cumárico
CI	Cinnamic acid
CA	Caffeic acid
FE	Ferulic acid
SI	Sinapic acid
CO	p-Coumaric acid
MBC	Minimum Bactericidal Concentration
CH	Calcium hydroxide
DEX	Dexamethasone
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
DMSO	Dimethylsulfoxide
qPCR	quantitative PCR
PGE2	Prostaglandinas
L-929	fibroblasts
RAW 264.7	macrophages

Sumário

Vanessa Rodrigues dos Santos

Sumário

Introdução Geral	24
Capítulo 1	34
Abstract	36
Introduction	37
Material and Methods	39
Results	47
Discussion	54
Conclusions	58
References	59
Capítulo 2	66
Abstract	68
Introduction	69
Material and Methods	71
Results	76
Discussion	82
Conclusions	85
References	86
Conclusão Geral	95
Anexo A	98
Anexo B	105
Anexo C	108

Introdução Geral

Vanessa Rodrigues dos Santos

Introdução Geral

O tratamento endodôntico convencional envolve procedimentos de preparo biomecânico (instrumentação associada a irrigantes antimicrobianos) e aplicação de medicação intracanal entre as consultas, seguida pela obturação do canal e restauração do dente (Jena et al., 2015; Haapasalo et al., 2014). O objetivo desse tratamento é manter a integridade da raiz, bem como, prevenir ou resolver doenças periapicais, pela erradicação dos microrganismos e de suas fontes de nutrientes provenientes do sistema de canais radiculares (Young et al., 2007). Embora o tratamento endodôntico convencional reduza significativamente a microbiota presente no interior dos canais radiculares (Siqueira et al., 2007), a permanência de microrganismos devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares e a resistência destes ao tratamento químico-mecânico pode ocasionar infecções persistentes ou secundárias (Siqueira e Rôças, 2009).

A manutenção ou o desenvolvimento de lesões periapicais, após o tratamento endodôntico tem sido atribuído a fatores relacionados com a virulência e capacidade de sobrevivência de algumas espécies de microrganismos no sistema de canais radiculares e/ou tecidos periapicais (Sundqvist et al., 1998; Hancock et al., 2001; Nair et al., 1999; Estrela et al., 2014). Estudos tem revelado que as bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas são mais frequentes nesses casos, incluindo *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp. (*A. israelii* e *A. odontolyticus*), *Propionibacterium* spp., *Lactobacilos* spp., *Enterococcus faecalis*, entre outros (Siqueira e Rôças, 2009). Espécies bacterianas Gram-negativas, comuns nas infecções primárias, também podem permanecer após o tratamento químico-mecânico, como *Fusobacterium nucleatum*, ou ainda liberar a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) da sua membrana externa (Sakamoto et al., 2008).

A persistência de endotoxinas no sistema de canais radiculares pode levar a injúrias nos tecidos periapicais. Isso ocorre porque o LPS estimula a produção de enzimas que induzem o estresse oxidativo, como a iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) que em macrófagos modula a produção de óxido nítrico (NO, *nitric oxide*). Grandes quantidades de NO produzida por iNOS tem sido diretamente relacionada com a patofisiologia de uma variedade de doenças e na inflamação (Marletta, 1993). Além disso, essas endotoxinas aumentam a atividade fagocítica de células polimorfonucleares e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como, fator de

necrose tumoral (TNF- α), interleucinas (IL-1 β , IL-6, entre outras), prostaglandinas (PGE2). A enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) também é induzida por estímulos inflamatórios, como endotoxinas bacterianas e citocinas e está elevada quando há lesão tecidual (Desai et al., 2018). Sabe-se que a resposta inflamatória é uma aliada ao processo de reparo, entretanto, a secreção descontrolada dessas citocinas induz a expressão de ligante do receptor de NF- κ B (RANKL) e a reabsorção óssea (Walsh et al., 2006).

Todas as dificuldades de controlar a infecção e a inflamação nos tecidos periapicais se complicam ainda mais no caso de dentes permanentes imaturos, pois a ampla abertura do forame apical promove ainda mais contato dos produtos bacterianos ou substâncias químicas de uso endodôntico com o tecido vital residual. Isso indubitavelmente terá impacto sobre a bainha epitelial de Hertwig que inibirá sua capacidade de estimular as células indiferenciadas da papila apical em se diferenciar em odontoblastos e continuar a formação radicular (Banchs e Trope, 2004). Embora os tratamentos convencionais frequentemente conduzam à resolução dos sinais e sintomas das patologias pulpares (Sheehy e Roberts, 1997; Bose et al., 2009; Parirokh e Torabinejad, 2010) em dentes permanentes maduros, promovem pouco ou nenhum benefício para a continuidade do desenvolvimento radicular, manutenção da nocicepção pulpar normal e defesa imune esperada para um dente permanente jovem (Diogenes et al., 2013, 2014). A pasta de hidróxido de cálcio é muito utilizada como medicação, em procedimentos de terapia pulpar vital como pulpotomia e em casos de pulpíte irreversível/necrose pulpar. Essa medicação também é indicada para dentes permanentes jovens em procedimentos de apicificação. No entanto, a necessidade de múltiplas sessões de troca da pasta de hidróxido de cálcio leva ao aumento da citotoxicidade do medicamento que interfere na proliferação das células remanescentes e a completa formação das raízes. Como consequência, esses tratamentos convencionais aumentam o risco de reinfecções e de fraturas dentárias nos dentes imaturos (Khoshkhounnejad et al., 2019). A clorexidina (CHX) tem sido recomendada como alternativa de medicação pelo seu amplo potencial antimicrobiano, geralmente associada ao hidróxido de cálcio, para casos de reabsorção radicular e perfuração radicular, porém seu uso é limitado devido à sua alta

citotoxicidade (Gomes et al. 2003; Basrani et al. 2004; Lessa et al. 2010; Vasudeva et al. 2017).

Compostos fenólicos ou polifenólicos são metabólitos secundários produzidos por plantas de grande porte e possuem múltiplas funções essenciais na fisiologia da planta, como na sua defesa contra patógenos e na resposta a condições de estresses ambientais. Além disso, apresentam potencial terapêutico para o organismo humano, principalmente como agentes antimicrobianos, antioxidantes, antialérgicos, anti-inflamatórios, anticâncer, anti-hipertensivos, osteogênica e antiosteoclastogênica (Pietta, 2000; Tripoli et al., 2007; Daglia, 2012). Sua atividade protetora foi atribuída inicialmente às propriedades antioxidantes, neutralizantes de radicais livres, quelantes de metais e a habilidade de inibir ou reduzir a função de diferentes enzimas, como telomerasas, ciclooxigenases, ou lipoxigenases, e recentemente, pela interação com receptores celulares e vias de transdução de sinais (Daglia, 2012).

Dependendo da sua estrutura química, os compostos fenólicos e polifenólicos podem ser classificados em várias classes incluindo os ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, cumarinas, ligninas e taninos (Shahidi & Yeo, 2018). Os ácidos fenólicos são encontrados em fontes naturais, como grãos, sementes, leguminosas e cereais, e formam pontes com macromoléculas como a celulose, hemicelulose e pectina para a construção das estruturas da parede celular da planta. Podem ocorrer em formas conjugadas ou livres. Eles são divididos em dois grupos, os ácidos hidroxibenzóicos, como os ácidos p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico, siríngico e gálico e os ácidos hidroxicinâmicos, incluindo os ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico (Shahidi & Yeo, 2018). Os ácidos hidroxicinâmicos são também moléculas precursoras de polifenóis como estilbenos, chalconas, flavonoides, ligninas e antocianidinas (El-Seedi et al., 2012).

Dentro do grupo dos ácidos fenólicos, os ácidos cinâmicos e seus derivados têm recebido especial atenção dos pesquisadores devido ao seu potencial para aplicação médica, destacando seu amplo espectro antimicrobiano e antifúngico (Guzman, 2014). O termo “cinâmico” é proveniente da especiaria canela (*Cinnamomum zeilanicum*) que vem sendo usada desde a antiguidade como um agente flavorizante e por suas propriedades estimulantes, carminativas, antissépticas e inseticidas. A casca de várias espécies de *Cinnamomum* contém quantidades consideráveis de (E)-cinnamaldeído,

um aldeído volátil responsável pelo sabor pungente e doce da canela. Ácidos cinâmicos também são encontrados em grãos de café, chá, mate, cacau, maçãs e peras, bagas, frutas cítricas, uva, legumes, espinafre, beterraba, alcachofra, batata, tomate, aipo, fava e cereais. Ácidos cinâmicos frequentemente aparecem como conjugados de éster com ácido quínico, conhecidos como ácidos clorogênicos, mas também podem formar ésteres com outros ácidos, açúcares ou lipídios, ou formar amidas com aminas aromáticas e alifáticas (Guzman, 2014). Os derivados naturais dos ácidos cinâmicos mais abundantes na natureza e que tem apresentado considerável potencial antimicrobiano são: ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico. A **figura 1** mostra a estrutura química dos principais derivados do ácido cinâmico ou ácidos hidroxicinâmicos.

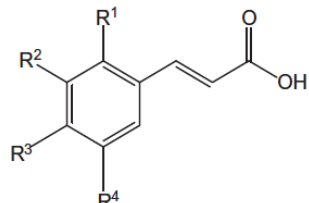
	Ácidos			
	R1	R2	R3	R4
	Fenólicos			
Ácido cinâmico	H	H	H	H
Ácido p-cumárico	H	H	OH	H
Ácido cafeico	H	H	OH	OH
Ácido ferúlico	H	OCH ₃	H	H
Ácido sinápico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figura 1. Estrutura química do ácido cinâmico e seus derivados hidroxicinâmicos

O ácido p-cumárico (p-CA, 4-hydroxycinnamic acid)) é um ácido fenólico da família dos ácidos hidroxicinâmicos, biologicamente sintetizado através da via do chiquimato com fenilalanina e tirosina como precursores (El-Seedi et al., 2012). O p-CA desempenha um papel central no metabolismo secundário, porque pode ser subsequentemente transformado em outros ácidos fenólicos, como por exemplo, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogênico e ácido sinápico, em flavonoides, lignina e outros metabolitos secundários (El-Seedi et al., 2012). O p-CA livre ou ligado é amplamente distribuído em frutos, legumes e cereais. Pesquisas mostraram que esses

ácidos (especialmente quando conjugados) exibem várias bioatividades, incluindo antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, anti-úlceras, anti-plaquetária e atividades anticancerígenas (El-Seedi et al., 2012; Pragasam et al., 2013). O p-CA têm apresentado comparativamente maior potencial antibacteriano que o próprio ácido cinâmico, com amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Estudo mostrou que p-CA rompe a membrana externa das bactérias Gram-negativas aumentando a permeabilidade, além de interagir com o DNA e, portanto, inibindo processos bioquímicos essenciais relacionados aos ácidos nucleicos (Lou et al., 2012).

O ácido cafeico (3,4-Dihydroxycinnamic acid, 3-(3,4-Dihydroxyphenyl) -2-propenoic acid) é um metabólito secundário vegetal da via fenilpropanóide, classificado como um ácido hidroxicinâmico contendo grupos funcionais fenólicos e acrílicos e seus derivados incluem amidas, ésteres, ésteres de açúcar e glicosídeos. Pode ser encontrado em muitos produtos vegetais como bebidas de café, aveia, trigo, arroz e azeite (Fu et al., 2010, Stojković et al., 2014). Tem sido relatado que o ácido cafeico mostrou potencial antimicrobiano e efeito sinérgico com antibióticos contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *M. luteus*, *L. monocytogenes* e *C. albicans* (Cushnie et al., 2005, Loes et al., 2014, dos Santos et al., 2018). A atividade antibacteriana do ácido cafeico contra diferentes cepas de *S. aureus* foi avaliada em um estudo de Kepa et al. (2018) e apresentou valores de CIM de 256 a 1024 µg/mL. O ácido cafeico não teve influência significativa no crescimento de fibroblastos para concentrações entre 0,06 e 1,26 mg/mL (Pinho et al., 2014). Também atua como um inibidor específico do fator nuclear-kB (NF-kB), um fator de transcrição heterodimérico que desempenha um papel central na inflamação (Liang et al., 2015)

O ácido ferúlico (trans-4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid) pertence ao grupo ácido fenólico comumente encontrado em tecidos vegetais (Mattila et al., 2002). O ácido ferúlico é mais comumente encontrado em grãos integrais, espinafre, salsa, uvas, ruibarbo e sementes de cereais, principalmente trigo, aveia, centeio e cevada. Tem apresentado efeito inibitório contra espécies como *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *C. albicans*, com valores de CIM entre 515 e 695 µM (Ergün et

al., 2011; Georgiev et al., 2012). A atividade anti-inflamatória do ácido ferúlico foi determinada, *in vitro*, em modelo de macrófagos THP-1, tanto em repouso (não estimulado) como em modelo inflamatório (por ação de fator de necrose tumoral ou lipopolissacarídeo). Os autores verificaram que o ácido ferúlico limita a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e reduz a liberação de interleucina-1 β e interleucina-6 pró-inflamatórias por macrófagos tratados com lipopolissacarídeos (Szulc-Kielbikl et al., 2017).

O ácido sinápico (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) pode ser encontrado em forma livre, como outros ácidos hidroxicinâmicos e também é encontrado na forma de ésteres. Ésteres hidroxicinâmicos são encontrados como glicosídeos (ésteres de açúcar) ou como ésteres de uma variedade de compostos orgânicos. O ácido sinápico é uma substância identificada em várias frutas, legumes, cereais, oleaginosas, algumas especiarias e plantas medicinais de uma variedade de compostos orgânicos. O ácido sinápico apresentou atividade inibitória contra diversas espécies bacterianas incluindo *S. aureus* e *S. pyogenes* (Georgiev et al., 2012). Também apresentou efeito anti-inflamatório inibindo ROS como radicais hidroxila, superóxido, NO e peroxinitrito (Niciforovic e Abramovic, 2014).

Diversos hidrogéis injetáveis biocompatíveis e biodegradáveis vêm sendo desenvolvidos para aplicações biomédicas com o objetivo de superar as limitações dos produtos naturais, especialmente como veículos terapêuticos. Hidrogéis apresentam uma transição do estado líquido para o gel pela formação de uma rede tridimensional em resposta a estímulo externo, como temperatura ou pH. Particularmente, os hidrogéis termossensíveis submetem-se a uma transição de estado em uma temperatura específica devido o balanço energético das interações hidrofílicas-hidrofóbicas entre as cadeias de polímeros e moléculas de água (Ponce-Vargas et al., 2013; Ramos et al., 2012). Hidrogéis injetáveis termossensíveis podem ser produzidos a partir de quitosana, um polissacarídeo de origem animal obtido da quitina do exoesqueleto de crustáceos, e indicados para aplicações biomédicas. Outro polímero, o poloxamer 407 (mistura de óxido de etileno e óxido de propileno), também foi adicionado ao hidrogel de quitosana, para promover propriedades termorreversíveis e aperfeiçoar a formulação do medicamento, como facilitar a preparação do gel, a solubilização de biomoléculas, prolongando assim o efeito farmacológico (Dumortier et

al., 2006; Giuliano et al., 2018; Yu et al., 2018). Estudos têm demonstrado que a introdução de grupos fenólicos em estruturas de quitosana não somente altera as propriedades estruturais e físico-químicas (solubilidade, estabilidade térmica, cristalinas e propriedades reológicas) da quitosana, mas também aumentam notavelmente suas propriedades antioxidantes, antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, entre outras (Liu et al., 2013; Liu et al., 2017).

Sendo assim, o estudo de novas alternativas de tratamento endodôntico para dentes permanentes imaturos é primordial visando favorecer o aprimoramento e/ou substituição das técnicas e dos materiais já existentes. Dessa forma, esse estudo teve como objetivos avaliar *in vitro* 1) os efeitos antimicrobiano, antibiofilme, citotóxico e anti-inflamatório de ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico e 2) o efeito antibiofilme e a citotoxicidade de hidrogéis termossensíveis de quitosana e poloxamer 407 contendo ácidos fenólicos como proposta de medicação para aplicação endodôntica.

Anexo A**REFERÊNCIAS - INTRODUÇÃO GERAL**

1. Al-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines*. 2018 Jan 3;5(1):2.
2. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol. *J Endod*. 2004; 30(4):196-200.
3. Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of Lipoteichoic Acid Contents and Cultivable Bacteria at the Different Phases of the Endodontic Retreatment. *J Endo*. 2016 Apr;42(4):552-6.
4. Basrani B, Ghanem A, Tjäderhane L. 2004. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. *J Endod*. 30:413-417. doi: 10.1097/00004770-200406000-00009.
5. Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod* 2009; 35:1343–9.
6. Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels *in situ*. *Biomaterials*. 2000; 21:2155–2161.
7. Chenite A, Buschmann M, Wang D, Chaput C, Kandani N. Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. *Carbohydr. Polym*. 2001;46: 39–47.
8. Cushnie TP, Hamilton VE, Chapman DG, Taylor PW, Lamb AJ. Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. *J Appl Microbiol*. 2007 Nov;103;5: 1562-7.
9. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agentes. *Curr Opin Biotechnol*. 2012 Apr;23(2):174-81.
10. Desai SJ, Prickril B, Rasooly A. Mechanisms of Phytonutrient Modulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Inflammation Related to Cancer. *Nutrition and Cancer*, 2018 Apr;70(3), 350–375. doi:10.1080/01635581.2018.1446091.

-
11. Ding RY, Cheung GS, Chen J, Yin XZ, Wang QQ, Zhang CF. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *J Endod.* 2009 May;35(5):745-9.
 12. Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, et al. An update on clinical regenerative endodontics. *Endod Top* 2013; 28:2–23.
 13. Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *J Endod.* 2014; 40(4 Suppl): S52-7.
 14. dos Santos JF, Tintino SR, de Freitas TS, et al. *In vitro* and *in silico* evaluation of the inhibition of efflux pumps of *Staphylococcus aureus* by caffeic and gallic acid. *Comparative Immunology, Microbiology, and Infectious Diseases.* 2018; 57: 22-28.
 15. Douglas TE, Skwarczynska A, Modrzejewska Z, Balcaen L, Schaubroeck D, Lycke S, Vanhaecke F, Vandenabeele P, Dubruel P, Jansen JA, Leeuwenburgh SC. Acceleration of gelation and promotion of mineralization of chitosan hydrogels by alkaline phosphatase. *Int J Biol Macromol.* 2013 May;56:122-32.
 16. Douglas TEL, Pilarek M, Kalaszczynska I, Senderek I, Skwarczynska A, Cuijpers VMJL. 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. El-Seedi HR, El-Said AM, Khalifa SA, Göransson U, Bohlin L, Borg-Karlson AK et al. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *J Agric Food Chem* 2012;60:10877–10895.
 19. Ergün B, Çoban T, Onurdag F, Banoglu E. Synthesis, antioxidant and antimicrobial evaluation of simple aromatic esters of ferulic acid. *Arch. Pharm. Res.* 2011;34:1251–1261.
 20. Estrela C, Holland R, Estrela CR, Alencar AH, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Characterization of successful root canal treatment. *Braz Dent J.* 2014 Jan-Feb; 25(1):3-11.
 21. Fu J, Cheng K, Zhang ZM, Fang RQ, Zhu HL. Analysis of synthesis structures,

-
- structure and structure-activity of caffeic acid amides as antimicrobial potentials. *European Journal of Medical Chemistry*. 2010; 45 (6): 2638-2643.
22. Georgiev L, Chochkova M, Ivanova G, Najdenski H, Ninova M, Milkova T. Radical scavenging and antimicrobial activities of cinnamoyl amides of biogenic monoamines. *Riv. Ital. Sost. Grasse*. 2012;89: 91–102.
23. Giuliano E, Paolino D, Fresta M, Cosco D. Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels: An Overview. *Pharmaceutics*. 2018; 10, 159.
24. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. 2003. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. *Int Endod J*. 36:267-275. doi: 10.1046/j.1365-2591.2003.00634.x.
25. Guzman JD. Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. *Molecules*. 2014 Dec; 19;12: 19292–19349.
26. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J*. 2014; 216:299-303.
27. Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 May; 91; 5:579-86.
28. Huang GC, Chow JM, Shen SC, Yang LY, Lin CW, Chen YC. Wogonin but not Norwogonin inhibits lipopolysaccharide and lipoteichoic acid-induced iNOS gene expression and NO production in macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2007 Aug;7;8: 1054-63.
29. Iglesias-Linares A, Yáñez-Vico RM, Sánchez-Borrego E, Moreno-Fernández AM, Solano-Reina E, Mendoza-Mendoza A. Stemcells in current paediatric dentistry practice. *Arch Oral Biol*. 2013 Mar;58;3: 227-38.
30. Jena A, Sahoo SK, Govind S. Root canal irrigants: a review of their interactions, benefits, and limitations. *Compend Contin Educ Dent*. 2015; 36;4: 256-261.
31. Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod*. 2008 Jul; 34(7):876-87.
32. Kepa M, Mikłasińska-Majdanik M, Wojtyczka RD, Idzik D, Korzeniowski K, Smoleń-Dzirba J, Wąsik TJ. Antimicrobial Potential of Caffeic Acid
-

-
- against *Staphylococcus aureus* Clinical Strains. Biomed Res Int. 2018 Jul 15;2018:7413504.
33. 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 Oct;13(4):514-520.
34. Kim ME, Na JY, Lee JS. Anti-inflammatory effects of trans-cinnamaldehyde on lipopolysaccharide-stimulated macrophage activation via MAPKs pathway regulation. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2018 Jun;40(3):219-224.
35. Lessa FC, Aranha AM, Nogueira I, Giro EM, Hebling J, Costa CA. 2010. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. J Appl Oral Sci. 18:50–58.
36. Liang G , Shi B , Luo W , Yang J . The Protective Effect of Caffeic Acid on Global Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. Behav Brain Funct. 2015 Apr 18;11:18.
37. Lima VN, Oliveira-Tintino CDM, Santos ES, Morais LP, Tintino SR, Freitas TS, et al. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. Microb Pathog. 2016 Oct;99:56-61.
38. Lisková 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 Sep 20;129:135-42.
39. Liu H, Mou Y, Zhao J, Wang J, Zhou L, Wang M, Wang D, Han J, Yu Z, Yang F. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. Molecules. 2010 Nov 5;15;11:7933-45.
40. Liu R, Zhang H, Yuan M, Zhou J, Tu Q, Liu JJ, Wang J. Synthesis and biological evaluation of apigenin derivatives as antibacterial and antiproliferative agents. Molecules. 2013 Sep;18;9: 11496-511.
41. Loes AN, Ruyle L., M. Arvizu, Gresko KE, Wilson AL, Deutch CE. Inhibition of urease activity in the urinary tract pathogen *Staphylococcus saprophyticus*. Cartas em Microbiologia Aplicada. 2014 Jan;58(1):31-41.
42. Lou Z, Wang H, Rao S, Sun J, Ma C, Li J. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. Food Control. 2012 Jun;25: 550–554.
43. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the
-

-
- effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod.* 2011 Oct;37;10:1380-5.
44. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 1993 Jun;268(17):12231-4.
45. Mattila P, Kumpulainen J. Determination of free and total phenolic acids in plant derived foods by HPLC with diode array detection. *J Agric Food Chem.* 2002 Jun;50(13):3660-7.
46. Nair PN, Sjögren U, Figdor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999 May; 87;5: 617-27.
47. Nićiforović N; Abramović H. Sinapic Acid and Its Derivatives: Natural Sources and Bioactivity. *Compreh Rev Food Sci Food Safety.* 2014 Jan;13(1):34-51.
48. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010 Jan;36;1:16-27.
49. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000 Jul;63;7: 1035-42.
50. Pinho E, Ferreira ICFR, Barros L, Carvalho AM, Soares G, Henriques M. Antibacterial potential of northeastern plant extracts from Portugal and their phenolic compounds. *BioMed Research International.* 2014; 2014: 1-8.
51. Ponce-Vargas SM, Cortez-Lemus NA, Licea-Claver A. Preparation of Poly(NVinylcaprolactam) (NVCL) and Statistical Copolymers of NVCL with Variable Cloud Point Temperature by Using A Trithiocarbonate RAFT Agent. *Macromolecular Symposia.* 2013 April;56:325-326.
52. Pragasan SJ, Venkatesan V and Rasool M. Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. *Inflammation.* 2013 Feb;36(1):169-76.
53. Ramos J, Imaz A, Forcada J. Temperature-sensitive nanogels: poly (Nvinylcaprolactam) versus poly(N-isopropylacrylamide). *Polymer Chemistry.* 2012 December;3(4):852.
54. Ribeiro M, Malheiro J, Grenho L, Fernandes MH, Simões M. Cytotoxicity and antimicrobial action of selected phytochemicals against planktonic and sessile *Streptococcus mutans*. *PeerJ.* 2018 Jun;6:e4872.
-

-
55. Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Aug; 23;4:275-81.
 56. Shahidi F, Yeo J. Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review. *Int J Mol Sci.* 2018 May 25;19(6):1573.
 57. Sheehy EC, Roberts GJ. Use of calcium hydroxide for apical barrier formation and healing in non-vital immature permanent teeth: a review. *Br Dent J.* 1997 Oct; 183(7):241-6.
 58. Sidoryk K, Jaromin A, Filipczak N, Cmoch P, Cybulski M. Synthesis and Antioxidant Activity of Caffeic Acid Derivatives. *Molecules.* 2018 Aug 30;23(9):2199.
 59. Siqueira JF Jr, Guimarães-Pinto T, Rôças IN. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. *J Endod.* 2007 Jul; 33;7:800-5.
 60. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009 Nov; 88;11:969-81.
 61. Stojković D, Petrović J, Soković M, Glamočlija J, Kukić-Marković J, Petrović S. Antioxidant and antimicrobial activities in situ of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of Food Science and Agriculture.* 2013 Oct;93(13): 3205-3208.
 62. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jan; 85 (1):86-93.
 63. Szulc-Kielbik I, Kielbik M, Klink M. Ferulic acid but not alpha-lipoic acid effectively protects THP-1-derived macrophages from oxidant and pro-inflammatory response to LPS. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2017 Dec;39;6:330-337.
 64. Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent.* 2007 Jan-Feb; 29;1:47-50.
 65. Tong Z, Zhang Y, Ling J, Ma J, Huang L, Zhang L. An in vitro study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *PLoS One.* 2014 Feb 20;9(2):e89209.

-
66. Tripoli E, Guardia MA, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem* 2007; 104: 466-479.
 67. Vasudeva A, Sinha DJ, Tyagi SP, Singh NN, Garg P, Upadhyay D. Disinfection of dentinal tubules with 2% Chlorhexidine gel, Calcium hydroxide and herbal intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*: An *in-vitro* study. *Singapore Dent J*. 2017 Dec;38:39-44.
 68. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, et al. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24:33-63.
 69. Young GR, Parashos P, Messer HH. The principles of techniques for cleaning root canals. *Aust Dent J*. 2007 Mar;52(1 Suppl):S52-63.
 70. 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 Jul;114:462-469