

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO**  
**Mestrado em Odontologia com Área de Concentração em**  
**Implantodontia**

**Selma Regina Muniz Freitas**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM PARTÍCULAS**  
**DE QUITOSANA COM DIFERENTES NÍVEIS DE RETICULAÇÃO**

**São Paulo**

**2021**

**Selma Regina Muniz Freitas**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM PARTÍCULAS  
DE QUITOSANA COM DIFERENTES NÍVEIS DE RETICULAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia com Área de Concentração em Implantodontia. Orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leticia Cristina Cidreira Boaro.

**São Paulo**

**2021**

**Selma Regina Muniz Freitas**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM PARTÍCULAS  
DE QUITOSANA COM DIFERENTES NÍVEIS DE RETICULAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia com Área de concentração em Implantodontia. Orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Letícia Cristina Cidreira Boaro.

São Paulo, 13 de dezembro de 2021.

Banca Examinadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Letícia Cristina Cidreira Boaro

UNISA – Universidade Santo Amaro

---

Prof. Dr. William Cunha Brandt

UNISA – Universidade Santo Amaro

---

Prof. Dr. Roberto Chaib Stegun

USP – Universidade de São Paulo

Conceito Final: \_\_\_\_\_

F936a Freitas, Selma Regina Muniz.

Avaliação de atividade antibacteriana em partículas de quitosana com diferentes níveis de reticulação / Selma Regina Muniz Freitas. — São Paulo, 2021.

34 f.: il., color.

Dissertação (Mestrado em Odontologia com Ênfase em Implantodontia) — Universidade Santo Amaro, 2021.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leticia Cristina Cidreira Boaro.  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Gonçalves.

1. Quitosana. 2. Reticulação. 3. Atividade antimicrobiana. I. Boaro, Leticia Cristina Cidreira, orient. II. Gonçalves, Flávia, coorient. III. Universidade Santo Amaro. IV. Título.

Ficha elaborada por Fernando Carvalho — CRB8/10122.

*“Dedico este trabalho a Deus,  
que sempre foi o autor da  
minha vida e do meu destino.  
O meu maior apoio nos  
momentos difíceis”*

## *AGRADECIMENTOS*

*A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leticia Cristina Cidreira Boaro para quem não há agradecimentos que cheguem, que ao longo de 5 anos, da graduação até o mestrado, me infectou com o vírus da pesquisa, me ensinou a pensar, ver a perspectiva do professor, do pesquisador e do ser humano. Agradeço pela sua disponibilidade, também pela paciência e por nunca ter largado a minha mão. Foi, e é fundamental na transmissão de experiências, na criação e solidificação de saberes e nos meus pequenos sucessos. Será sempre uma referência em minha vida.*

*Meus sinceros agradecimentos a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Gonçalves por toda sua valiosa contribuição, somando seus conhecimentos essenciais para a realização deste trabalho.*

*A todos os professores que me ensinaram a ser melhor a cada dia, nessa profissão.*

*Aos Professores, que gentilmente aceitaram o convite para fazer parte dessa Banca, fico muito grata.*

*Aos meus colegas de curso pela ajuda, espontaneidade e alegria na troca de informações numa rara demonstração de solidariedade e amizade.*

*Meu muito obrigado a equipe dos Laboratórios da Universidade Santo Amaro – UNISA, que gentilmente auxiliaram, direta ou indiretamente para a realização das etapas experimentais deste trabalho.*

*Ao meu marido Fábio pela parceria, lealdade, compreensão e paciência, obrigada por estar ao meu lado sempre.*

*A minha Carolina, filha querida, por toda a cumplicidade, dedicação, paciência e socorro nas horas de sufoco, meu oráculo das tecnologias, meu tudo.*

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.*

*A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade.*

*“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas”*

*(Carl Sagan)*

## RESUMO

O desenvolvimento de materiais restauradores com atividade remineralizante ou antimicrobiana tem sido uma aspiração na odontologia como um possível caminho para reduzir o risco de cáries secundárias. Essas formulações seriam úteis não apenas para pacientes com alto risco de cárie, mas também para pacientes com necessidades especiais. O objetivo do presente trabalho foi comparar os diferentes níveis de graus de reticulação das partículas de quitosana [0, 8, 16 horas] sobre a mínima concentração necessária destas partículas para inibir o crescimento de *Streptococcus mutans*. Foram obtidas três diferentes partículas, que foram testadas em placa de Elisa (96 poços) em diferentes concentrações e nas quais foi acrescentado o microrganismo *Streptococcus mutans*. A concentração de inibição mínima considerada foi a menor concentração de partícula em que não houver crescimento visível. Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Resultados: As partículas com mais tempo de reticulação apresentou maior MIC (Mínima Concentração Inibitória), e mostrou inibição de biofilme significativamente maior do que o grupo controle. Os outros dois grupos eram semelhantes entre si e o controle de partículas de quitosana / DCPA (fosfato de cálcio dibásico) reticuladas por 16h mostraram uma redução da formação de biofilme em relação ao controle. Conclusão: as partículas de quitosana mais reticuladas precisaram de uma maior concentração para inibir o crescimento de *Streptococcus mutans*.

**Palavras-chave:** quitosana, reticulação, atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

The development of restorative materials with remineralizing or antimicrobial activity has been an aspiration in dentistry as a possible way to reduce the risk of secondary caries. These formulations would be useful not only for patients at high risk of caries, but also for patients with special needs. The aim of this work was to compare the different levels of degrees of reticulation of chitosan particles [0, 8, 16 hours] on the minimum concentration required of these particles to inhibit the growth of *Streptococcus mutans*. Three different particles were obtained, which were tested on Elisa plate (96 wells) at different concentrations and in which the microorganism *Streptococcus mutans* was added. The minimum inhibition concentration considered was the lowest particle concentration in which there was no visible growth. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey test ( $\alpha = 0.05$ ). Results: The particles with longer crosslinking time showed higher MIC (Minimum inhibitory concentration), and the compound containing these particles showed significantly higher biofilm inhibition than the control group. The other two groups were similar to each other and control of chitosan/DCPA crosslinked particles for 16h showed a reduction in biofilm formation in relation to control.

**Keywords:** chitosan, crosslinked, antimicrobial activity.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>16</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS BIOATIVAS .....	17
4.2 MÍNIMA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA .....	19
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	22
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>29</b>
<b>ANEXO A - EFFECTS OF THE CROSSLINKING OF CHITOSAN/DCPA PARTICLES IN THE BIOLOGICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF DENTAL RESTORATIVE COMPOSITES</b> .....	<b>34</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de materiais restauradores com atividade remineralizante ou antimicrobiana tem sido uma aspiração na odontologia restauradora como um possível caminho para reduzir o risco de cáries secundárias (1 Ferracane, 2011; 2 Jandt e Sigusch, 2009; 3 Chen, 2010), que permanece sendo uma das principais causas de falha e substituição de restaurações (4 Rasines Alcaraz et al, 2014; 5 Demarco et al, 2012). Essas formulações seriam úteis não apenas para pacientes com alto risco de cárie, mas também para pacientes com necessidades especiais, como síndrome de Sjögren, pacientes submetidos à radioterapia, da qual a xerostomia é um efeito colateral, e outras situações clínicas (6 Chapple et al, 2017; 7 Kidd, 2013).

A inclusão de agentes antimicrobianos nos compósitos restauradores, atuam diminuindo o crescimento do biofilme, dificultando a adesão do biofilme ou diminuindo a produção de ácido pelas bactérias (8 Raafat e Sahl, 2009; 9 Zang et al, 2017). Os agentes antimicrobianos podem ser incluídos no compósito resinoso de duas maneiras: por imobilização na cadeia polimérica, como os materiais com metacrilatos de aminas quaternárias (10 Imazato et al., 2003; 11 Zhou et al., 2013); e por aprisionamento físico, onde muitas vezes o carregamento de partículas com agentes antimicrobianos ou os agentes antimicrobianos por si próprios são misturados à matriz polimérica (12 Aydin Sevinc e Hanley, 2010; 13 Boaro et al., 2019).

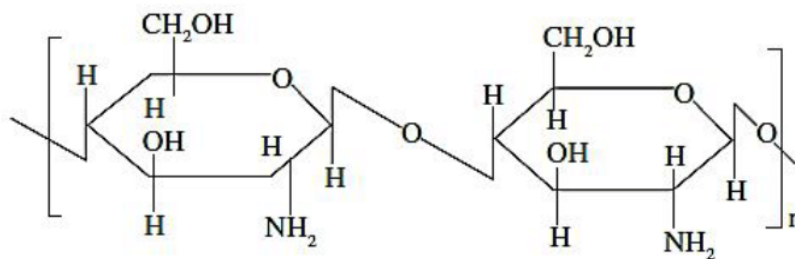
A quitosana é um produto natural, de baixo custo, de fonte renovável e biodegradável, derivada de carapaças de crustáceos (14 Azevedo et al., 2007). As carapaças são resíduos rejeitados pela indústria pesqueira. Sua utilização reduz o acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado diminuindo o impacto ambiental (15 Goosen, 1996).

A Quitosana é biocompatível, auxiliar na proliferação celular e possui atividade antibacteriana por isso, tem sido estudada para variadas aplicações, tais como transportadores de fármacos [carregador], agentes de cicatrização de feridas, agentes quelantes, embalagens de alimentos, etc. (16 Laranjeira e Favere, 2009; 17 Gavhane, Atul e Adhikrao, 2013; 18 Zagar, Asghari e Dashti, 2015).

A quitosana pode ser adicionado aos compósitos resinosos, que é um material natural com propriedades antimicrobianas reconhecidas (19 Kim e Shin, 2013; 20

Tanaka et al., 2020). Selantes oclusais com 1 a 2,5% de quitosana (21 Mahapoka et al., 2012), adesivos dentários apenas com 0,12% quitosana (22 Elsaka, 2012) e resina composta com 2% de quitosana apresentaram atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, sem alteração de força adesiva (22 Elsaka, 2012) ou propriedades mecânicas (19 Kim e Shin, 2013).

**Figura 1** – Estrutura química da quitosana.



Fonte: Spin-Neto, 2008.

A quitosana é uma macromolécula (figura1), a simples mistura na matriz polimérica da resina composta os tornam facilmente aprisionados, porém, por ser solúvel em pH ácido, seu uso na cavidade oral limitaria seu efeito a um curto espaço de tempo, nenhuma avaliação desses materiais a longo prazo foi relatada na literatura. Um estudo mostra, partículas de quitosana pura ou carregadas com fosfato dicálcico dibásico [DCPA] sintetizadas e reticuladas com glutaraldeído antes de serem incorporadas em compósitos experimentais restauradores (20 Tanaka et al., 2020). A reticulação polimérica é um processo que ocorre quando cadeias poliméricas lineares ou ramificadas são interligadas por ligações covalentes, um processo conhecido como *crosslinking* ou ligação cruzada, ou seja, ligações entre moléculas lineares produzindo polímeros tridimensionais com alta massa molar. Com o aumento da reticulação, a estrutura se torna mais rígida (23 Mano e Mendes, 1999; 24 Andrade et al., 2001). Essas partículas reticuladas foram capazes de manter as propriedades mecânicas de 24h até 90 dias e reduzir ligeiramente a adesão ao biofilme. No entanto, a reticulação da quitosana com o glutaraldeído ocorre reagindo ao grupo amina da quitosana com o grupo carbonila do glutaraldeído para formar um grupo imina, conhecido como base de Schiff (25 Malhotra e Basir, 2020). A reticulação com glutaraldeído torna as partículas mais resistentes do ponto de vista físico, químico e microbiológico (26 Beppu, Arruda e Santana, 1999). O glutaraldeído [GA] é um agente reticulante normalmente usado na formação de redes de polipeptídios e proteínas devido à

reatividade dos grupos aldeídos, que prontamente formam bases de Schiff com os grupos amino das proteínas (27 Lin, Yu e Yang, 2006; 28 Rokhade, Patil e Aminabhavi, 2007). O mecanismo de atividade antimicrobiana da quitosana não é completamente elucidado, porém alguns estudos têm apontado que é possível que os grupos de amina primária, positivamente carregados, se ligam a parede bacteriana ou membrana celular, negativamente carregada, alterando a permeabilidade da membrana e causando um dano osmótico ao microrganismo (29 Goy, Britto e Assis, 2009; 30 Parinelli et al., 2018). Portanto, se por um lado a reticulação das partículas de quitosana é vantajosa para manter as propriedades mecânicas a longo prazo, do outro lado; isso pode resultar na diminuição da atividade antimicrobiana.

Fosfato de cálcio vêm sendo extensivamente estudado devido ao seu potencial de liberação de íons, e consequente potencial remineralizador. As primeiras tentativas de incorporar partículas de fosfato de cálcio em resinas de dimetacrilato como fonte iônica para remineralização datam de várias décadas (31 Antonucci, Misra e Peckoo, 1981), mas apenas recentemente cimentos ortodônticos e selantes contendo nano partículas de fosfato de cálcio amorfo [ACP] tornaram-se disponíveis para uso clínico. Estudos recentes mostram que as partículas de fosfato realmente apresentam grande potencial de liberação de íons (32 Chiari et al., 2015; 33 Peetsch et al., 2013; 34 Natale et al., 2017; 35 Rodrigues et al., 2018) e também podem funcionar como agentes remineralizantes.

A atividade antimicrobiana de um material pode ser medida determinando a sua MIC (*Minimum inhibitory concentrations*) ou seja a concentração inibitória mínima que consiste na menor concentração de um material responsável por inibir o crescimento visível de uma bactéria [atividade bacteriostática]. Os valores da MIC dependem do microrganismo, do alvo da infecção e do antibiótico em uso (36 Antimicrobial Therapy and Vaccines, Second Edition, Volume 1: Microbes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 52, Issue 4, October 2003, Page 740).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A necessidade de melhorar as propriedades dos compósitos odontológicos é constante, e um grande número de pesquisas foram feitas para atingir esses objetivos. Os compósitos dentais podem alcançar uma qualidade completamente diferente utilizando novas tendências da ciência dos materiais, como a introdução de nanoestruturas, propriedades antimicrobianas, capacidades de resposta a estímulos, a capacidade de promover a regeneração de tecidos ou reparo de tecidos dentais (2 Ferracane, 2011).

Biomateriais a base de quitosana formam uma classe de materiais com diversas aplicações. Empregados em vários setores, desde a liberação controlada de fármacos até a engenharia de tecido; de forma que a presença da quitosana nos biomateriais tem um grande potencial devido sua versatilidade de aplicações (16 Laranjeira e Favere, 2009).

A quitosana é produzida a partir da desacetilação da quitina, que é derivada de crustáceos e é utilizada em aplicações biomédicas devido à sua alta biocompatibilidade e propriedades antimicrobianas, para a odontologia as propriedades biológicas mais relevantes são: a capacidade antioxidante, antimicrobiana, inibição da formação de biofilmes, anti-inflamatória e cicatrizante (37 Rabea et al., 2003).

Kurita (1997) relatou, que nessa data, a quitosana e seus derivados eram usados em pouca quantidade e em restritas aplicações como: tratamento de água, formulações de xampus e cosméticos e aplicações médicas como suturas cirúrgicas e fibras dietéticas. Porém já se previa o uso da quitosana como agente antimicrobiano, conservante de alimentos e materiais poliméricos biodegradáveis (38).

Kim e Shin (2013) em um estudo avaliaram o efeito antibacteriano e as propriedades mecânicas de resinas compostas [L<sub>CR</sub>, M<sub>CR</sub>, H<sub>CR</sub>] incorporando quitosana com três pesos moleculares diferentes [L, Baixo; M, Médio; H, Alto]. O que resultou em um equilíbrio entre os grupos testados e após 3 semanas sem alteração. Concluiu que quitosana possui efeito antimicrobiano e não influencia na rigidez, afirmando que a quitosana é um excelente material antimicrobiano para ser incorporado à resina composta (19).

O estudo de Hashemi Kamangar et al (2021) mostrou que a incorporação de 1% em peso de nanopartículas de quitosana no selante de fissuras diminuiu a contagem de colônias de todas as três espécies bacterianas testadas no teste de inibição de biofilme em comparação com o grupo controle. Diminuiu significativamente as colônias de *Lactobacillus* em até 30 dias e as colônias de *Streptococcus mutans* e *sanguis* em até 15 dias em comparação com o grupo controle. Portanto, a incorporação de quitosana no selante foi eficaz na indução da atividade antibacteriana (39).

Zheng e Zhu (2003) discutiram que o mecanismo de ação da quitosana na inibição do crescimento bacteriano é baseado na modificação da parede celular bacteriana e na permeabilidade da membrana celular. A adição deste biopolímero à pasta de dente pode impedir a fixação de *Streptococcus mutans* às superfícies dos dentes (40 Zheng e Zhu, 2003). Abedian et al. (2019) descobriram que a quitosana pode inibir o crescimento e a proliferação de *Streptococcus mutans* (41). Além disso, evita a formação de biofilme nas superfícies dos dentes. Costa et al. (2014) avaliaram enxaguatórios bucais contendo quitosana e concluíram que podem diminuir a contagem de *Streptococcus mutans* (42). Chen e Chung (2012) Fujiwara, Hayashi e Ohara (2004) Kawakita et al., (2019) e Cháves de Paz et al., (2011) usaram quitosana dissolvida em água como enxaguatório bucal contra *Streptococcus mutans* e encontraram resultados semelhantes (43, 44, 45, 46). Hayashi et al., (2007) avaliaram o efeito da goma de mascar quitosana sobre *S. mutans* e relataram a inibição do crescimento de *Streptococcus mutans* e redução de sua contagem na saliva após o uso de goma de mascar quitosana (47). No presente estudo, a quitosana diminuiu significativamente a contagem de *Streptococcus mutans*, o que está de acordo com os achados dos estudos mencionados acima (47, 43, 46).

Mahapoka et al. (2012) avaliou o efeito antimicrobiano da quitosana em selantes resinosos contra *Streptococcus mutans*, observando também as propriedades do selante quanto a profundidade de cura, dureza e grau de conversão. Chegando à conclusão que a adição de quitosana em selantes resinosos de uso comercial apresentou propriedades antibacterianas, propriedades físicas aceitáveis comparada ao grupo controle [selante sem quitosana], porém com uma redução nos valores de dureza. Por tanto a quitosana pode ser usada em selantes como uma alternativa antibacteriana para o selamento de fissuras (21).



### 3. OBJETIVO

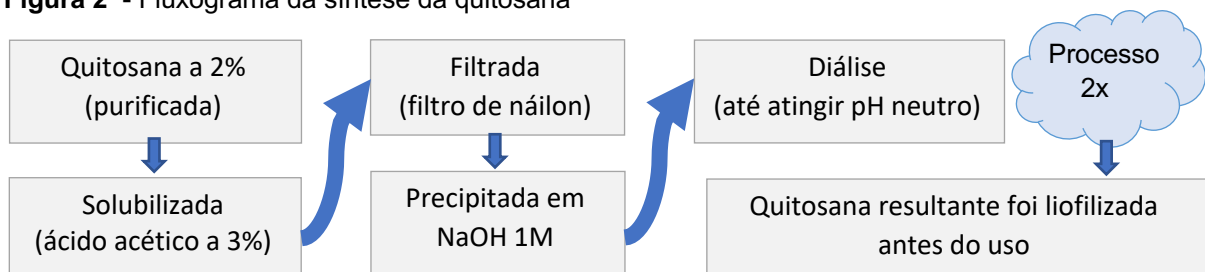
O objetivo do trabalho foi avaliar o grau de reticulação das partículas de quitosana [0, 8, 16 horas] sobre a mínima concentração necessária para inibir o crescimento de *Streptococcus mutans*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Síntese e caracterização de partículas bioativas

A quitosana comercial de alta viscosidade [Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil] foi purificada antes do uso. Resumidamente, a quitosana a 2% foi solubilizada em ácido acético a 3%, filtrada em filtro de náilon e precipitada em NaOH 1M. O precipitado foi submetido à diálise em tubo de diálise com membrana de celulose [ponto de corte: 14.000 Da, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA] até atingir pH neutro. O ciclo foi reproduzido duas vezes e a solução de quitosana resultante foi liofilizada antes do uso. A figura 2 ilustra de maneira simplificada o fluxograma da síntese da quitosana.

**Figura 2** - Fluxograma da síntese da quitosana



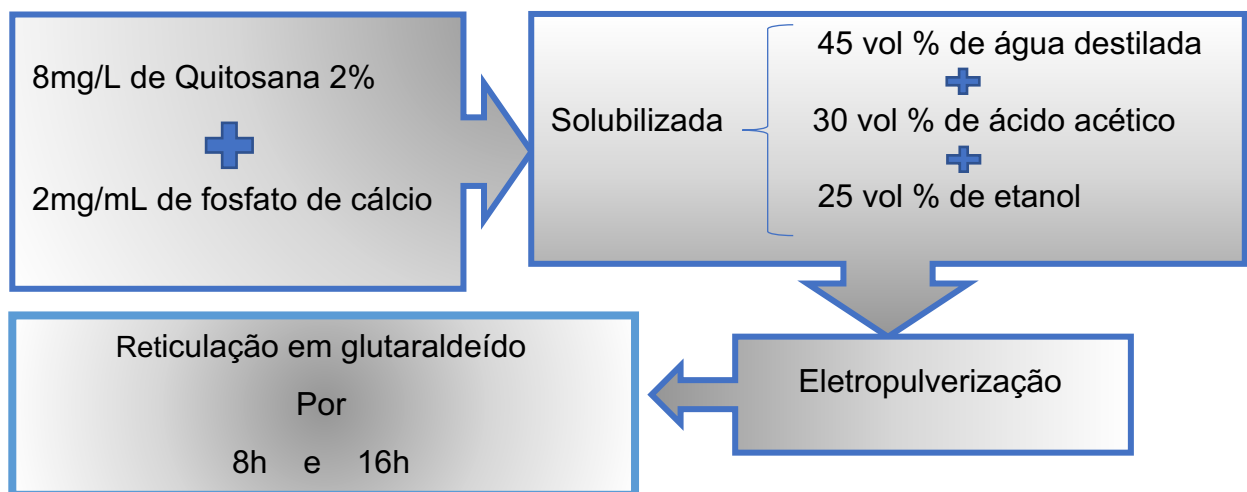
Fonte: O autor (2021)

Para produzir partículas de quitosana carregadas com DCPA, foi utilizado: 8 mg / L de quitosana e 2 mg / mL de fosfato de cálcio dibásico [DCPA], que foram solubilizados em 45 vol% de água destilada, 30 vol% de ácido acético e 25 vol% de etanol. A solução foi submetida a eletropulverização [TL-01, Tong Li Tech, Shenzhen, China] de acordo com os seguintes parâmetros: vazão de 0,25 mL / h, alta tensão de 30 kV e distância entre a agulha e a placa coletora de 18 cm.

As partículas foram reticuladas por imersão em recipiente lacrado com atmosfera saturada de glutaraldeído por 8h e 16h, quanto mais tempo no glutaraldeído mais reticuladas ficam. Assim foram obtidas dois níveis de graus de reticulação: 8h de reticulação, 16h de reticulação. Para o teste foi usado também uma partícula não reticulada [0h], em um total de três partículas diferentes [0h, 8h e 16h]. A figura 3

ilustra de forma simplificada o fluxograma da incorporação e reticulação das partículas de quitosana/DCPA. Imagens de partículas de quitosana / DCPA foram obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura [SEM, FEG 7401F, Jeol, Tokio, Japão] [ampliação x 20000]. Três imagens foram utilizadas para mensurar o tamanho médio das partículas, totalizando 1160 medidas, por meio do software Image J [NIH, Maryland, EUA].

**Figura 3** – Sequência da reticulação das partículas de Quitosana/DCPA



Fonte: O autor (2021)

A reticulação foi monitorada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier [FTIR] usando discos de KBr [Frontier, PerkinElmer, EUA], onde foram obtidos espectros de 4500 a 500nm. O ensaio de ninidrina determinou o grau de reticulação das partículas (48 Kaiser et al., 1970; 49 Torres et al., 2005). Resumidamente, 2 mg de partículas de quitosana / DCPA [n = 3] para cada condição de reticulação foram dispersas em 0,5 mL de solução de ninidrina a 2% e mantidas a 60°C por 20 min.

As amostras foram resfriadas em gelo e centrifugadas a 1200 rpm por 2min. A absorbância da solução a 570 nm foi analisada em espectrofotômetro UV-Vis [ELx800 Biotek, Winooski, EUA]. A absorbância relativa ao grupo controle sem material reticulado foi considerada como a absorbância relativa a um material com todos os

grupos amina disponíveis, e o grau de reticulação foi calculado com base na redução da absorbância em relação ao grupo controle.

Por fim foram obtidas três partículas a serem testadas:

<b>Partículas Obtidas e Testadas</b>	
<b>Partículas de Quitosana/DCPA - 0h</b>	Com fosfato e sem reticulação
<b>Partículas de Quitosana/DCPA – 8h</b>	Com fosfato e reticulada em 8h
<b>Partículas de Quitosana/DCPA – 16h</b>	Com fosfato e reticulado em 16h

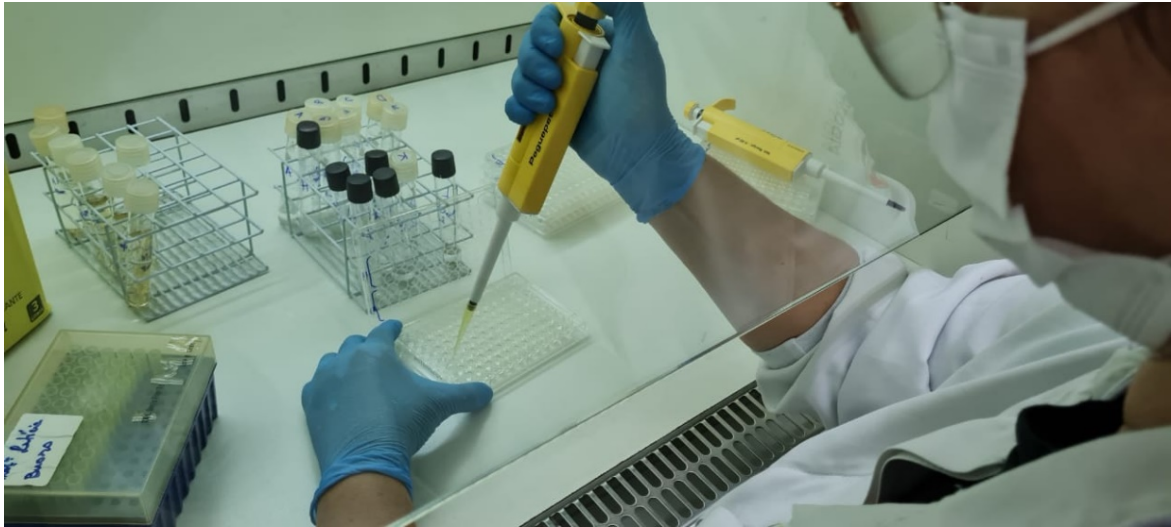
#### **4.2 Mínima Concentração Inibitória**

Todos os testes relacionados a mínima concentração inibitória [MIC] foram realizados nos laboratórios da Universidade Santo Amaro – UNISA.

A mínima concentração inibitória de partículas com diferentes níveis de reticulação foi determinada por sua capacidade de inibir o crescimento visível de *Streptococcus mutans*. Os microrganismos *Streptococcus mutans* foram reativados a partir de culturas estoque em meio BHI [Brain Heart Infusion] por 24h a 37°C, em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram cultivadas em placas de ágar BHI, nas quais as colônias individuais foram removidas e suspensas em solução de NaCl a 0,9%. A suspensão microbiana foi homogeneizada e ajustada para atingir absorbância de 0,135 a 660 nm em espectrofotômetro UV-Vis [MR 96A, Mindray, São Paulo, SP, Brasil], o que equivale a 1-2 x 10<sup>8</sup> UFC / mL (50 Abyadeh, Karimi Zarchi, Faramazi e Amani, 2017; 51 CLSI, 2013). A suspensão microbiana [100µL] foi adicionada em meio BHI [100 mL] para obter uma concentração bacteriana em torno de 1-2 x 10<sup>5</sup> UFC / mL.

A figura 4 mostra a adição do meio de cultura e do inóculo [total de 200µL / poço] em uma placa de 96 poços, juntamente com as partículas de quitosana / DCPA obtidas nas três condições de reticulação, e cultivo por 24h, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

**Figura 4** - Adição de substâncias em placa de 96 poços.

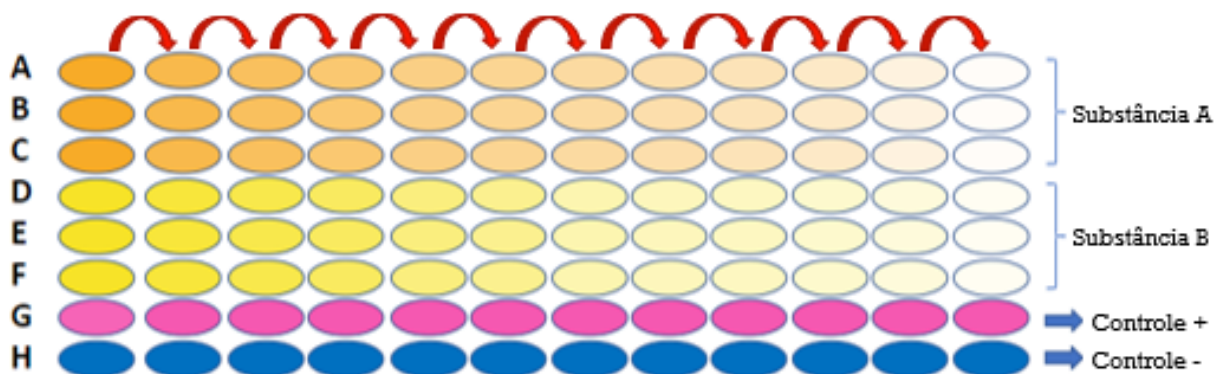


Fonte: O autor (2021)

As partículas foram agitadas e adicionadas em 12 concentrações seriadas [de 50 a 0,02mg / mL] para testar a MIC, em triplicata, para cada condição. Dois grupos controles foram adicionados: um com o meio de cultura mais o inóculo e o outro apenas com o meio de cultura. Na figura 5 podemos observar a exemplificação da diluição seriada em placa de 96 poços.

**Figura 5** – Diluição seriada de 12 concentrações de partículas, sendo realizadas 3 repetições por condição em cada uma das concentrações. Na mesma placa foram cultivados meio de cultura com bactérias sem partículas (n=12 – controle positivo em rosa) e só meio de cultura sem bactérias e sem partículas (n=12 – controle negativo em azul).

### Diluição seriada



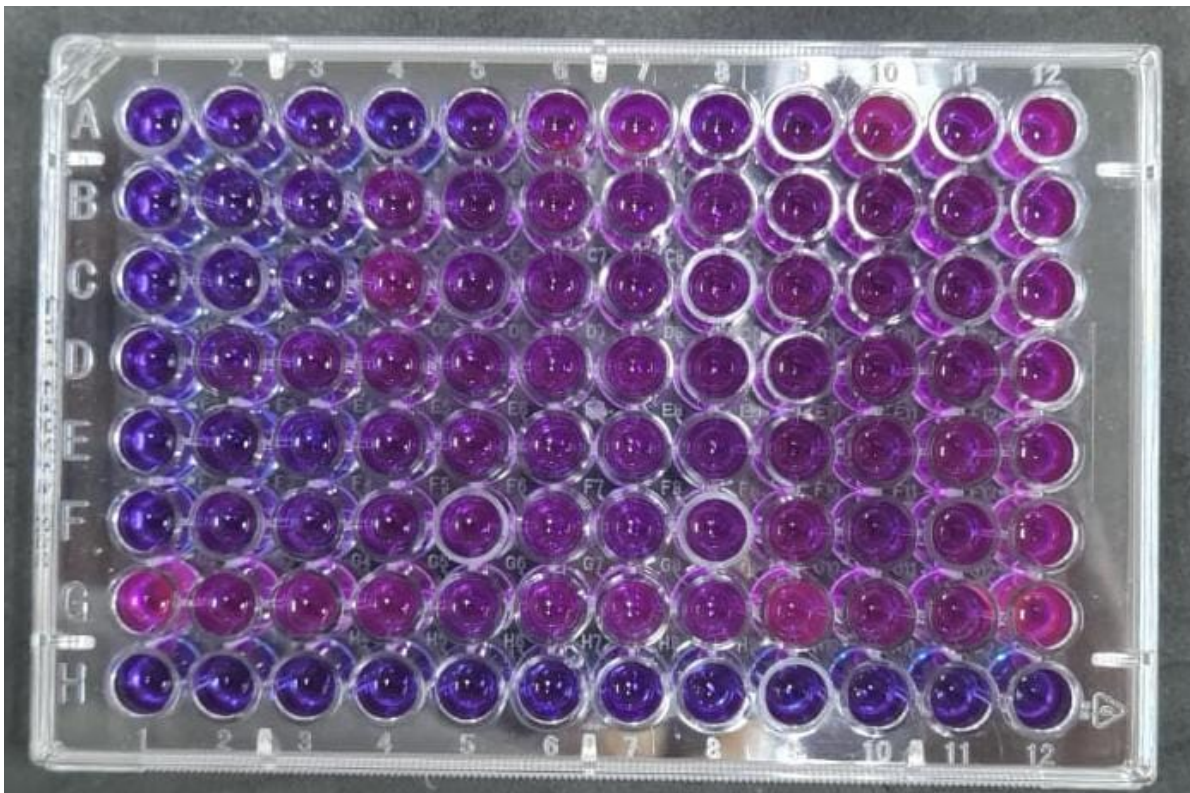
Fonte: O autor (2021)

Essa placa de 96 poços, foi incubada por 24h a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, após as 24h de incubação, a absorbância da placa com as soluções foi lida a 660 nm em leitor de Elisa, após essa primeira leitura, 30 µL de resazurina foram adicionados em cada poço, como mostra a figura 6 e incubados a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 2h quando a absorbância da solução foi relida a 570 nm em leitor de Elisa.

A MIC foi determinada de acordo com a ausência de diferença estatística da amostra para o grupo controle apenas com o meio de cultura e diferença significativa em relação ao grupo controle com o inóculo.

Todo o trabalho de reativação da bactéria de estoque, diluição das substâncias, preparação dos meios de cultura, confecção de MIC, incubação e leitura das placas foi realizado nos laboratórios da Universidade Santo Amaro – Unisa.

**Figura 6** – Exemplo de um placa de 96 poços corada com resazurina.



Fonte: O autor (2021)

### 3.3 Análise estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade [teste de Kolmogorov-Smirnov] e homocedasticidade [teste de Levene] para todas as variáveis estudadas. Os dados foram submetidos à ANOVA de fator único com nível de significância de 95% [ $\alpha = 0,05$ ].

Para cada condição experimental, foram testadas 12 concentrações de partículas, sendo realizadas 3 repetições por condição em cada uma das concentrações. Na mesma placa foram cultivados meio de cultura sem bactérias e sem partículas [n=12 – controle positivo] e meio de cultura com bactérias sem partículas [n=12 – controle negativo].

Para cada condição experimental, os dados foram submetidos a ANOVA de fator único e Teste de Tukey [ $\alpha=0,05$ ], comparando as 12 concentrações testadas [n=3] com o grupo controle sem bactéria [n=12] e com o grupo controle com bactérias [n=12]. Para cada condição experimental, após a análise estatística, foram consideradas tendo um efeito antimicrobiano todas as concentrações que estatisticamente foram iguais ao controle positivo [meio sem bactéria e sem partículas] e diferente do controle negativo [meio com bactéria e sem partículas]. Dentre as 12 concentrações estudadas e avaliadas a menor concentração a apresentar estatisticamente um efeito antimicrobiano foi considerada a concentração inibitória mínima para aquele grupo experimental. Para cada grupo experimental foi realizada uma análise estatística separada. Os grupos controles utilizados foi o que se encontravam na mesma placa que o grupo experimental em questão.

## 5. RESULTADOS

O quadro 1 mostra uma representação das placas obtidas, juntamente com os valores das leituras de absorbância e das concentrações das partículas de quitosana. Na intersecção da coluna 1 com as linhas A, B e C [em triplicado] 180µl de meio de cultura + 20µl de partículas de quitosana sem reticulação 0h + 100 µl de inóculo bacteriano; na mesma coluna e nas linhas D, E e F não foi incluída nenhuma substância, linha G temos 100µl de meio de cultura + 100µl de inóculo bacteriano – controle positivo e na linha H temos 200µl de meio de cultura – controle negativo. As células coloridas de azul representam inatividade bacteriana, e as células em rosa representam atividade bacteriana.

**Quadro 1** - Representação das placas usadas para determinar a MIC. Onde mostra os valores das leituras de absorbância obtidas no leitor de Elisa com as concentrações das partículas utilizadas. As células coloridas de azul representam inatividade bacteriana, e as células em rosa representam atividade bacteriana.

MIC Quitosana													
Composição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Concentração QCP	50mg /mL	25mg /mL	12.5 mg/mL	6.25 mg/mL	3.125 mg/mL	1.562 mg/mL	0.781 mg/mL	0.391 mg/mL	0.195 mg/mL	0.098 mg/mL	0.049 mg/mL	0.024 mg/mL	
<b>A</b> Meio+bact+QCP a 0h (sem reticulação)	0.263	0.265	0.274	0.274	0.267	0.293	0.321	0.396	0.440	0.459	0.560	0.443	
<b>B</b> Meio+bact+QCP a 0h (sem reticulação)	0.298	0.269	0.267	0.274	0.260	0.304	0.421	0.434	0.459	0.450	0.633	0.510	
<b>C</b> Meio+bact+QCP a 0h (sem reticulação)	0.290	0.278	0.275	0.280	0.296	0.360	0.440	0.403	0.429	0.473	0.476	0.496	
<b>D</b>													
<b>E</b>													
<b>F</b>													
<b>G</b> Meio de Cultura + bact.	0.594	0.505	0.551	0.506	0.487	0.477	0.520	0.494	0.646	0.526	0.496	0.592	
<b>H</b> Só Meio de cultura	0.244	0.250	0.245	0.244	0.242	0.242	0.298	0.242	0.245	0.238	0.245	0.237	

Fonte: O autor (2021)

No quadro 2 apresentado, temos uma representação das placas obtidas, juntamente com os valores das leituras de absorvância e das concentrações das partículas de quitosana com diferentes tempos de reticulação. As placas foram feitas em triplicata, ou seja, foram repetidas 3 vezes por partícula, em dias diferentes das placas de partícula sem reticulação, para evitar interferências bacteriana. Nesse quadro temos, na intersecção da coluna 1 com as linhas A, B e C [em triplicado] 180µl de meio de cultura + 20µl de partículas de quitosana reticulada em 8h + 100µl inóculo bacteriano; na mesma coluna e nas linhas D, E e F [em triplicado], 180µl de meio de cultura + 20µl partículas de quitosana reticulada em 16h + 100µg de inóculo bacteriano e duas linhas de controle, linha G temos 100µl de meio de cultura + 100µl de inóculo bacteriano – controle positivo e na linha H temos 200µl de meio de cultura – controle negativo. As células coloridas de azul representam inatividade bacteriana, e as células em rosa representam atividade.

**Quadro 2** - Representação das placas usadas para determinar a MIC. Onde mostra os valores das leituras de absorvância obtidas no leitor de Elisa, com as concentrações utilizadas. As células coloridas de azul representam inatividade bacteriana, e as células em rosa representam atividade bacteriana.

MIC Quitosana												
Composição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentração QCP	50mg /mL	25mg /mL	12.5 mg/mL	6.25 mg/mL	3.125 mg/mL	1.562 mg/mL	0.781 mg/mL	0.391 mg/mL	0.195 mg/mL	0.098 mg/mL	0.049 mg/mL	0.024 mg/mL
<b>A</b> Meio+ bact.+ QCP- a 8h retic. grad.	0.321	0.374	0.276	0.370	0.365	0.424	0.475	0.389	0.408	0.456	0.484	0.454
<b>B</b> Meio+ bact.+ QCP- a 8h retic. grad.	0.262	0.293	0.421	0.352	0.356	0.459	0.389	0.456	0.431	0.455	0.530	0.452
<b>C</b> Meio+ bact.+ QCP- a 8h retic. grad.	0.288	0.310	0.304	0.333	0.381	0.411	0.449	0.425	0.543	0.485	0.503	0.497
<b>D</b> Meio+ bact.+ QCP- a 16h retic. grad.	0.329	0.378	0.350	0.496	0.412	0.523	0.522	0.696	0.478	0.480	0.478	1.568
<b>E</b> Meio+ bact.+ QCP- a 16h retic. grad.	0.302	0.303	0.537	0.329	0.565	0.526	0.713	0.512	0.512	0.529	0.476	0.455
<b>F</b> Meio+ bact.+ QCP- a 16h retic. grad.	0.323	0.277	0.373	0.485	0.458	0.454	0.551	0.557	0.438	0.438	0.500	0.507
<b>G</b> Meio+ bact.	0.501	0.494	0.510	0.527	0.545	0.533	0.540	0.608	0.488	0.523	0.519	0.535
<b>H</b> Só Meio de cultura	0.244	0.250	0.245	0.244	0.242	0.242	0.298	0.242	0.245	0.238	0.245	0.237

Fonte: O autor (2021)

Os valores de absorvância para cada partícula foram comparados aos valores de absorvância na mesma concentração, porém na linha que continha apenas meio de cultura+bactéria e na linha que continha apenas meio de cultura. Para ser considerado como concentração capaz de inibir o crescimento o valor de absorvância precisava ser estatisticamente semelhante a leitura do meio apenas, e estatisticamente diferente da leitura do meio+bactéria. Isso foi feito com o intuito de eliminar qualquer interferência do meio na leitura da absorvância. O valor de MIC obtidos para cada uma das partículas, considerando o critério estatístico descrito, é apresentado na tabela 1.

**Tabela 1** - O valor de MIC obtidos para cada uma das partículas, considerando o critério estatístico descrito, em cultura de *Streptococcus mutans*, de partícula de quitosana/DCPA com diferentes tempos de reticulação.

<b>Partículas de acordo com o tempo de reticulação</b>	<b>MIC [mg/ml]</b>
Quitosana/DCPA - 0h	1,6
Quitosana/DCPA - 8h	6,3
Quitosana/DCPA - 16h	25,0

Fonte: O autor (2021)

## 6. DISCUSSÃO

O estudo possibilitou a análise da reticulação de partículas de quitosana, evidenciando a importância dos diferentes tempos de reticulação das partículas para a inibição do crescimento bacteriano.

A reticulação das cadeias poliméricas da quitosana visa unir as cadeias poliméricas ou ligar suas cadeias a outros polímeros gerando redes poliméricas híbridas (52 Berger et al., 2004). Essas reações visam modificar propriedades do biopolímero, como, estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, cor, eficiência em quelação e capacidade de imobilização proteica e celular (53 Neto, Dantas e Fonseca, 2005; 54 Gonçalves e Araujo, 2011).

A aplicação do produto final justifica a realização da reticulação da quitosana, tais como, a fabricação de adsorventes e de resinas de pré-concentração que requer biopolímeros resistentes a meios ácidos (55 Beppu, Arruda, Vieira e Santos, 2004; 54 Gonsalves e Araujo, 2011); o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos que necessitam de matrizes permeáveis à água e funcionem como carregador e as libere de forma controlada (53 Neto, Dantas e Fonseca, 2005), mantendo o máximo das funções e atividades desses materiais, fatos que a quitosana reticulada é capaz de proporcionar (56 Martín, Picciolato e Heras, 1998; 54 Gonsalves e Araujo, 2011).

O aumento dos valores de MIC após o aumento da reticulação de partículas de quitosana também foi observado em um estudo no qual partículas de quitosana de diferentes pesos moleculares sob vários graus de reticulação com Tri-poli-fosfato [TPP] foram avaliadas contra *S. aureus*, *E. Coli* e *C. albicans* (57 Pan et al., 2020). Na reticulação com o glutaraldeído, assim como com o TPP, parte dos grupos amina é consumida, ficando indisponível para interagir com o microrganismo, diminuindo o efeito antibacteriano (29, 30, 58) com consequente aumento dos valores de MIC. Na literatura, os níveis de quitosana de MIC contra *S. mutans* variam de 0,114 µg / mL a 2 mg / mL (59,60), dependendo da formulação da quitosana [partículas, solução, hidrogel], peso molecular, cepa bacteriana, e outros fatores (59 Resende et al., 2019; 60 Pasquantonio et al., 2008). Esses níveis de MIC estão de acordo com os observados para as partículas não reticuladas de quitosana / DCPA no presente estudo. Outro estudo avalia a MIC das partículas de quitosana em relação ao

*Streptococcus mutans* (61 Maghsoudi et al., 2017), e observou níveis cerca de 10 vezes menores que o presente estudo. Provavelmente essa diferença se deve principalmente ao tamanho das partículas, visto que, neste estudo, as partículas avaliadas têm tamanho médio de 122 nm enquanto, naquele, as nanopartículas de quitosana apresentaram 66 nm. Na verdade, o aumento no tamanho das partículas tem sido relacionado ao aumento dos valores de MIC ou da atividade antimicrobiana de alguns microrganismos (62 Sarwar, Katas e Zin, 2014).

Diferentemente do esperado, as partículas com maior grau de reticulação desenvolveram o maior efeito antimicrobiano, mesmo apresentando uma maior MIC, sendo o único material a reduzir significativamente o biofilme em relação ao controle. Provavelmente, dois fatores contribuem para esse desempenho. Primeiramente, essas partículas apresentam o maior potencial zeta dos grupos estudados, estando acima de 30mV, o que promove menor aglomeração das partículas e melhor dispersão na matriz. Em segundo lugar, o aumento da reticulação diminui a porosidade das partículas e o inchaço no interior das partículas, que passa a ser seu núcleo com menor polaridade, melhorando sua dispersão na matriz polimérica hidrofóbica composta por BisGMA / TEGDMA. Dessa forma, ambos os fatores aumentam a área superficial de partículas disponíveis para atuar como sítios de atividade antimicrobiana. Na verdade, em um estudo anterior, foi apontado que essas partículas reticuladas não são capazes de lixiviar o material; portanto, todo o efeito antimicrobiano ocorre pelo contato direto com a bactéria (20 Tanaka et al., 2020). Por outro lado, as partículas sem reticulação apresentaram menor potencial zeta [abaixo de 30mV], o que favorece a agregação, diminuindo a dispersão das partículas e a área superficial disponível para atividade antimicrobiana.

As partículas de quitosana mais reticuladas precisaram de uma maior concentração para inibir o crescimento de *Streptococcus mutans*. Sendo necessário mais estudos para aprimorar o conhecimento.

## 7. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as partículas de quitosana mais reticuladas precisaram de uma maior concentração para inibir o crescimento do *Streptococcus mutans*.

## REFERÊNCIAS

1. Ferracane JL. Resin composite--state of the art. *Dent Mater.* 2011;27(1):29-38.
2. Jandt KD, Sigusch BW. Future perspectives of resin-based dental materials. *Dent Mater.* 2009;25(8):1001-6.
3. Chen MH. Update on dental nanocomposites. *J Dent Res.* 2010;89(6):549-60.
4. Rasines Alcaraz MG, Veitz-Keenan A, Sahrman P, Schmidlin PR, Davis D, Iheozor-Ejirofor Z. Direct composite resin fillings versus amalgam fillings for permanent or adult posterior teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014(3):CD005620.
5. Demarco FF, Correa MB, Cenci MS, Moraes RR, Opdam NJ. Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials. *Dent Mater.* 2012;28(1):87-101.
6. Chapple IL, Bouchard P, Cagetti MG, Campus G, Carra MC, Cocco F, et al. Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2017;44; Suppl 18:S39-S51.
7. Kidd, E. and O. Fejerskov, Changing concepts in cariology: forty years on. *Dent Update*, 2013. 40(4): p. 277-8, 280-2, 285-6.
8. Raafat D, Sahl HG. Chitosan and its antimicrobial potential--a critical literaturesurvey. *Microb Biotechnol.*, 2009;2(2):186-201.
9. Zhang N, Ma Y, Weir MD, Xu HHK, Bai Y, Melo MAS. Current Insights into the Modulation of Oral Bacterial Degradation of Dental Polymeric Restorative Materials. *Materials (Basel)*, 2017;10(5).
10. Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S, Tay FR. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. *Dent Mater*, 2003;19(4):313-9.
11. Zhou C, Weir MD, Zhang K, Deng D, Cheng L, Xu HH. Synthesis of new antibacterial quaternary ammonium monomer for incorporation into CaP nanocomposite. *Dent Mater.*, 2013;29(8):859-70.
12. Aydin Sevinc B, Hanley L. Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, 2010;94(1):22-31.
13. Boaro LCC, Campos LM, Varca GHC, Dos Santos TMR, Marques PA, Sugii MM, et al. Antibacterial resin-based composite containing chlorhexidine for dental applications. *Dent Mater.*, 2019;35(6):909-18.

14. Azevedo, V. V. C.; Chaves, S.A.; Bezerra, D.C.; Lia Fook, M.V.; Costa, A.F.M.; Chitin and Chitosan: applications as biomaterials. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* / ISSN 1809-8797 / v.2.3 (2007) 27-34
15. Goosen, M.E.A – “Applications of chitin and chitosan” Technomic Publishing Company, Lancaster (1996)
16. Laranjeira, M.C.M.; Favere, V.T. Chitosan: functional byopolymer with biomedical industrial potential. *Química Nova*, v. 32, n. 3, 0. 672-678, 2009.
17. Gavhane, Y.; Atul, G.; Adhikrao, Y. Chitosan and its applications: a review of literature. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, v. 4, n. 1, p. 312-331, 2013.
18. Zagar, V.; Asghari, M.; Dashti, A. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng Reviews*, v. 2, p. 204-226, 2015.
19. Kim JS, Shin DH. Inhibitory effect on *Streptococcus mutans* and mechanical properties of the chitosan containing composite resin. *Restor Dent Endod.*, 2013;38(1):36-42.
20. Tanaka CB, Lopes DP, Kikuchi LNT, Moreira MS, Catalani LH, Braga RR, et al. Development of novel dental restorative composites with dibasic calcium phosphate loaded chitosan fillers. *Dent Mater.*, 2020;In press.
21. Mahapoka E, Arirachakaran P, Watthanaphanit A, Rujiravanit R, Poolthongs S. Chitosan whiskers from shrimp shells incorporated into dimethacrylate based dental resin sealant. *Dental Materials Journal.*, 2012;31(2):273-9.
22. Elsaka SE. Antibacterial activity and adhesive properties of a chitosan-containing dental adhesive. *Quintessence Int.*, 2012;43(7):603-13.
23. Mano, E. B.; Mendes, L. C. *Introdução A Polímeros São Paulo: Edgar Blücher*, 1999. Isbn 8521202474.
24. Andrade, C. T.; Coutinho, F. M. B.; Dias, M. L.; Lucas, E. F.; Oliveira, C. M. F.; Tabak, D. *Dicionário De Polímeros. Interciência*, 2001. Isbn 857193052x.)
25. Malhotra I, Basir Sf. Application Of Invertase Immobilized On Chitosan Using Glutaraldehyde Or Tris(Hydroxymethyl)Phosphine As Cross-Linking Agent To Produce Bioethanol. *Appl Biochem Biotechnol.*, 2020;191(2):838-51
26. Beppu, M. M.; Arruda, E. J.; Santana, C. C.; Synthesis and Characterization of Dense Structures and Chitosan porous. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **1999**, 4, 163-169

27. Lin, W. C., Yu, D. G., & Yang, M. C. (2006). Blood compatibility of novel poly ( $\gamma$ -glutamic acid)/polyvinyl alcohol hydrogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 47(1), 43-49.
28. Rokhade, A. P., Patil, S. A., & Aminabhavi, T. M. (2007). Synthesis and characterization of semi-interpenetrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir. *Carbohydrate Polymers*, 67(4), 605-613.
29. Goy RC, Britto D, Assis OBG. Review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 2009;19(3):241-7.
30. Perinelli DR, Fagioli L, Campana R, Lam JKW, Baffone W, Palmieri GF, et al. Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *Eur J Pharm Sci.*, 2018;117:8-20.
31. Antonucci JM, Misra DN, Peckoo RJ. The accelerative and adhesive bonding capabilities of surface-active accelerators. *J Dent Res.* 1981;60(7):1332-42
32. Chiari MD, Rodrigues MC, Xavier TA, de Souza EM, Arana-Chavez VE, Braga RR. Mechanical properties and ion release from bioactive restorative composites containing glass fillers and calcium phosphate nano-structured particles. *Dent Mater.* 2015;31(6):726-33.
33. Peetsch A, Greulich C, Braun D, Stroetges C, Rehage H, Siebers B, et al. Silver-doped calcium phosphate nanoparticles: synthesis, characterization, and toxic effects toward mammalian and prokaryotic cells. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;102:724-9.
34. Natale LC, Alania Y, Rodrigues MC, Simoes A, de Souza DN, de Lima E, et al. Synthesis and characterization of silver phosphate/calcium phosphate mixed particles capable of silver nanoparticle formation by photoreduction. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;76:464-71.
35. Rodrigues MC, Chiari MDS, Alania Y, Natale LC, Arana-Chavez VE, Meier MM, et al. Ion-releasing dental restorative composites containing functionalized brushite nanoparticles for improved mechanical strength. *Dent Mater.* 2018;34(5):746-55.
36. Antimicrobial Therapy and Vaccines, Second Edition, Volume 1: Microbes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 52, Issue 4, October 2003, Page 740.
37. Rabea E. I., Badawy M. E., Stevens C. V., Smaghe G., Steurbaut W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4:1457–1465
38. Kurita K. Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Sfablifty* 59, 17-20, 1997.

39. Hashemi Kamangar, S. S., Zareian, H., Bahador, A., Pourhajibagher, M., Bashareh, Z., & Valizadeh, S. (2021). Evaluation of Antibacterial Effects of Fissure Sealants Containing Chitosan Nanoparticles. *International journal of dentistry*, 2021, 8975948.
40. Zheng, L. Y., & Zhu, J. F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate polymers*, 54(4), 527-530.
41. Abedian Z, Jenabian N, Moghadamnia AA, Zabihi E, Tashakorian H, Rajabnia M. et al. Antibacterial activity of high-molecular-weight and low-molecular-weight chitosan upon oral pathogens. *J Conserv Dent*. 2019;22(2):169–74. doi: 10.4103/JCD.JCD\_300\_18
42. Costa EM, Silva S, Madureira AR, Cardelle-Cobas A, Tavaría FK, Pintado MM. A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation in vitro. *Carbohydr Polym*. 2014;101:1081–6. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.09.041
43. Chen CY, Chung YC. Antibacterial effect of water-soluble chitosan on representative dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli brevis*. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(6):620–7. doi: 10.1590/S1678-77572012000600006
44. Fujiwara M, Hayashi Y, Ohara N. Inhibitory effect of water-soluble chitosan on growth of *Streptococcus mutans*. *New Microbiol*. 2004;27(1):83–6
45. Kawakita ER, Ré AC, Peixoto MP, Ferreira MP, Ricomini-Filho AP, Freitas O. et al. Effect of chitosan dispersion and microparticles on older *Streptococcus mutans* biofilms. *Molecules*. 2019;24(9):1808. doi: 10.3390/molecules24091808.
46. Chávez de Paz LE, Resin A, Howard KA, Sutherland DS, Wejse PL. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on *Streptococcus mutans* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(11):3892–5. doi: 10.1128/AEM.02941-10.
47. Hayashi Y, Ohara N, Ganno T, Yamaguchi K, Ishizaki T, Nakamura T. et al. Chewing chitosan-containing gum effectively inhibits the growth of cariogenic bacteria. *Arch Oral Biol*. 2007;52(3):290–4. doi: 10.1016/j.archoralbio.2006.10.004.
48. Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem*. 1970;34(2):595-8.
49. Torres MA, Vieira RS, Beppu MM, Santanta CC. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 2005;15(4):306-12.
50. Abyadeh M, Karimi Zarchi AA, Faramarzi MA, Amani A. Evaluation of Factors Affecting Size and Size Distribution of Chitosan-Electrosprayed Nanoparticles. *Avicenna J Med Biotechnol.*, 2017;9(3):126-32.

51. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute Standards Development Policies and Process, 2013.
52. Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R.; Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57*, 19.
53. Neto, C. G. T.; Dantas, T. N. C.; Fonseca, J. L. C.; Permeability studies in chitosan membranes. Effects of crosslinking and poly (ethylene oxide) addition. Pereira, M. R.; *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2630.
54. Gonsalves, A.A.; Araujo, C.R.M. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. *Química Nova*, v.34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.
55. Beppu, M. M.; Arruda, E. J.; Vieira, R. S.; Santos, N. N.; Adsorption of Cu (II) on porous chitosan membranes functionalized with histidine. *J. Membr. Sci.* **2004**, *240*, 227
56. Martín, A. B.; Picciolato, M.; Heras, A.; Coimmobilization of enzymes and cells on chitosan and derivatives. *Prog. Biotechnol.* **1998**, *15*, 679
57. Pan C, Qian J, Zhao C, Yang H, Zhao X, Guo H. Study on the relationship between crosslinking degree and properties of TPP crosslinked chitosan nanoparticles. *Carbohydr Polym.*, 2020;241:116349.
58. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol.*, 2010;144(1):51-63.
59. Resende AHM, Farias JM, Silva DDB, Rufino RD, Luna JM, Stamford TCM, et al. Application of biosurfactants and chitosan in toothpaste formulation. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019;181:77-84.
60. Pasquantonio G, Greco C, Prenna M, Ripa C, Vitali LA, Petrelli D, et al. Antibacterial activity and anti-biofilm effect of chitosan against strains of *Streptococcus mutans* isolated in dental plaque. *Int J Immunopathol Pharmacol.*, 2008;21(4):993-7.
61. Maghsoudi A, Yazdian F, Shahmoradi S, Ghaderi L, Hemati M, Amoabediny G. Curcumin-loaded polysaccharide nanoparticles: Optimization and anticariogenic activity against *Streptococcus mutans*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, 2017;75:1259-67.
62. Sarwar A, Katas H, Zin NM. Antibacterial effects of chitosan–tripolyphosphate nanoparticles: impact of particle size molecular weight. *J Nanopart Res.*, 2014;16:e2517.

**ANEXO A** - Effects of the crosslinking of chitosan/DCPA particles in the biological and mechanical properties of dental restorative composites. (Artigo submetido, não publicado)