

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E EFEITO
INIBITÓRIO DA SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
DE QUITOSANA NA ADERÊNCIA E NO BIOFILME
MADURO DE *Streptococcus mutans***

Bruna Palmeira Costa

SAPIENTIA AEDIFICAT

2015

BRUNA PALMEIRA COSTA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E EFEITO INIBITÓRIO DA
SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NA
ADERÊNCIA E NO BIOFILME MADURO DE *Streptococcus mutans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas

Orientador: Profa. Dra. Fabíola Galbiatti de Carvalho

Co-orientador: Prof. Dr. Hugo Lemes Carlo

João Pessoa

2015

C837s Costa, Bruna Palmeira.

Síntese, caracterização e efeito inibitório da solução de nanopartículas de quitosana na aderência e no biofilme maduro de *Streptococcus mutans* / Bruna Palmeira Costa.- João Pessoa, 2015.

55f. : il.

Orientadora: Fabíola Galbiatti de Carvalho
Coorientador: Hugo Lemes Carlo Dissertação
(Mestrado) - UFPB/CCS

UFPB/BC

CDU: 616.314(043)

BRUNA PALMEIRA COSTA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E EFEITO INIBITÓRIO DA
SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NA
ADERÊNCIA E NO BIOFILME MADURO DE *STREPTOCOCCUS*
*MUTANS***

Banca Examinadora



Profa. Dra. Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo
Orientadora



Prof. Dr. André Ulisses Dantas Batista
Examinador - UFPB



Profa. Dra. Simone Alves de Sousa
Examinador - UFPB

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Julio Cesar da Silva Costa e Maria de Fátima Palmeira Costa, pelo amor, pela educação, pela força e por ter me ensinado a lutar pelos meus sonhos e a acreditar na superação dos obstáculos.

A minha querida avó, Mercês Palmeira, pelo carinho, ternura e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por ter me dado a oportunidade de poder realizar mais um sonho dentre tantos outros que ainda terei. Por ter me dado saúde e proporcionado momentos inesquecíveis enquanto mestrandando;

Aos meus pais, irmãos, avó, tios, primos, namorado e amigos, que juntos fazem de nós uma grande família, pela torcida, pelo acolhimento nos momentos difíceis e por estarem sempre ao meu lado.

À minha orientadora Fabíola Galbiatti, por ter sido dedicada e me ajudado a concluir essa pesquisa. Agradeço pela sua paciência, pelo carinho, pela preocupação e por ter me passado ensinamentos que não esquecerei jamais.

Aos meus amigos de turma que conviveram comigo nesses dois anos na Universidade Federal da Paraíba, principalmente à Brenna Louise, por ter me ajudado e partilhado comigo suas experiências. Que esse seja o início de uma bela e bem sucedida jornada de desafios e de sonhos para nós todos.

Aos professores Ana Maria Gondim Valença e Ricardo Castro pela disponibilidade de uso do Lab. Microbiologia do NUMETROP-UFPB. À Profa. Giovanna Machado do CETENE pela ajuda na realização das imagens do MET, à profa. Ieda do Depto. Química pela ajuda no desenvolvimento das análises do FTIR e à Rebeca, técnica do LABIO – PPGO/UFPB pela ajuda na interpretação dos resultados do FTIR. Agradeço, também, ao aluno Isaque e ao Prof. Juliano Elvis da Engenharia de Materiais-UFPB pelo auxílio no desenvolvimento da solução de nanopartícula de quitosana.

Enfim, a todos os funcionários e professores do PPGO por terem caminhado junto conosco nesses dois inesquecíveis anos de muito trabalho, muita luta, mas também, de muitas conquistas e muitos momentos prazerosos.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.”

Augusto Branco

RESUMO

Introdução: A quitosana é um biopolímero que apresenta, dentre outras propriedades biológicas, atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos. Porém a literatura ainda é escassa quanto a sua ação antibacteriana em biofilme de *Streptococcus mutans* quando do uso clínico da solução de nanopartículas de quitosana. **Objetivo:** Sintetizar e caracterizar soluções de nanopartículas de quitosana (ChNP) em diferentes concentrações (0,95 mg/mL, 1,9 mg/mL e 3,8mg/mL) e avaliar seu efeito antibacteriano *in vitro* na aderência, formação e redução de biofilme de *S. mutans*. **Metodologia:** Foram realizadas a síntese pela geleificação iônica e a caracterização das nanopartículas de quitosana através de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Depois, foi realizado teste do halo de inibição e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) contra *S. mutans*. Para análise do efeito antibacteriano da ChNP foram feitos os seguintes ensaios com as concentrações da solução na CIM, CIMx2 e CIMx4: Aderência inicial: meio com inóculo de *S. mutans* em contato de 2h com as soluções, incubação por 48h e leitura da placa; Formação de Biofilme : Após formação de biofilme de *S. mutans* (2h), contato de 60 s com as soluções, incubação por 48h e leitura da placa; Biofilme maduro: Para esse ensaio, foram divididos 4 grupos: G1:Formação de biofilme maduro, um contato de 60s com as soluções em 24h e leitura da placa; G2:um contato de 60s, a cada 24h, por 48h e leitura da placa;G3: contato direto com as soluções por 24h;G4: contato direto com as soluções por 48h. Os testes foram conduzidos em triplicata. Foi utilizada a solução de digluconato de clorexidina 0,12% como controle positivo e solução salina como controle negativo. Os dados foram analisados descritivamente e pelos testes de One-way ANOVA e Tukey ($\alpha=0,05$). **Resultados:** Os resultados do FTIR e MET mostraram a formação de nanopartículas de quitosana com tamanho médio de 50 nm e apresentando formato arredondado. Foi encontrada CIM e CBM na concentração de 475 μ g/mL. Houve inibição de crescimento bacteriano de cerca de 40% na aderência inicial nas três concentrações e de 11% na formação de biofilme após um banho de 60s com a solução na CIMx4. Já no biofilme maduro, a porcentagem de inibição da ChNP na CIMx2 e CIMx4 passou de 5-7%, quando realizado um contato de 60s

em 24h, para 8-13%, quando realizado um contato de 60s a cada 24h por 48h e quando colocados em contato direto por 24 e 48h, as três concentrações apresentaram redução de 90 a 100% de inibição de *S. mutans* similar a solução de clorexidina 0,12%. **Conclusão:** As ChNP na CIM, CIMx2 e CIMx4 apresentaram atividade bactericida contra biofilme de *S. mutans* quando em contato contínuo com o micro-organismo, permanecendo ativa por 48h. Porém, quando utilizada para bochecho diário de 60s houve mínima atividade bacteriostática das soluções no biofilme.

Descritores: Nanopartículas, Quitosana, *Streptococcus mutans*, Biofilme.

ABSTRACT

Introduction: Chitosan is a polymer that has, among other biological properties, antimicrobial activity against bacteria and fungi. However, the literature is still scarce concerning the clinical use of chitosan nanoparticles solution as an antibacterial agent against *Streptococcus mutans* biofilm. **Objective:** To synthesize and characterize chitosan nanoparticles solutions (ChNP) at different concentrations (0.95 mg / mL, 1.9 mg / mL and 3.8mg / mL) and evaluate their in vitro antibacterial effect on adhesion formation and reduction of *S. mutans* biofilm. **Methodology:** We performed the synthesis by ionic gelation and characterization of chitosan nanoparticles by absorption spectroscopy in the infrared (FTIR) and transmission electron microscopy (TEM). Then it was conducted the inhibition zone test and the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against *S. mutans*. To analyze the antibacterial effects of ChNP, the following tests were made with the solutions concentrations in CIM, CIMx2 and CIMx4: Initial adherence: Medium with *S. mutans* inoculum in contact 2h with the solutions, incubation for 48 hours and plate reader; Biofilm formation: After biofilm formation of *S. mutans* (2h), contact 60s with the solutions, incubation for 48 hours and plate reader; Mature biofilm: For this test, it was divided 4 groups: G1: mature biofilm formation, contact 60s with the solutions in 24h and plate reader; G2: a contact 60s, every 24 hours ,for 48 hours and plate reader; G3: direct contact with the solutions for 24 hours; G4: direct contact with the solutions for 48 hours. Tests were conducted in triplicate. It was used 0.12% chlorhexidine digluconate solution as positive control and saline as negative control. Data were analyzed descriptively and by One-way ANOVA and Tukey tests ($\alpha = 0.05$). **Results:** The results of the FTIR and TEM showed the formation of chitosan nanoparticles with an average size of 50 nm and with a rounded shape. MIC and MBC were found at a concentration of 475 mg / mL. There was growth inhibition of about 40% in the adherence in the three different concentrations and 11% in the biofilm formation after a 60s bath with the solution in CIMx4. In the mature biofilm, the percentage of inhibition of ChNP in CIMx2 and CIMx4 were from 5-7% when performed a 60s contact in 24h to 8-13% when performed a 60s contact every 24 h for 48 h and when placed in direct contact for 24 and 48 hours, the three concentrations inhibited from 90 to 100% the growth of

S. mutans, a similar effect of chlorhexidine 0,12%. **Conclusion:** ChNP in CIM, CIMx2 and CIMx4 showed bactericidal activity against *S. mutans* biofilm when in continuous contact with the microorganism, remaining active for 48 hours. But when used for everyday 60s mouthwash there was minimal bacteriostatic activity of the solutions in the biofilm.

Keywords: Nanoparticles, Chitosan, *Streptococcus mutans*, Biofilm

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ChNP: Nanopartícula de Quitosana

S. mutans: *Streptococcus mutans*

FTIR: Espectroscopia de absorção na região de infravermelho

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CBM: Concentração Bactericida Mínima

TPP: Tripolifosfato de Sódio

%I: Porcentagem de Inibição

BHI: Caldo de Infusão de Cérebro e Coração

TCT: 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio

UFC: Unidade Formadora de Colônia

LPS: Lipopolissacarídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	133
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Quitosana	15
2.2 Atividade antimicrobiana da quitosana contra <i>Streptococcus mutans</i>	19
3. PROPOSIÇÃO	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Preparo das soluções de nanopartículas de quitosana	25
4.2 Caracterização da solução de nanopartículas de quitosana	26
4.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	26
4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	26
4.3 Análise microbiológica	27
4.3.1 Micro-organismo e condições de crescimento	27
4.3.2 Teste de Difusão em Agar	27
4.3.3 Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM)	27
4.3.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	29
4.3.5 Efeito da solução de nanopartículas de quitosana na aderência inicial e na formação do biofilme de <i>S. mutans</i>	29
4.3.6 Efeito da solução de nanopartículas de quitosana na redução do biofilme maduro de <i>S. mutans</i>	33
4.4 Análise Estatística	35
5. RESULTADOS	35
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS*	51

1. INTRODUÇÃO

O biofilme formado sobre a estrutura dentária é associado com o desenvolvimento das doenças bucais como cárie, gengivite e periodontite (MARSH, 2010). *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) é um micro-organismo chave que contribui para o desenvolvimento da cárie, apesar de não ser um colonizador primário, tem um papel reconhecido na iniciação da cárie dentária (COSTA et al.,2013). Além disso, sua capacidade de utilizar a sacarose da dieta para produzir exopolissacarídeos favorece a adesão de outras bactérias (colonizadoras secundárias) tornando *S. mutans* um dos principais contribuintes para a formação do biofilme (KOO et al.,2010; COSTA et al.,2013).

O controle mecânico do biofilme dentário por meio da frequente e adequada escovação é um dos principais mecanismos para prevenção da doença cárie (MARSH, 2010). Em casos de dificuldade de higienização e de manutenção da motivação dos indivíduos para a adequada limpeza dos dentes, a utilização de agentes químicos em soluções pode ser um coadjuvante ao método mecânico para controle dos micro-organismos (MARSH, 2010). Entre os compostos ativos mais utilizados como agentes químicos está a clorexidina, porém seu uso diário apresenta efeitos colaterais indesejáveis como manchas nos dentes e na língua, perda do paladar e sensação de queimação na mucosa oral (MARINHO;ARAÚJO,2007). Além disso, o uso amplo e sem restrição dos agentes químicos pode levar a efeitos secundários e de resistência microbiana (GAGARI E KABANI, 1995).

Assim, produtos alternativos naturais ou contendo biopolímeros têm sido desenvolvidos, principalmente devido suas propriedades antimicrobianas e de biocompatibilidade (COSTA et al., 2014). O principal objetivo do desenvolvimento de bioprodutos com atividade antimicrobiana é que os mesmos possam se difundir no interior do biofilme (CHÁVEZ DE PAZ et al., 2011). Devido a este fato, produtos em nanoescala, como as nanopartículas, não apenas podem ser usadas como carregadores biológicos dentro do biofilme, mas permitem contínua e controlada liberação do agente terapêutico, mantendo-o em níveis desejados no local (AYDIN E PULAT, 2012), possuindo grande aplicação na odontologia. A quitosana é um dos biopolímeros de escolha para preparação de nanopartículas

devido as suas propriedades de biodegradação, ausência de toxicidade, biocompatibilidade e atividade antimicrobiana (KONG, 2010, ING et al., 2012).

A atividade antimicrobiana de soluções de quitosana contra *S. mutans* já foi relatada na literatura (BUSSCHER et al., 2008; NEILANDS et al., 2011; COSTA et al., 2013; COSTA et al., 2014). Estudos de inibição da aderência inicial de *S. mutans*, quando em contato por 1 a 2 min com a solução de quitosana, mostraram um efeito bacteriostático da quitosana, reduzindo o número e a viabilidade de micro-organismos (BUSSCHER et al., 2008; COSTA et al., 2013). Com relação ao efeito da solução de quitosana na inibição da formação do biofilme e na desagregação do biofilme maduro de *S. mutans*, a quitosana, nas concentrações de 1 e 2 mg/mL, foi capaz de reduzir cerca de 80-90% do número de micro-organismos (COSTA et al., 2013; COSTA et al., 2014). Entretanto, o tempo de contato da solução de quitosana com o biofilme foi contínuo variando de 48 a 198 h (COSTA et al., 2013; COSTA et al., 2014), não sendo avaliado um tempo de contato da substância com os micro-organismos que simulasse o tempo de bochecho de um enxaguatório na cavidade bucal, o qual pode variar de 1 a 2 min. Além disso, estes estudos foram conduzidos com soluções de quitosana. Poucos estudos avaliaram o efeito inibitório da solução de nanopartículas de quitosana na formação do biofilme e biofilme maduro de *S. mutans* (CHÁVEZ DE PAZ et al., 2011), sendo que o tempo de contato da solução com os micro-organismos também foi contínuo e superior ao do bochecho na cavidade bucal.

Diante disso, o objetivo desse estudo foi sintetizar e caracterizar uma solução de nanopartículas de quitosana, como também avaliar seu efeito na inibição da aderência, na formação e na redução do biofilme maduro de *S. mutans*, utilizando tempo de contato específico da solução com o biofilme que simule o uso clínico da solução.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Quitosana

Biopolímeros são vistos com grande interesse pela comunidade acadêmica em função de serem obtidos a partir de fontes renováveis de energia. A quitina é um biopolímero linear de unidades de N-acetilglicosamina ligadas por união glicosídicas β -(1-4) presente nos exoesqueletos da maioria dos crustáceos, sendo considerado o segundo maior biopolímero disponível na natureza e sua produção é estimada em 10^9 - 10^{11} toneladas ao ano (DASH et al., 2011).

Quando o grau de desacetilação da quitina atinge cerca de 50% (dependendo da origem do polímero), ela se torna solúvel em condições aquosas ácidas e é chamada de quitosana (RINAUDO, 2006). O processo de desacetilação da quitina ocorre em meio básico com a solução de hidróxido de sódio a 40%, sob a temperatura de 120°C, durante um período de 3 horas, resultando na remoção dos grupos acetil da cadeia de quitina e em grupos amino livres (NH_2) (figura 1). Como a reação de desacetilação da quitina para obtenção da quitosana não ocorre de forma total (não se obtendo um homopolímero estruturalmente 100% desacetilado), a quitosana é considerada um copolímero com unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicose e 2-acetamida-2-desoxi-D-glicose, as quais são unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1-4), com sua estrutura C6 sendo composta de um grupo amino primário e dois grupos hidroxilas livres (SILVA, 2012) (figura 1). O processo de conversão de quitina em quitosana deve ser realizado de forma adequada para garantir a produção de quitosana com alta qualidade e pureza, livre de contaminantes, como proteínas, endotoxinas e metais tóxicos (COSTA SILVA et al., 2006; SÃO PEDRO et al., 2009).

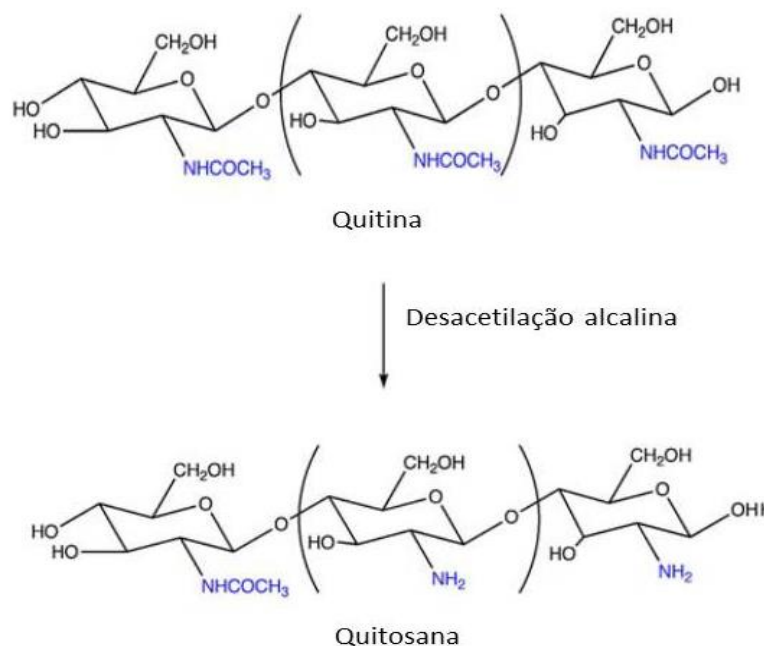


Figura 1: Representação esquemática da desacetilação alcalina da quitina, obtendo-se quitosana (Adaptado de COELHO et al.,2010).

Apesar de quimicamente semelhantes, quitina e quitosana são diferentes no grau de desacetilação, o que modifica suas características físico-químicas, biológicas, biomédicas, dentre outras. Essa diferença no grau de desacetilação é facilmente observada na solubilidade, sendo a quitina insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos e a quitosana é solúvel em ácidos fracos, como o ácido acético e o ácido fórmico (TAVARES, 2011).

O polímero da quitosana obtido deve ser caracterizado de acordo com o seu grau de desacetilação e massa molar, uma vez que tais características podem influenciar na degradação e na hidrólise do polissacarídeo (COSTA SILVA et al.,2006; SÃO PEDRO et al.,2009). De acordo com o nível médio de desacetilação, a quitosana pode ser obtida com as suas propriedades físico-químicas diferenciadas no que se refere aos parâmetros de solubilidade, pKa e viscosidade (CARVALHO et al.,2011). Diferentes graus de desacetilação influenciam a conformação da molécula de quitosana em solução aquosa, levando a uma variação na viscosidade. Um alto grau de desacetilação leva a uma expansão da cadeia, pois ocorre repulsão entre as cargas das moléculas, aumentando a viscosidade. O contrário acontece quando o grau de desacetilação é baixo, pois diminui a densidade da carga e o polímero fica mais enovelado (TAVARES, 2011).

A quitosana é uma base fraca, e seu pKa varia de 6,2 a 7,0, sendo insolúvel em pH neutro e alcalino. Além disso, esse biopolímero forma sais com ácidos orgânicos e inorgânicos, pois os grupos amino da quitosana são protonados o que resulta em um polissacarídeo solúvel carregado positivamente. Seus sais são solúveis em água dependendo do grau de desacetilação e do pH da solução. Se o percentual de desacetilação for baixo (< 40%) são solúveis em pH 9, enquanto que com alto grau de desacetilação (>85%) são solúveis com pH até 6,5 (HEJAZI; AMIJI,2003). É difícil obter a quitosana com alto grau de desacetilação porque, enquanto o processo aumenta, a degradação do polímero também aumenta (COSTA SILVA et al.,2006).

A quitosana pode ser sintetizada em microesferas ou em nanopartículas. O desenvolvimento do sistema de nanopartículas visa a inúmeras aplicações terapêuticas, principalmente, para administração parenteral ou oral. Na administração oral visa-se principalmente à diminuição de efeitos colaterais, à proteção de fármacos degradáveis no trato gastrointestinal e ao aumento da biodisponibilidade de fármacos. As nanopartículas se comportam quase como um fluido, quando dispersadas no ambiente, devido ao seu tamanho diminuto e elevada energia superficial. Com isso, elas podem facilmente ser adsorvidas no trato respiratório chegando aos alvéolos. Entretanto, por causa de sua elevada energia superficial, podem ocorrer aglomerações entre as nanopartículas, o que aumentaria sua massa e volume (SILVA, 2012).

A maioria dos sistemas avançados de nanopartículas transportadoras de drogas é produzida utilizando-se polímeros sintéticos ou naturais ou uma combinação dos dois, sendo a quitosana um dos biopolímeros mais usados na síntese de nanopartículas (NEILANDS et al.,2011). Especificamente, as nanopartículas de quitosana podem ser formadas pelo processo de geleificação iônica, no qual são utilizados agentes reticulantes¹ a exemplo do tripolifosfato de sódio (TPP) (figura 2). Partículas obtidas através de complexação de polieletrólitos apresentam características de porosidade e de resistência mecânica nem sempre adequadas, sendo necessário algum tipo de modificação para melhorar tais propriedades. Isto pode ser conseguido através do uso de agentes reticulantes, como o TPP (TAGLIARI, 2012), que tem sido bastante utilizado porque não é tóxico, tem rápida capacidade de geleificação e interage eletrostaticamente com a quitosana catiônica (ING et al., 2012).

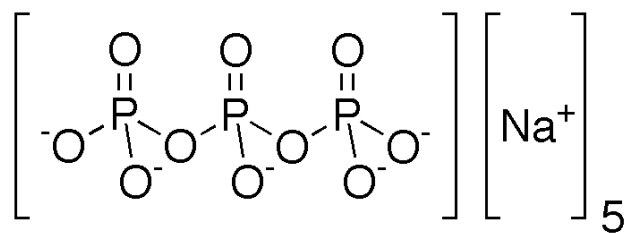


Figura 2: Estrutura química da molécula de TPP. (www.google.com.br)

A geleificação iônica, também chamada reticulação, consiste na formação de ligações estáveis entre segmentos de cadeias polipeptídicas dentro da molécula (ligações intramoleculares) ou entre cadeias poliméricas vizinhas (ligações intermoleculares) formando uma estrutura em rede tridimensional, normalmente mais rígida que o material não reticulado (SHU; ZHU, 2002). A reticulação física (TPP) é a preferida atualmente, pois evita o uso de reagentes tóxicos (SHU; ZHU, 2000).

A dissolução do TPP em água resulta em íons OH^- , $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ e $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$. Em soluções com pH básico, os íons $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ e $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ podem interagir ionicamente com grupos amino protonados (NH_3^+) da quitosana através de deprotonação ou reticulação iônica. O ajuste do pH para valores abaixo de 6,0 resulta apenas em íons $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$, e as partículas podem ser formadas apenas por reticulação iônica, ocorrendo um entrelaçamento cruzado possibilitando uma aproximação entre duas moléculas de quitosana (TAGLIARI, 2012) (Figura 3).

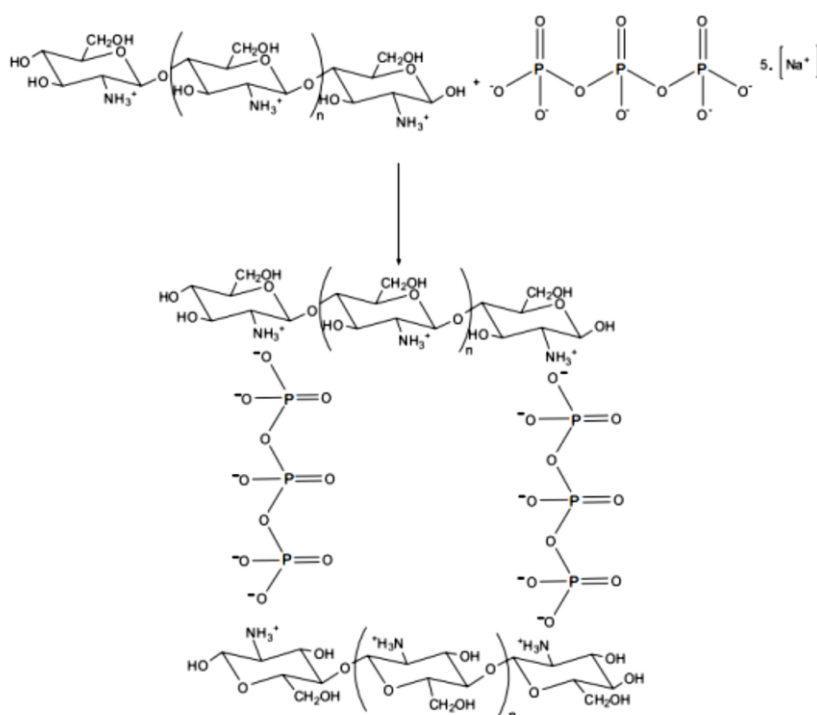


Figura 3: Representação da interação entre quitosana e TPP, resultando em nanopartículas (Adaptado de COELHO et al., 2010).

Enquanto a quitina é considerada um polissacarídeo abundante e indesejável, uma vez que está relacionada com a contaminação ambiental, a quitosana tem mostrado uma excelente biocompatibilidade, quase nenhuma toxicidade para seres humanos e animais, alta bioatividade, biodegradabilidade, reatividade do grupo amino desacetilado, permeabilidade seletiva, atividade antimicrobiana, capacidade para formar gel e filme, de quelação e absorção (CARVALHO et al.,2011), propriedades que a torna de grande aplicabilidade nas diversas áreas da ciência: médica, farmacêutica, industrial, têxtil, agrícola (KONG et al.,2010). Uma de suas principais características é sua atividade antimicrobiana, o que vem chamando a atenção de muitos pesquisadores.

2.2 Atividade antimicrobiana da quitosana contra *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans é um dos patógenos primários responsáveis pela cárie dentária. Na presença de açúcar, principalmente sacarose, produz glucanos insolúveis em água que se acumulam na superfície dentária como um biofilme que serve como base para o desenvolvimento de comunidades polimicrobianas (AHMED et al.,2014), além disso, há uma progressiva redução dos valores de pH no biofilme dentário causada pelo *S. mutans* que pode metabolizar os hidratos de carbono dietéticos rapidamente em produtos finais de ácido. Esta acidificação do biofilme contribui para a desmineralização do esmalte do dente durante o desenvolvimento de cárie (NEILANDS et al.,2011). Por esta razão, o controle do biofilme dentário desempenha um papel significativo na prevenção da cárie. Procedimentos de limpeza mecânica do dente e o uso de quimioterápicos locais são empregados para esta finalidade. O mais exaustivamente testado e eficaz agente antimicrobiano utilizado com esse objetivo é a clorexidina, que tem sido usada por mais de três décadas (BAE et al.,2006). Embora a clorexidina seja um excelente antimicrobiano, devido a seus efeitos colaterais não é recomendado o seu uso prolongado. Dentre os efeitos adversos relatados com o uso prolongado da clorexidina podemos citar a coloração dos dentes, descamação reversível da mucosa, alterações do paladar e aumento dos depósitos calcificados supra gengivais. Daí a necessidade de serem desenvolvidas substâncias tão efetivas quanto, mas sem os seus efeitos colaterais (TORRES et al., 2000).

A quitosana exibe atividade antibacteriana contra uma gama de patógenos orais (LIU et al.,2004; HELANDER et al.,2001; KONG et al.,2010, sendo

considerada um bom sistema de liberação de fármacos na cavidade bucal, visto que a sua atividade antibacteriana pode ser devida às interações eletrostáticas entre grupos amino e grupos aniônicos nas paredes celulares das bactérias provenientes de resíduos de ácidos carboxílicos e fosfolipídeos (LARANJEIRA;FÁVERE,2009). Um estudo *in vitro* sugere que a quitosana pode ter utilidade como um inibidor de desmineralização de esmalte (ARNAUD et al.,2010). Dentre os micro-organismos que são afetados por esse biopolímero, alguns estudos apontam o *S. mutans* como integrante desse grupo (CHÁVEZ DE PAZ et al., 2011; BUSSCHER et al.,2008; COSTA et al.,2014).

A adesão de bactérias orais na superfície do dente conduz à formação de biofilme na cavidade bucal. Para Busscher et al. (2008), a quitosana apresenta claramente efeitos antibacterianos e antiaderentes em relação ao *S. mutans* através da interação entre as cargas positivas do grupo amina da quitosana e a carga negativa da parede celular da bactéria, resultando em perda de função dessa estrutura da célula bacteriana. Observaram em seus estudos que o número e o crescimento de *S. mutans* como também a viabilidade do biofilme foram significativamente reduzidos em amostras de películas salivares tratadas com quitosana (0,1% em peso molecular numa solução aquosa) em relação ao grupo controle, sendo a viabilidade do biofilme das películas tratadas com o biopolímero três vezes menor do que a do grupo controle.

Costa et al. (2013) afirmam que a quitosana proporciona altos percentuais de inibição de adesão do *S. mutans*. A quitosana com alto peso molecular (1 e 2 mg/mL) não apresentou diferenças significativas em termos de inibição de aderência em relação ao tempo de exposição (30 e 90 s), chegando a inibir quase 100% do crescimento bacteriano. Por outro lado para quitosana com baixo peso molecular (2 e 4 mg/mL), houve diferença estatística entre 30 e 90 s de tempo de contato, com este último apresentando inibição significativamente maior, alcançando valores entre 94 e 99% de inibição. Concluíram que a quitosana tem o potencial para minimizar a colonização da cavidade bucal pelo *S. mutans*, sendo que a quitosana de alto peso molecular mostrou maior eficiência do que a de baixo peso molecular.

O estudo de Hayashi et al.(2007), o qual avaliou a atividade antimicrobiana da quitosana contra bactérias cariogênicas demonstrou que o alto grau de desacetilação e o baixo peso molecular da quitosana mostraram atividade

antimicrobiana, porém, não ficou claro se ocorreu a inibição do crescimento ou a morte celular. Afirmaram, ainda, que os efeitos da quitosana nos micro-organismos não devem ser simplesmente explicados em termos de propriedades da parede celular, pois a atividade antimicrobiana da quitosana pode ser dependente tanto da quitosana como dos micro-organismos utilizados. Costa et al. (2012) relataram em um estudo que a quitosana apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias anaeróbicas avaliadas na pesquisa (*P.buccae*, *T.forsythensis*, *A.actinomycescomitans*, *S.mutans*, *P.gingivalis*), com baixos valores de concentração inibitória mínima (CIM), que eram de 3,0 mg/mL e 5,0 mg/mL (quitosana de alto e baixo peso molecular respectivamente) para o *S.mutans*. Concluíram que o biopolímero apresenta uma rápida e eficiente atividade bactericida.

As variações na eficácia bactericida da quitosana resultam de vários fatores que podem ser classificados em quatro categorias: fatores microbianos, relacionadas com a espécie do micro-organismo e idade da célula; fatores intrínsecos da quitosana, como densidade de carga positiva, peso molecular, concentração e capacidade quelante; estado físico; fatores ambientais, envolvendo força iônica em meio, pH, temperatura e tempo de reação (KONG et al., 2010).

O estudo de Arnaud, et al. (2010) demonstrou que as soluções de quitosana (grau de desacetilação de 87%) em diferentes concentrações (1,25 mg/mL, 2,50 mg/mL e 5,00 mg/mL) interferiram no processo de desmineralização do esmalte dentário, inibindo a liberação de minerais, de modo que a perda de minerais foi influenciada pela concentração da solução e tempo de exposição do biopolímero ao esmalte, sendo os melhores resultados obtidos com 2,50 mg/mL e 5,00 mg/mL e tempos de 60s e 90s de aplicação das soluções. Embora este estudo não tenha avaliado o efeito das soluções de quitosana contra bactérias na desmineralização do esmalte, as soluções de desmineralização e remineralização (ciclagem de pH) foram utilizadas para simular a cárie em esmalte.

Chen e Chung (2012) realizaram um estudo *in vivo* e *in vitro* no qual analisaram a utilização da quitosana solúvel em água (500 µg/mL) como solução para bochechos. No estudo *in vivo*, os voluntários realizaram o bochecho com as soluções testes e foi feita a contagem das colônias após 18h de incubação. Já no estudo *in vitro*, o contato das soluções com as bactérias foi feito em laboratório.

Relatam que os resultados de seu estudo *in vivo* e *in vitro* indicam que o bochecho com quitosana solúvel em água foi efetivo em reduzir as bactérias orais humanas (*S.mutans* e *L.brevis*), chegando a uma atividade antibacteriana máxima de 95,3% em pH 5,0 e de 96,2% em uma temperatura de 37°C contra o *S. mutans*. Acrescentam, ainda, que o contato de 5s da solução com o micro-organismo promoveu uma redução de 99,78% de crescimento bacteriano, chegando a 99,99% em 20s de contato, em pH 7,0. Além disso, a concentração bactericida mínima encontrada para esse micro-organismo foi de 400µg/mL. Concluíram que seu estudo *in vivo* foi mais eficiente do que o estudo *in vitro*, e justificam afirmando que essa diferença pode ser devido às diferenças na estrutura da comunidade bacteriana ou concentrações celulares bacterianas entre experimentos *in vivo* e *in vitro*.

Chávez de Paz et al.(2011) afirmam que as preparações de nanopartículas de quitosana com baixos pesos moleculares mostraram uma alta atividade antimicrobiana em pH neutro, interferindo de maneira homogênea na integridade da membrana do *S. mutans* em variadas profundidades de biofilmes formados pelo micro-organismo. Acrescentaram que diferentes graus de desacetilação não pareceram afetar a atividade antimicrobiana da nanopartícula de quitosana, o que, segundo os autores, seria devido aos grupos amino livres ficarem neutros em pH 7,0. É possível que as nanopartículas de baixo peso molecular tenham uma redução no número de moléculas de TPP disponíveis por molécula, o que pode ter contribuído para uma maior susceptibilidade à degradação do biofilme.

Para Neilands et al (2011), as nanopartículas de quitosana interferem na biossíntese de ácidos graxos ou com a síntese proteica em resposta ao estresse, dois fatores importantes na indução da resposta à tolerância ácida do *S. mutans*. Foi mostrado que as nanopartículas de quitosana não parecem ter tido efeito direto na membrana das células, uma vez que quase todas as células em um pH 5,5 foram viáveis com as membranas íntegras (94,5%), porém houve viabilidade celular muito baixa (1,1%) quando exposto a um pH 3,5.

Um agente químico para ser eficaz deve possuir substantividade, isto é, a capacidade de retenção intrabucal, para que tenha tempo de contato suficiente para agir sobre a microbiota existente e para que mantenha a inibição da formação do biofilme por um período mais prolongado. Além disso, o agente químico deve ter ausência de toxicidade, não ser alergênico, ter comprovações

clínicas de redução do biofilme e gengivite, ser seletivo, ter especificidade para agir na microbiota patogênica, apresentar sabor agradável, custo acessível e ser de fácil utilização (TEITELBAUM,2008). Tendo em vista os efeitos colaterais da clorexidina já relatados anteriormente, e sendo esta a solução mais empregada como agente químico, é fundamental a procura de novas soluções que sejam eficientes agentes químicos.

Diante da escassa literatura envolvendo a solução de nanopartículas de quitosana na prevenção da doença cárie, torna-se relevante investigar o efeito inibitório desta solução de polímero natural na adesão e na formação de biofilme de *S. mutans*.

3. PROPOSIÇÃO

- Geral

O objetivo desse estudo foi sintetizar e caracterizar uma solução de nanopartículas de quitosana e avaliar *in vitro* seu efeito antibacteriano contra *Streptococcus mutans*.

- Específicos

1. Sintetizar a solução da nanopartícula de quitosana pelo método de geleificação iônica
2. Caracterizar a solução de nanopartícula de quitosana utilizando-se a espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) e a microscopia de transmissão (MET).
3. Avaliar a atividade antimicrobiana das soluções de nanopartículas de quitosana contra *Streptococcus mutans* através do teste de halo de inibição, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).
4. Avaliar o efeito da solução de nanopartículas de quitosana na CIM, CIMx2, CIMx4 na aderência, formação e redução do biofilme maduro de *S. mutans*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo das soluções de nanopartículas de quitosana

A quitosana utilizada no estudo foi a de baixo peso molecular (107kDa, 75-85% DD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (figura 4A). As nanopartículas de quitosana foram obtidas com base na geleificação iônica da quitosana com ânions tripolifosfato de sódio (TPP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (figura 4B) (CHÁVEZ DA PAZ et al. 2011). A quitosana foi dissolvida em solução de ácido acético 1% m/v (Química Moderna, Barueri, São Paulo, Brasil) (figura 4C), em concentrações de 1,25 mg/mL, 2,50 mg/mL e 5,00 mg/mL, sendo mantida sob agitação constante por 24h, em temperatura ambiente (figura 5A). Após, as soluções foram filtradas sob pressão positiva através de membranas de porosidades 0,8 μ m para eliminar os produtos sólidos resultantes do processo de obtenção da quitosana. Em seguida, 3 mL de solução aquosa de TPP sódico preparada com concentração de 2,4 mg/mL foram adicionados a 10 mL das soluções de quitosana, sob agitação de 6000 rpm à temperatura ambiente, por meio de uma bomba de infusão (figura 5B) com adição contínua da solução aquosa de TPP sódico à taxa de 1 mL/min. As soluções finais de nanopartículas de quitosana foram respectivamente de 0,95 mg/mL, 1,9 mg/mL, 3,8 mg/mL. O pH da solução foi ajustado para aproximadamente 5,5 com a adição de NaOH.



Figura 4. Materiais utilizados no desenvolvimento da solução de nanopartículas de quitosana A. Quitosana; B. TPP de sódio; C. Ácido acético.

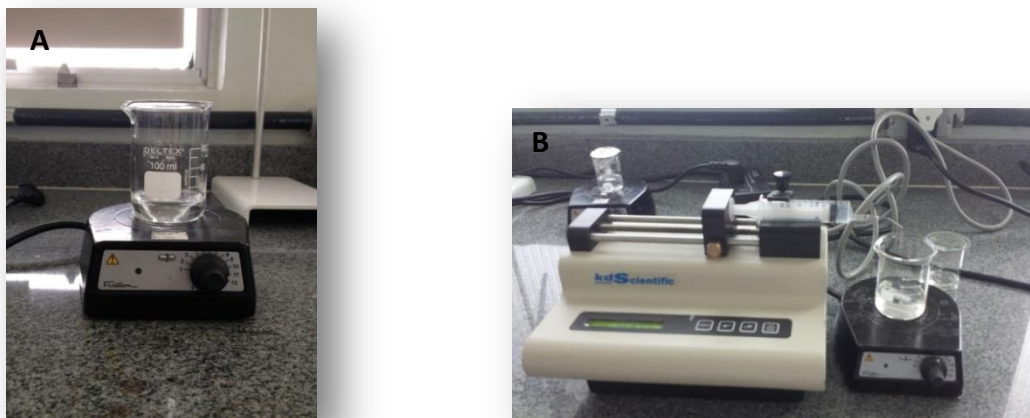


Figura 5. Preparo da solução de nanopartícula de quitosana: A. Agitação constante durante 24h; B. Adição da solução de TPP por meio da bomba de injeção.

4.2 Caracterização da solução de nanopartículas de quitosana

4.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

As análises das amostras foram realizadas em um espectrofotômetro de infravermelho (IRPrestige-21, Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras sólidas (pó) da quitosana e TPP foram diluídas em brometo de potássio (grau espectroscópico) aplicando a razão aproximada KBr:Amostra de 100:1 mg, respectivamente, e prensadas para formação de pastilha com cerca de 1 cm de diâmetro. As pastilhas confeccionadas foram submetidas à análise por transmitância do feixe de infravermelho, realizando varreduras nas regiões entre 400 e 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e médias de 20 scans. Os resultados foram obtidos utilizando-se o software OriginPro 8 (Northampton, Massachusetts, USA).

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia e o tamanho das nanopartículas de quitosana foram observados em MET como sugerido por Lima et al. (2015). Uma alíquota de 50 μL da solução de nanopartículas de quitosana 3800 $\mu\text{g/mL}$ foi gotejada em um grid de Holey Carbon (gride de cobre coberto com filme de formar e carbono) permanecendo em um dessecador por 24h para secagem. Após, a morfologia e o tamanho das nanopartículas de quitosana foram observados em Microscópio

eletrônico de transmissão (MET - MORGAGNI G20 - FEI, Hillsboro, Oregon, EUA) utilizando uma tensão de aceleração de 100kV.

4.3 Análise microbiológica

4.3.1 Micro-organismo e condições de crescimento

A cepa de *S. mutans* (UA 159) utilizada nas etapas desta pesquisa foi cedida pelo Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP. As colônias de *S. mutans* foram cultivadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (DIFCO, Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). Os inóculos foram preparados contendo 100 µL de *S. mutans* em 4 mL do BHI e incubados por 24h a 37°C em microaerofilia com o emprego do método da chama de vela. A densidade óptica do inóculo foi ajustada a 625 nm (OD₆₂₅: 0,6) contendo aproximadamente 1×10^8 UFC.

4.3.2 Teste de Difusão em Agar

Dez placas de petri contendo uma base de 15 mL de ágar de Mueller Hinton (Himedia, LBS Marg, Índia) foram preparadas, nas quais 100 µL do inóculo de *S. mutans* foram dispensados e espalhados sobre o meio com auxílio de uma alça esterilizada. Cinco soluções foram testadas em cada placa (n=10): solução de nanopartícula de quitosana de 0,95 mg/mL, 1,9 mg/mL, 3,8 mg/mL, clorexidina 0,12% (controle positivo) e ácido acético 1% + TPP (controle negativo). Para este fim, 5 discos de papel absorvente (6 mm de diâmetro) esterilizados foram dispensados em cada placa contendo 50 µL de cada solução. As placas foram mantidas durante 1 h a temperatura ambiente para difusão das soluções e incubadas por 48 h a 37°C em microaerofilia com o emprego do método da chama de vela. Após a incubação, as zonas de inibição ao redor dos espécimes foram medidas utilizando-se um paquímetro digital. O ensaio foi realizado em triplicata. A solução de nanopartículas de quitosana com maior formação de halo foi utilizada para os outros ensaios microbiológicos.

4.3.3 Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada por meio da técnica da microdiluição de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (NCCLS, 2003). Para tanto

foram utilizadas placas de microdiluição de 96 poços, com fundo em forma de “U” (Nuncclon, Thomas Scientific, NJ, USA). Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de BHI em cada poço. Em seguida, 100 µL da solução de nanopartículas de quitosana (3,8 mg/mL) foram transferidos para o primeiro poço e diluídos seriadamente a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora. As concentrações da solução de nanopartículas de quitosana nos poços variaram de 950 µg/mL até 0,46 µg/mL. Por fim, foi adicionado 100 µL do inóculo de *S. mutans* em cada poço.

Paralelamente, foi realizado o controle da viabilidade da cepa (controle de crescimento - meio de cultura com inóculo) e o controle de esterilidade do meio (somente meio de cultura). Como controle positivo foi utilizada solução de Clorexidina 0,12% (figura 6), pois é uma solução antimicrobiana amplamente usada como bochecho na cavidade bucal (RUIZ-LINHARES et al.,2014). Como controle negativo, testou-se a solução salina. O ensaio foi realizado em triplicata, e as placas de microdiluição foram incubadas em estufa por 24h a 37°C em microaerofilia com o emprego do método da chama de vela.

A CIM foi considerada a menor concentração do produto em teste capaz de produzir inibição visível (formação ou não de aglomerados de células - “botão” no fundo dos poços da placa) sobre o crescimento bacteriano (NCCLS, 2003). A leitura para determinação da CIM das soluções de quitosana foi feita pelo método visual. Para a confirmação da presença de micro-organismos viáveis foi utilizado o corante TCT (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio) no volume de 20 µL. Esse corante reflete a atividade das enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração celular.

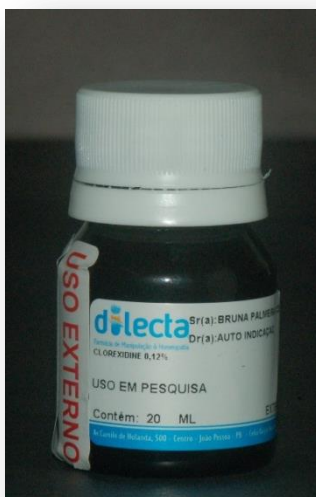


Figura 6: Solução de Digluconato de Clorexidina 0,12%

4.3.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após determinação da CIM, alíquotas da concentração correspondente à inibitória e à concentração imediatamente mais concentrada (CIMx2) foram subcultivadas em placas de petri contendo ágar de Mueller Hinton, as quais foram incubadas a 37°C por 48 h em microaerofilia com o emprego do método da chama de vela. A CBM foi definida como a menor concentração do produto que impediu o crescimento visível do subcultivo, ou seja, que foi capaz de eliminar o micro-organismo.

4.3.5 Efeito da solução de nanopartículas de quitosana na aderência inicial e na formação do biofilme de *S. mutans*

O efeito da solução de nanopartículas de quitosana na inibição da aderência de *S. mutans* e após 2h de aderência foi investigado adaptado do estudo de Costa et al., 2013. Placas de microdiluição de 96 poços foram utilizadas com BHI suplementado com 0,25% de sacarose e inóculo com 1×10^8 UFC. Foram testadas as soluções de nanopartículas de quitosana nas concentrações CIM, CIMx2 e CIMx4 (figura 8), a solução de Clorexidina 0,12% (controle positivo) e a solução salina a 0,9% (controle negativo). Os ensaios foram divididos em dois grupos de acordo com o período de inserção das soluções, o tempo de contato com os micro-organismos (banho) e o tempo de leitura da placa (figura 7).

Efeito na aderência inicial: Ensaio 1 (E1): meio com inóculo de *S. mutans* em contato de 2h com as soluções, incubação por 48 h e leitura da placa.

Efeito na Formação do biofilme: Ensaio 2 (E2): após 2 h de aderência inicial de *S. mutans* foi realizado um banho (as soluções permaneceram em contato por 60s), incubação por 48h e leitura da placa.

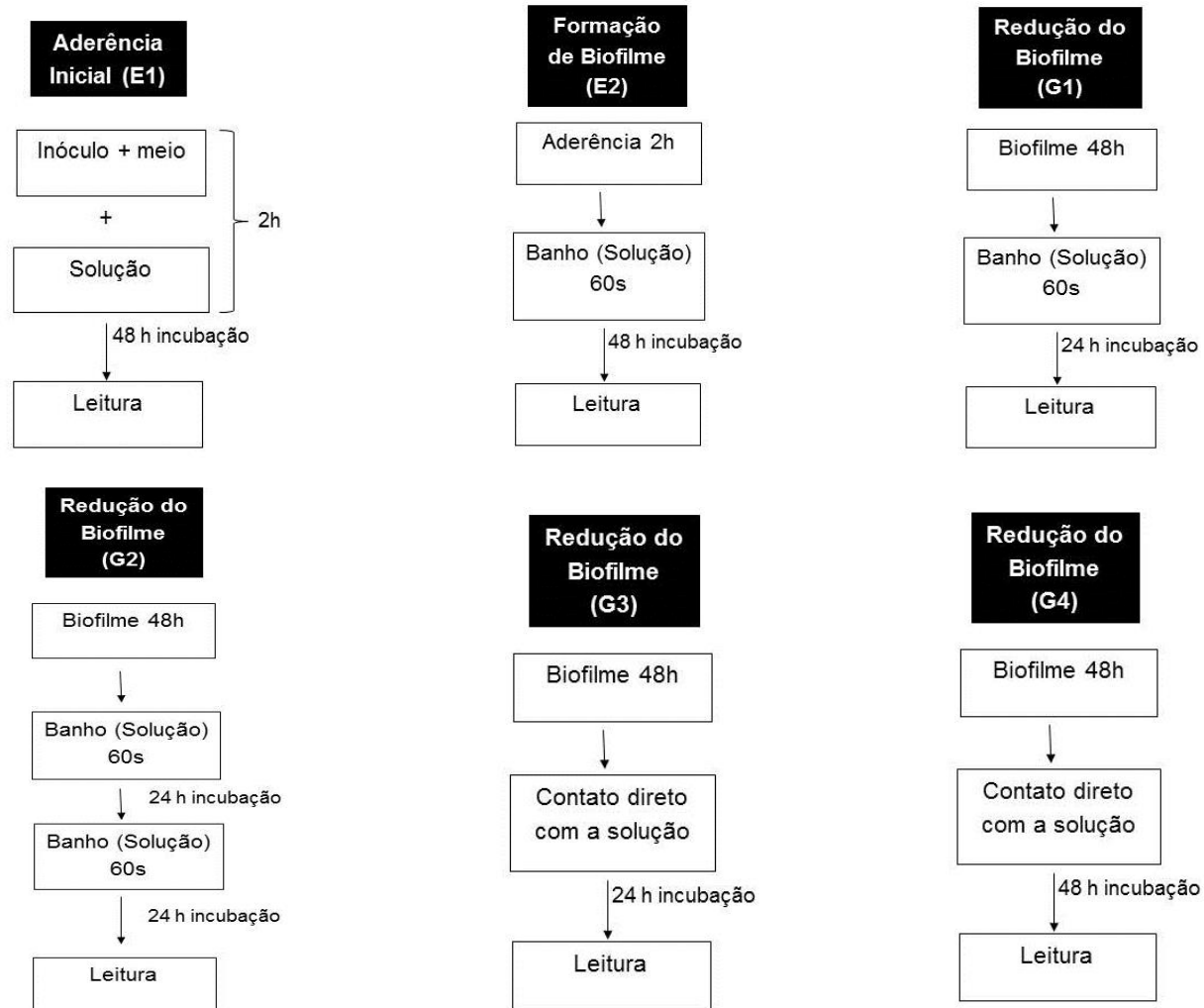


Figura 7. Ensaio realizado com as soluções na aderência inicial, formação de biofilme e redução de biofilme maduro (G1,G2,G3 e G4) de *S.mutans*



Figura 8: Soluções de nanopartículas de quitosana

Em cada poço foram colocados 100 μ L de BHI+sacarose (figura 9) e 100 μ L do inóculo. No ensaio da aderência inicial (E1) foram colocados 100 μ L de cada substância e as placas incubadas por 2 h em estufa a 37°C em microaerofilia com o emprego do método da chama de vela. Na formação do biofilme (E2) as placas contendo meio e inóculo foram incubadas por 2h, sem o contato com as substâncias. Em seguida, o conteúdo dos poços dos dois ensaios foi retirado (figura 10), os poços foram lavados 3 vezes com solução salina para remoção das células não aderidas e 100 μ L do meio foi inserido. A placa do E1 foi incubada por 48h em estufa a 37°C em microaerofilia. No ensaio da formação de biofilme (E2) 100 μ L de cada solução foi inserida nos poços e mantida em contato por 60s, após os poços foram lavados como citado anteriormente e preenchidos com 100 μ L do meio para posterior incubação por 48h em estufa a 37°C em microaerofilia (figura 10). O mesmo procedimento foi realizado no controle de crescimento. Decorrido o tempo de incubação nos dois ensaios, cada poço foi lavado duas vezes com 200 μ L de solução salina para remoção das células não aderidas, e imediatamente após as células aderidas foram fixadas por 15 min com 200 μ L de etanol a 95% (DJORDJEVIC et al 2002). Em seguida os poços foram secos ao ar livre por 45 min. Em cada poço foram acrescentados 200 μ L de solução aquosa de cristal violeta (Merck, Offenbach am Main, Hesse, Alemanha) a 0,4% por 15 min. Após, os poços foram lavados 3 vezes com 200 μ L de água destilada e descorados com 200 μ L de etanol a 95%. Essa metodologia foi adaptada do estudo de Costa et al.(2013). Em seguida, 100 μ L de cada poço da solução descorada foram transferidos para uma nova placa para leitura no leitor de

microplacas (Glomax Multi Detection System, Madison, Wisconsin, EUA) com 600 nm. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e com controle esterilidade e de crescimento.

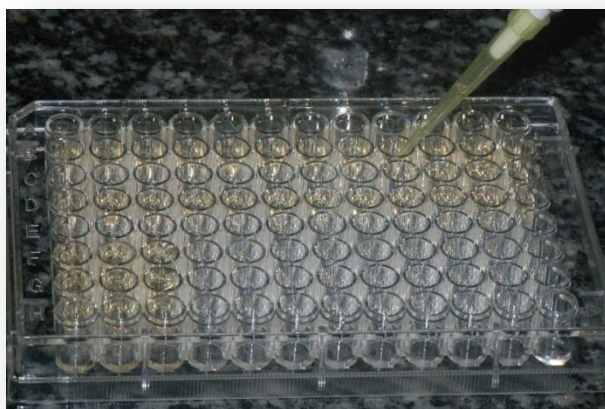


Figura 9: Colocação de 100µL de BHI + sacarose nos poços da placa de microdiluição

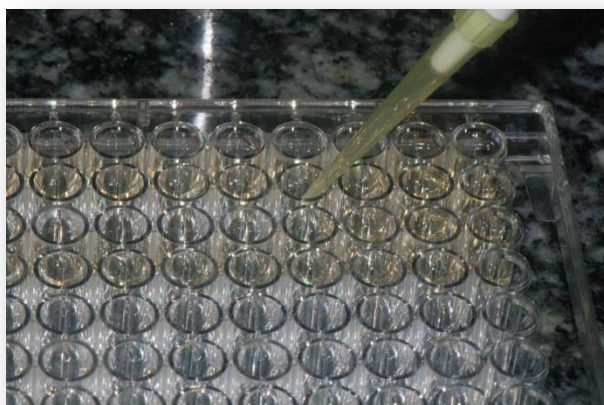


Figura 10: Retirada do conteúdo dos poços, lavagem com solução salina e posterior inserção das soluções e meio

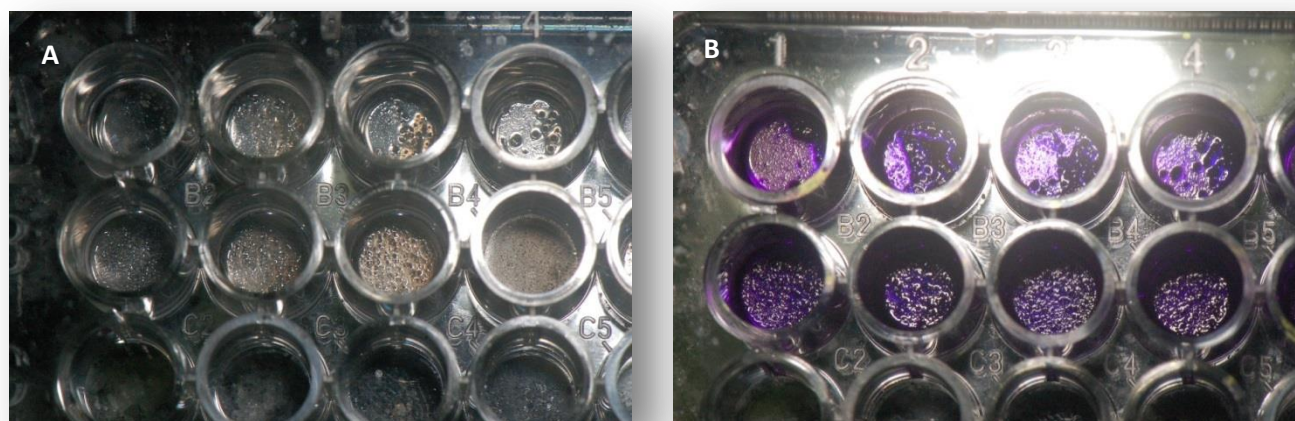


Figura 11: A. Aderência das células bacterianas nos poços antes; B. Aderência das células após a colocação do cristal de violeta.

4.3.6 Efeito da solução de nanopartículas de quitosana na redução do biofilme maduro de *S. mutans*

Para este ensaio foi utilizado como meio BHI suplementado com 0,25% de sacarose (BEDRAN et al.,2014) e inóculo com 1×10^8 UFC. Foram testadas as soluções de nanopartículas de quitosana nas concentrações CIM, CIMx2 e CIMx4, a solução de Clorexidina 0,12% (controle positivo) e a solução salina a 0,9% (controle negativo). Os ensaios de redução do biofilme foram divididos em 4 grupos de acordo com o número de contato das soluções com o biofilme (banhos), o tempo de incubação e o tempo de leitura da placa (figura 7):

- Grupo 1 (G1): após biofilme de 48 h foi realizado 1 banho (60 s) de cada solução, incubação por 24 h e leitura da placa;
- Grupo 2 (G2): após biofilme de 48 h, foram realizados 2 banhos (60 s) de cada solução a cada 24h incubação por 48h e leitura da placa;
- Grupo 3 (G3): após biofilme de 48 h, cada solução permaneceu em contato direto com o biofilme por 24h e foi realizada a leitura da placa;
- Grupo 4 (G4): após biofilme de 48 h, cada solução permaneceu em contato direto com o biofilme por 48h e foi realizada a leitura da placa.

Em placas de microdiluição de 96 poços foram inseridos 100 µL do meio e 100 µL do inóculo. As placas foram incubadas por 48h em estufa a 37°C em microaerofilia. Após a formação do biofilme, o conteúdo dos poços foi retirado, os poços foram lavados 3 vezes com solução salina e 100 µL do meio foi inserido. Nos grupos G1 e G2 100 µL de cada solução foi inserida nos poços e mantida em contato por 60s. No G1 foi realizado um banho e no G2 foram realizados dois banhos a cada 24 h. Após, os poços foram lavados, como citado anteriormente, e preenchidos com 100 µL do meio para posterior incubação por 24h (G1) e 48h (G2) em estufa a 37°C em microaerofilia. Nos grupos G3 e G4, após a lavagem das células não aderidas, as soluções (100µL) e o meio de cultura (100µL) foram inseridos nos poços para permanecerem em contato direto com o biofilme e foram incubados por 24 h (G3) e 48 h (G4) a 37°C em microaerofilia. Após os tempos de incubação de cada grupo, os poços foram lavados e fixados com cristal de violeta a 0,4% (figura 12) para leitura no leitor de microplacas (Glomax Multi Detection System, Madison,Wisconsin,EUA) como descrito no item 4.3.5 (figura 13). Os ensaios foram conduzidos em triplicata e com controle esterilidade e de crescimento

A porcentagem de inibição (% I) dos ensaios de aderência inicial, formação e redução do biofilme foi calculada de acordo com Costa et al. (2013), seguindo a fórmula: $\% I = 100 - (DO \text{ ensaio} / DO \text{ controle}) \times 100$



Figura 12: A. Cristal de violeta; B.Colocação do cristal de violeta nos poços da placa; C. Lavagem com água destilada.

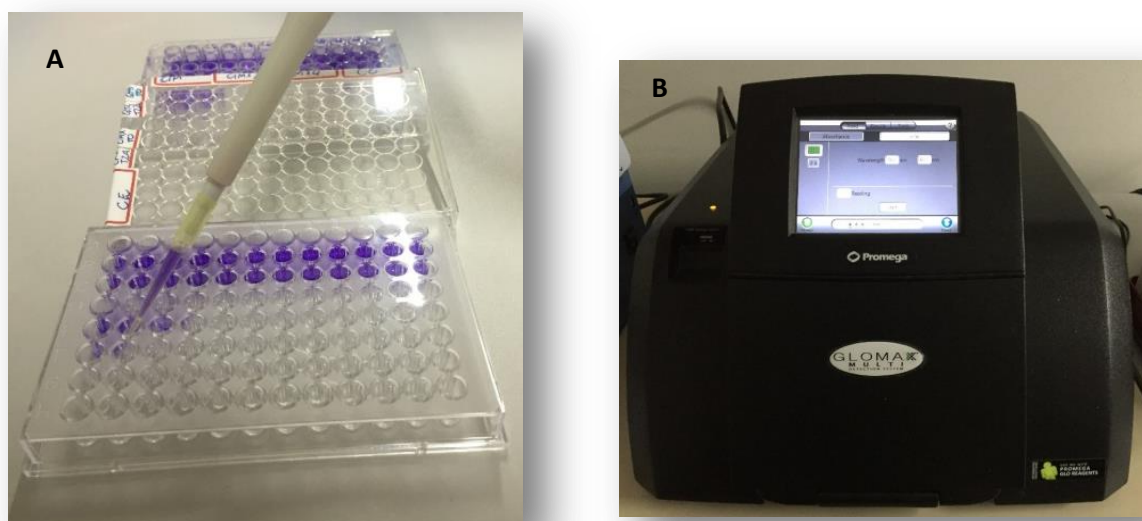


Figura 13: A.Transferência da solução descorada de uma placa para outra; B. Leitor de microplacas.

4.4 Análise Estatística

Os resultados dos testes de FTIR, halo de inibição, CIM e CBM foram analisados descritivamente. Os dados da % I dos ensaios de aderência, formação e redução do biofilme foram analisados pelo software GraphPad InStat, versão 2.0 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA) com nível de significância $\alpha=0.05$, utilizando os testes One-way ANOVA e Tukey para comparação entre as soluções em cada grupo.

5.RESULTADOS

5.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

O espectro de infravermelho da quitosana mostra sobreposição das bandas de absorção referentes às vibrações N-H de amida secundária e N-H amina primária entre $3750-2993\text{ cm}^{-1}$, além de outra absorção N-H de amina primária entre $2990-2841\text{ cm}^{-1}$, devido aos dois hidrogênios da amina presente na quitosana estarem em dois ambientes diferentes, mostrando absorções diferentes. O estiramento de carbonila de amida secundária aparece em 1649 cm^{-1} . Em 1379 cm^{-1} , $1072-1043\text{ cm}^{-1}$ e 898 cm^{-1} apresentam absorções referentes ao estiramento C-N de amida secundária, estiramento C-N de amina primária e deformação fora do plano de N-H de amina primária, respectivamente (figura 14A). O TPP apresenta estiramento em 1211 cm^{-1} referente à ligação P=O; entre 1199 cm^{-1} e 1108 cm^{-1} tem-se estiramentos simétricos de PO₂ e PO₃; e em 893 cm^{-1} e 736 cm^{-1} tem-se os estiramentos assimétricos de PO₃ e PO₂, respectivamente (figura 14B).

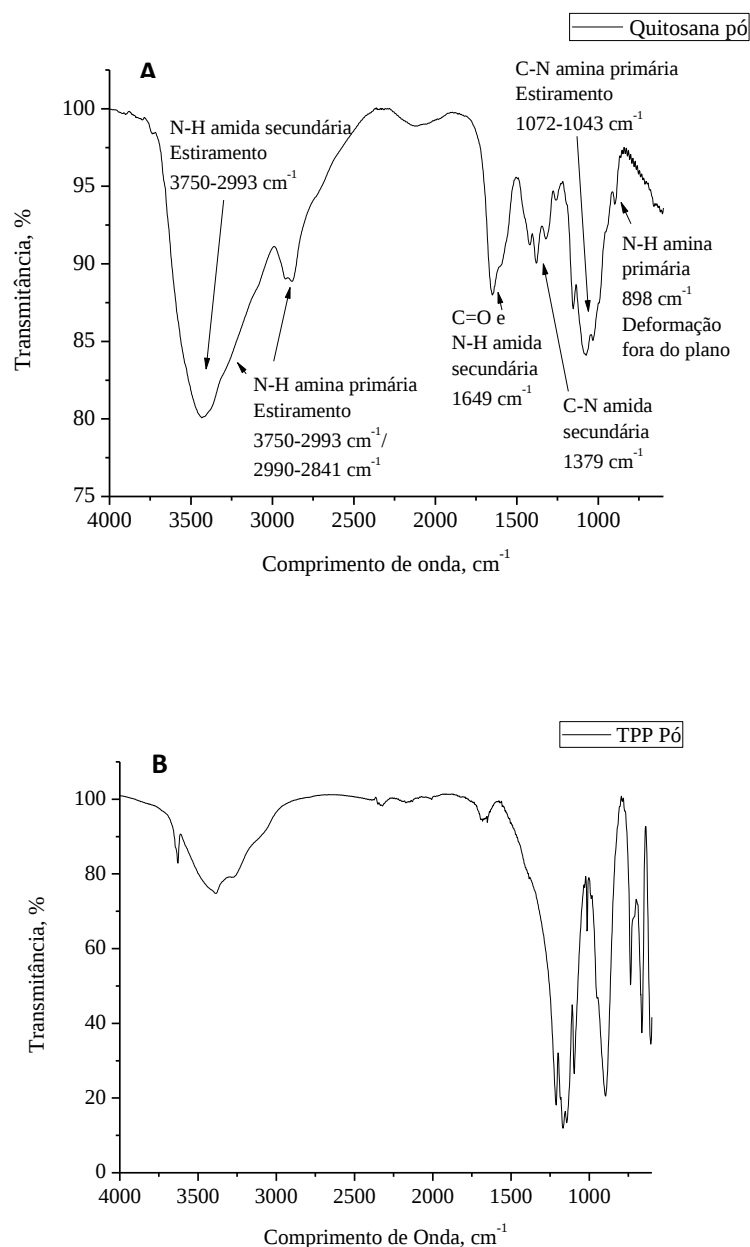


Figura 14: Imagens da espectroscopia de infravermelho (FTIR). A. Pó da quitosana; B. Pó do TPP.

Observa-se no espectro de infravermelho da nanopartícula de quitosana estiramentos de C=O em 1631 cm^{-1} , N-H em 1548 cm^{-1} e C-N em 1408 cm^{-1} relativos à amida secundária. Absorções de amina primária são encontradas entre 1138 cm^{-1} e 952 cm^{-1} devido ao estiramento C-N e deformação fora do plano de N-H em 896 cm^{-1} (figura 15C). Desta forma podemos indicar que provavelmente a houve interação entre os dois compostos (quitosana e TPP), uma vez que houve sobreposição dos espectros de infravermelho.

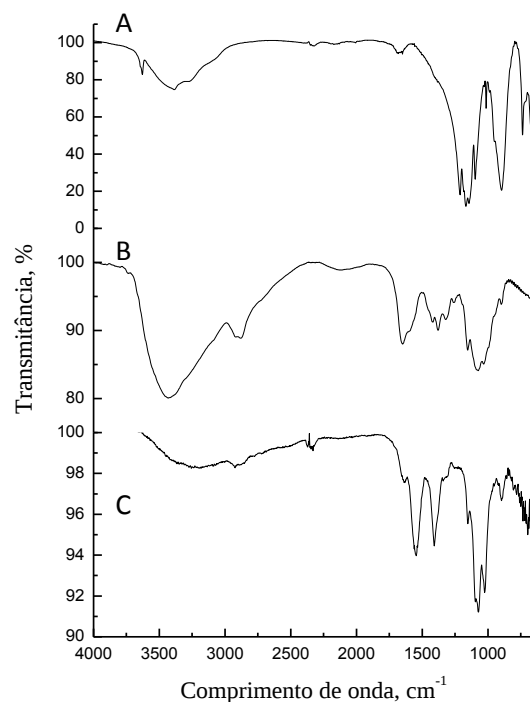


Figura 15: Imagens da espectroscopia de infravermelho (FTIR). A. Pó do TPP; B. Pó da quitosana; C. Nanopartícula de quitosana (liofilizado).

5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Figura 16 mostra que ocorreu formação de nanopartículas de quitosana na solução pelo método de geleificação iônica com adição de TPP. As nanopartículas apresentaram formato regular e arredondado, com tamanho médio de aproximadamente 0,05 μm (50 nm). Foi observada também a formação de agregados de nanopartículas na solução.

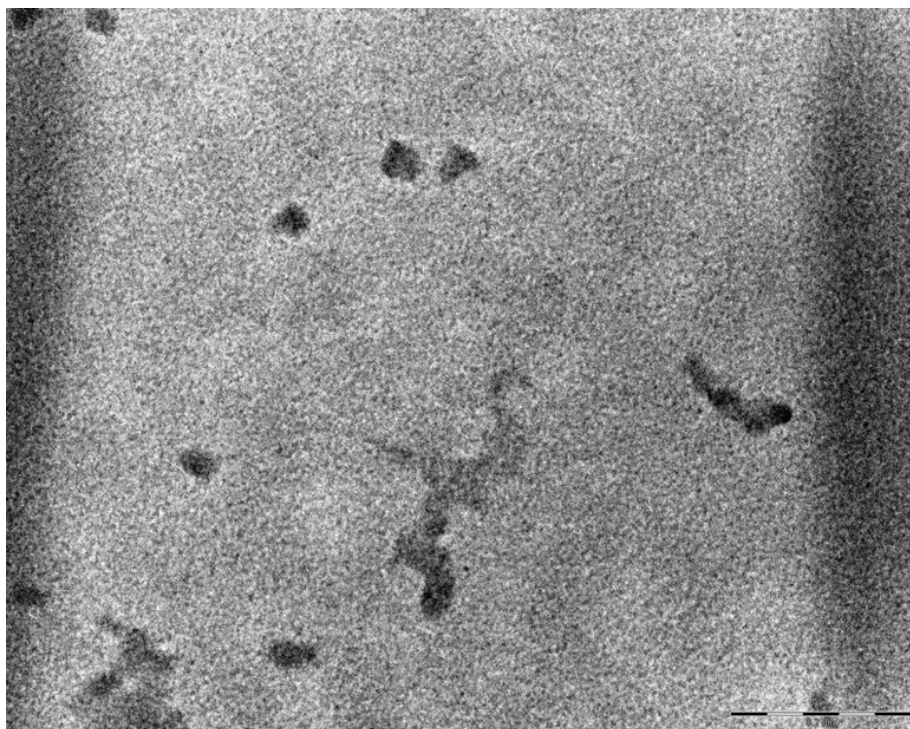


Figura 16. Imagem da formação de nanopartículas de quitosana na solução pelo método de geleificação iônica com adição de TPP em microscopia eletrônica de transmissão. — : Barra de referência de 0,2 μm .

5.3 Teste de difusão em ágar

Os resultados dos halos de inibição das soluções são descritos na Tabela 1. Dentre as soluções de nanopartículas de quitosana a concentração de 3,8 mg/mL mostrou o maior halo de inibição, o que justificou sua utilização nos outros ensaios descritos no estudo. O maior halo de inibição foi da solução de digluconato de clorexidina 0,12% e a solução de ácido acético + TPP não apresentou atividade antimicrobiana.

Tabela 1. Halos de inibição (mm) formados pelas soluções de nanopartículas de quitosana contra *S. mutans*.

Soluções	Halo de inibição (média $\pm$ DP)
Nanopartículas de quitosana 0,95 mg/mL	9,89 $\pm$ 1,45
Nanopartículas de quitosana 1,9 mg/mL	12,37 $\pm$ 3,38
Nanopartículas de quitosana 3,8 mg/mL	12,91 $\pm$ 4,02
Digluconato de Clorexidina 0,12%	27,06 $\pm$ 1,51
Ácido acético 1% + TPP	0,00

5.4 Determinação da CIM E CBM

A CIM e CBM da solução de nanopartículas de quitosana contra o *S. mutans* foi de 475 μ g/mL, a partir do terceiro poço houve crescimento bacteriano, com turvação e formação de botões no fundo dos poços, além da coloração avermelhada exibida pelo corante TCT. Alíquotas dos poços correspondentes à CIM, CIM x 2 foram plaqueadas para a determinação da CBM, conforme mostram as Figuras 17A e 17B, confirmando que não houve crescimento bacteriano nas duas concentrações testadas.

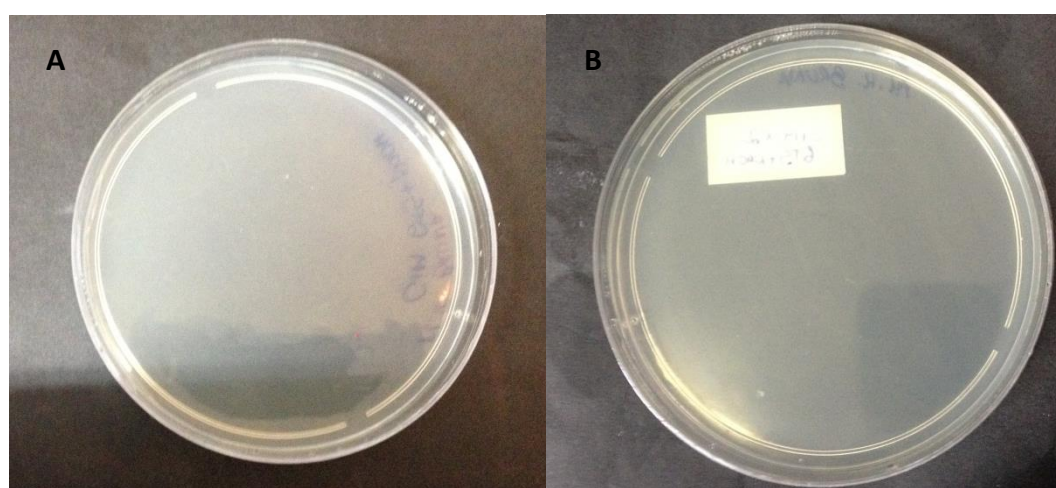


Figura 17: Placas da CBM da solução de nanopartículas de quitosana. A.CIM; B. CIM x2, mostrando ausência de crescimento bacteriano.

5.5 Efeito da solução de nanopartículas de quitosana na aderência inicial e na formação do biofilme de *S. mutans*

A Figura 18 mostra que as soluções de nanopartículas de quitosana na CIM (475 µg/mL), CIMx2 (950 µg/mL) e CIMx4 (3800 µg/mL) inibiram cerca de 40% do crescimento bacteriano durante a fase de aderência inicial (2h), não havendo diferenças significantes entre as soluções ($p= 0,06$). A solução de digluconato de clorexidina mostrou a maior %I (80%) na aderência inicial de *S. mutans* comparada as outras soluções ($p= 0,001$). O efeito das soluções na formação do biofilme de *S. mutans* após um banho de 60 s com as substâncias e incubação por 48h, mostrou que solução de nanopartículas de quitosana de 3800 µg/mL apresentou maior porcentagem de inibição (11%) comparada as outras concentrações ($p= 0,02$), porém possuiu menor %I comparada ao digluconato de clorexidina ($p = 0,001$) (87% de inibição) (figura 19). Em ambos os ensaios a solução salina apresentou mínima %I.

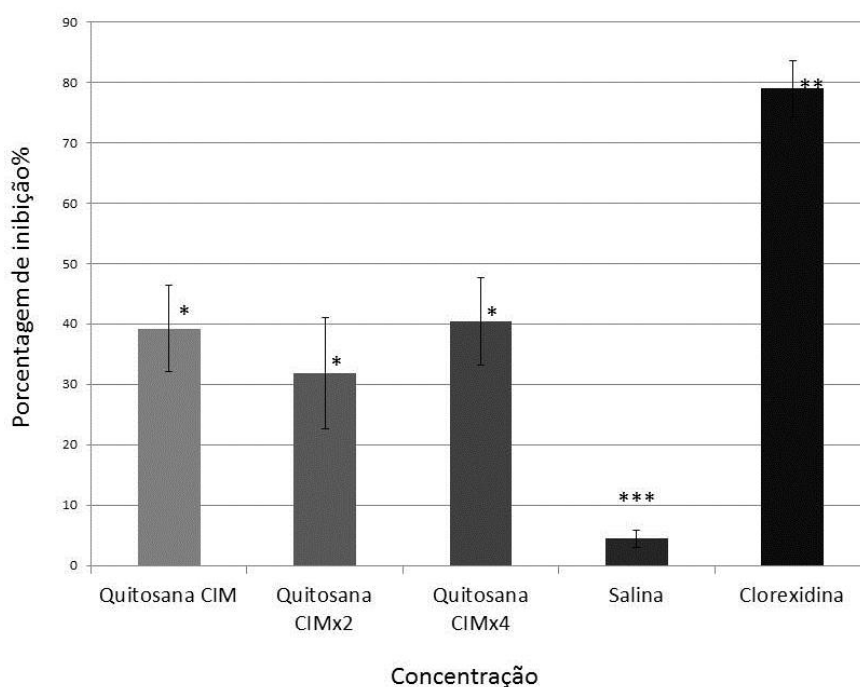


Figura 18. Efeitos inibitórios das soluções de nanopartícula de quitosana na aderência inicial. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de inibição (%I).

*Diferentes caracteres indicam diferença estatisticamente significante entre as soluções pelos testes de One-Way ANOVA e Tukey ($p<0,05$). Os testes foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

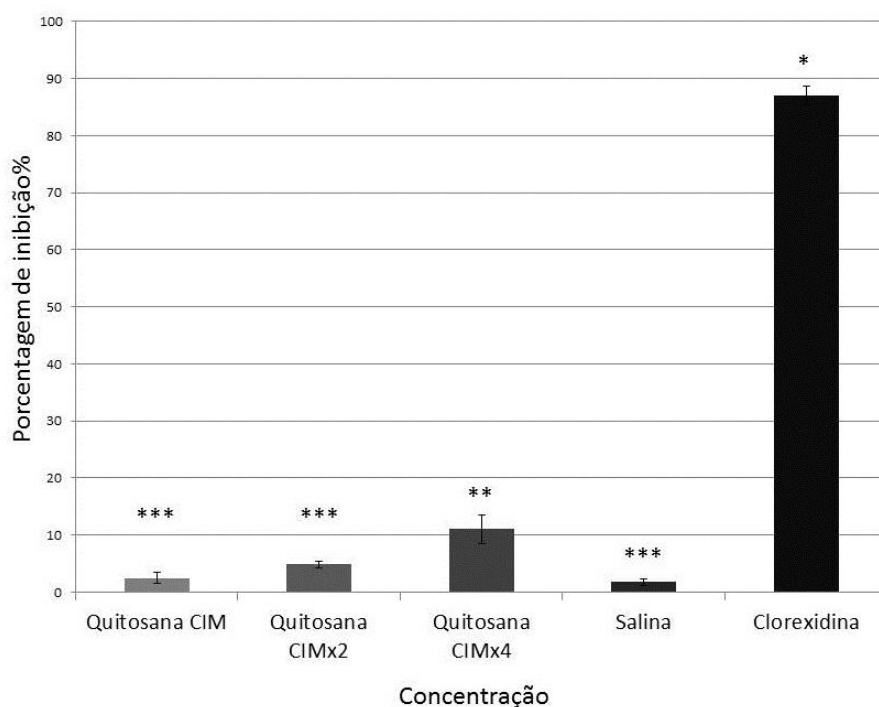


Figura 19: Efeitos inibitórios das soluções de nanopartícula de quitosana na formação de biofilme (2h) de *S. mutans* após um contato de 60 s. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de inibição (%).

*Diferentes caracteres indicam diferença estatisticamente significativa entre as soluções pelos testes de One-Way ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Os testes foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

5.6 Efeito da solução de nanopartículas de quitosana na redução do biofilme maduro de *S. mutans*

Após formação do biofilme maduro (48h) e um banho de 60s com as substâncias (G1) houve inibição do crescimento bacteriano de 5 a 7% para as soluções de nanopartículas de quitosana, independente da concentração ($p = 0,03$), sendo que a solução de digluconato de clorexidina apresentou maior inibição (14%) comparada as outras soluções ($p = 0,001$) (figura 20A). Quando dois banhos de 60s foram realizados após formação do biofilme maduro (G2), a solução de nanopartículas de quitosana na CIM (475 $\mu\text{g/mL}$) não apresentou efeito na redução do crescimento de *S. mutans*, porém as concentrações da solução CIMx2 e CIMx4 (950 $\mu\text{g/mL}$ e 3800 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram cerca de 8 a 13% de inibição, sem diferença significativa entre elas ($p=0,07$). Já a solução de clorexidina apresentou a maior %I (20%) ($p=0,001$) (figura 20B). Nos grupos que

as soluções permaneceram em contato contínuo com o biofilme maduro por 24 h (G3) e 48 h (G4) não houve diferença significativa entre as soluções ($p= 0.251$), de modo que tanto as soluções de nanopartículas de quitosana quanto a de clorexidina apresentaram alta %I do crescimento bacteriano (90 a 100%) (Figuras 20Ce 20D). A solução salina apresentou %I insignificante em todos os grupos.

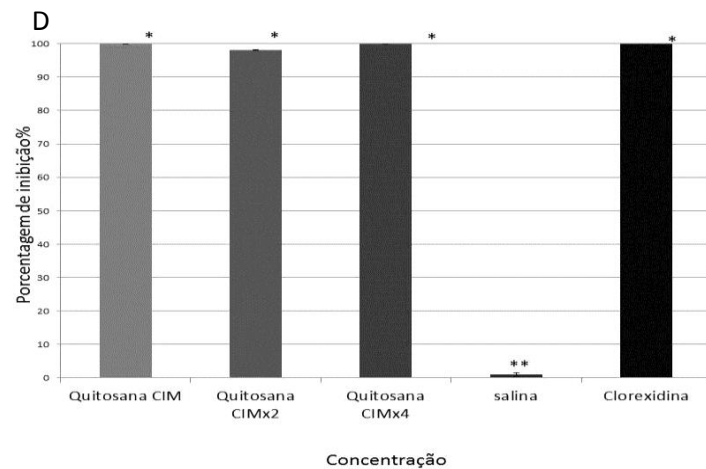
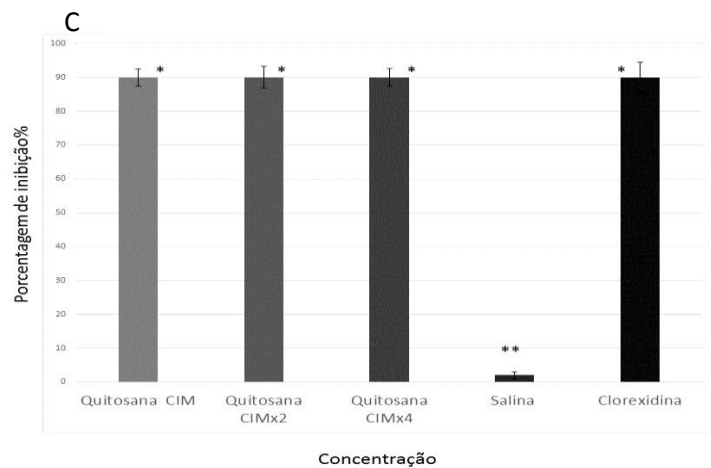
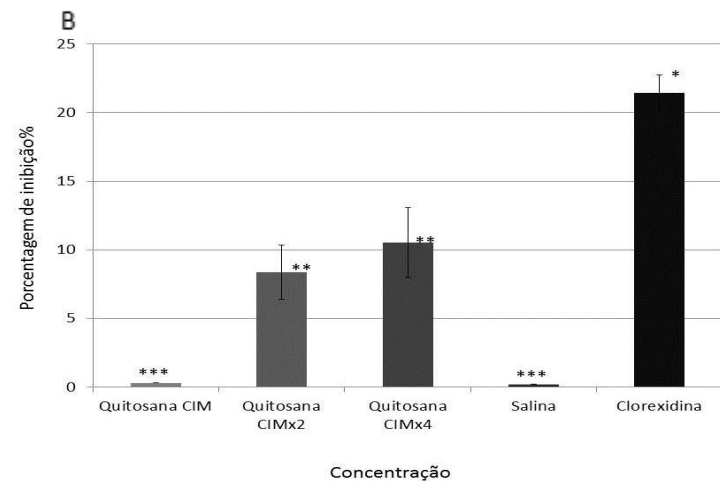
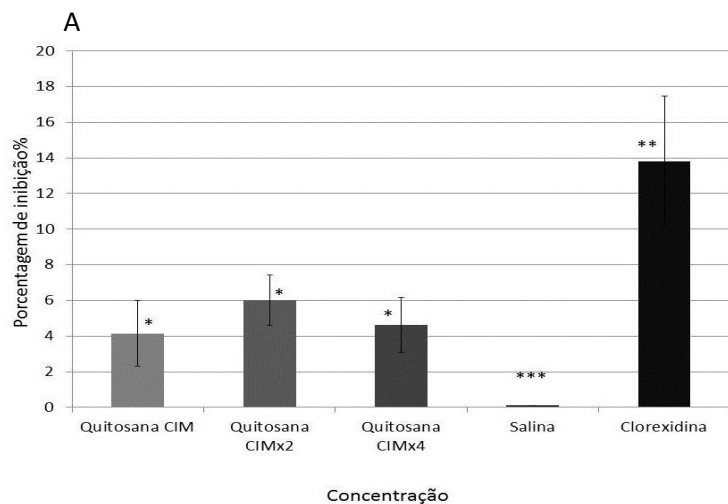


Figura 20. Efeitos inibitórios das soluções de nanopartícula de quitosana sobre biofilme maduro de *S. mutans*. A. Após um contato de 60 s em 24h; B. Dois contatos de 60s, a cada 24h, por 48h; C. Contato direto por 24h; D. Contato direto por 48h. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de inibição (%). *Diferentes caracteres indicam diferença estatisticamente significativa entre as soluções pelos testes de One-Way ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Nota: Os testes foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

6.DISSCUSSÃO

Para a síntese das soluções de nanopartículas de quitosana foi utilizada a quitosana de baixo peso molecular, devido sua atividade antimicrobiana contra bactérias ter sido relatada por alguns autores na literatura (COSTA et al., 2012; CHÁVEZ DE PAZ et al., 2011). Chávez de Paz et al. (2011) observaram que o efeito antimicrobiano das nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular contra *S. mutans* é maior do que as de alto peso molecular. A concentração da quitosana utilizada no presente estudo foi baseada no estudo de Costa et al. (2013), os quais utilizaram as concentrações de 2,0 e 4,0 mg/mL para avaliar o efeito antimicrobiano da quitosana de baixo peso molecular contra *S. mutans*. O pH foi ajustado para 5,5 baseado no estudo de Costa et al. (2014), já que a quitosana possui maior efeito antibacteriano em pH ácido. Outras soluções de bochecho também possuem pH ácido (SUN et al., 2014)

A quitosana pode ser sintetizada em microesferas ou em nanopartículas, as quais possuem a vantagem de serem utilizadas como transportadores de drogas (HUANG et al., 2014; BHATTARAI et al., 2010) pois além de ter uma vida útil longa, as partículas pequenas de quitosana têm uma melhor capacidade de absorção e adesão na superfície dentária para exercerem sua atividade antimicrobiana (LIU et al., 2007). Especificamente, neste estudo as nanopartículas de quitosana (ChNP) foram formadas pelo processo de geleificação iônica com o TPP (ING et al., 2012). A Figura 16 da análise em MET comprovou a formação de ChNP na solução, mostrando que o método de síntese foi adequado para se obter a formação de nanopartículas. Os resultados de FTIR mostraram o espectro das bandas relacionadas à quitosana, já encontrado na literatura (BHUMKAR; POKHARKAR, 2006; CANELLA; GARCIA, 2001; FRANCA et al., 2014), porém ao adicionar o TPP à quitosana (figura 15C) há uma evidente presença dos grupos amina e amida da quitosana na solução, em detrimento dos grupos característicos do TPP, o que pode representar um indício de que a superfície da nanopartícula é composta basicamente de quitosana e que provavelmente o TPP encontra-se no interior da mesma.

O estudo preliminar da atividade antimicrobiana das soluções de nanopartículas de quitosana em diferentes concentrações pela avaliação do halo de inibição mostrou que a inibição de *S. mutans* pelas soluções foi concentração

dependente, de modo que a maior concentração da solução de nanopartículas apresentou a maior inibição (Tabela 1). Além disso, a solução de ácido acético + TPP (controle negativo) não possuiu atividade, mostrando que o efeito antibacteriano obtido foi em decorrência da quitosana. A partir deste resultado a solução de nanopartículas de quitosana de 3800 µg/mL foi utilizada nos outros estudos microbiológicos deste trabalho.

Neste estudo, a solução de nanopartículas de quitosana apresentou CIM e CBM iguais a 475 µg/mL, sendo menor que os valores encontrados em outros estudos que avaliaram CIM/CBM da quitosana contra *S. mutans*, os quais apresentaram valores que variaram de 1,25 mg/mL a 5,0 mg/mL (COSTA et al., 2012; TARSI et al., 1997; BAE et al., 2006). Essas diferenças podem ser explicadas pois os estudos anteriores não utilizaram solução de nanopartículas de quitosana, sendo que as diferenças de tamanho, morfologia, peso molecular e grau de desacetilação da quitosana podem interferir na atividade antimicrobiana, tornando difícil a comparação entre os estudos. Além disso, a variação da cepa do micro-organismo entre os estudos também pode interferir nesta variação.

Para Kong et al. (2010), a atividade antimicrobiana da quitosana é o resultado de uma série de interações que ocorrem entre as moléculas da quitosana e a parede celular da bactéria, sendo a morfologia das moléculas do biopolímero a responsável pela eficácia destas interações e efeito antibacteriano. A estrutura policatiónica da quitosana é um pré-requisito para sua atividade antibacteriana devido às interações eletrostáticas que ocorrem entre a estrutura policatiónica da quitosana e os componentes predominantemente aniônicos da superfície da membrana de micro-organismos (KONG et al., 2010). A maior área superficial e densidade das nanopartículas de quitosana possibilitam maior grau de interação com a superfície das células bacterianas (SILVA, 2012). Desta forma, a forma de síntese da quitosana em nanopartículas do presente estudo pode ter facilitado a interação com *S. mutans* e ter possibilitado menor CIM, com resultado mais favorável que os encontrados nos estudos somente com a solução de quitosana. Os resultados deste estudo mostram que uma menor concentração do biopolímero é necessária para possuir uma atividade antibacteriana contra *S. mutans* quando a quitosana está presente na forma de nanopartículas.

No teste da aderência inicial, não houve diferença estatística significativa entre as soluções de nanopartículas de quitosana nas três diferentes

concentrações (475µg/mL, 950 µg/mL e 3800 µg/mL). As nanopartículas de quitosana inibiram cerca de 40% do crescimento bacteriano durante a fase de aderência inicial (figura 18). Busscher et al. (2008) mostraram 20-30% de inibição de aderência inicial de *S. mutans* quando em contato de 2 min com a solução de 0,1% de quitosana. Por outro lado, Costa et al. (2012) encontraram valores de inibição da aderência inicial maiores, chegando a 99%, porém foram utilizadas concentrações mais altas do biopolímero (2,0 mg/mL e 4,0 mg/mL) em 90s. Acredita-se que a adesão entre as bactérias e a superfície dentária ocorra devido às interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Estas interações podem ser interrompidas pelos derivados da quitosana por causa da concorrência pela carga positiva do grupo amina (POURESLAMI, 2012). As paredes das células das bactérias gram-positivas, como *S. mutans*, possuem peptideoglicanos e ácido teicóico. O ácido teicóico é um polímero polianiónico da parede destas células que atravessam a parede para entrar em contato com a camada de polipeptideoglicanos. O ácido teicóico pode também ser covalentemente ligado ao ácido N-acetilmurâmico da camada de peptidoglicano ou pode ser ancorado na camada mais exterior da membrana citoplasmática através de glicolipídicos, os quais são chamados de ácidos lipoteicóico (KONG et al., 2010). Sendo assim, o ácido teicóico é o responsável pela estabilidade estrutural da parede celular das bactérias gram-positivas (KONG et al., 2010). A interação das bactérias gram-positivas com a quitosana (policatiônica) ocorre por meio eletrostático com os poliânions de ácidos teicóicos, da mesma forma que nas bactérias gram-negativas esta interação ocorre pelos lipopolissacarídeos (LPS) (KONG et al., 2010).

Após a adesão de 2h e contato de 60s com a solução, simulando o tempo de bochecho na cavidade bucal, e incubação por 48 h com o objetivo de avaliar o potencial das soluções de nanopartículas de quitosana em inibir a formação do biofilme, a porcentagem de inibição de todas as soluções diminuíram, porém a solução de 3800 µg/mL apresentou maior inibição (11%) comparada às outras duas concentrações (figura 19). Essa diminuição da %I de crescimento bacteriano pode estar relacionada à capacidade do *S. mutans* de sobreviver e persistir dentro do biofilme, bem como e à sua virulência. Para Koo et al. (2010), a matriz extracelular fornece estabilidade mecânica que mantém um arranjo espacial e que pode dificultar a difusão de substâncias através do biofilme. Aliado a este fato, o tempo de contato das soluções com os micro-organismos também

pode ter influenciado na redução da porcentagem de inibição, sendo que no presente estudo 60 s podem ter sido insuficientes para uma adequada atividade antimicrobiana do biopolímero. No estudo de Costa et al. (2012), a quitosana apresentou eficiente redução bacteriana após aderência inicial com contato direto com o *S. mutans* por 24 h.

Embora o presente estudo seja *in vitro*, o mesmo foi inovador em avaliar o efeito de soluções de nanopartículas de quitosana com tempo de contato de bochecho no biofilme maduro de *S. mutans*. Chávez de Paz et al. (2011) avaliaram o efeito antimicrobiano da solução de nanopartículas de quitosana no biofilme maduro de *S. mutans*, porém em contato direto de 2h com as soluções. Nos ensaios de avaliação de redução do biofilme maduro (G1 e G2) simulando bochechos de 60s ao dia, observou-se que a capacidade das nanopartículas de quitosana em inibir o crescimento das bactérias, nas concentrações de 950 µg/mL e 3800 µg/mL, aumentou com o aumento do tempo de contato pelos banhos de 60s. Em 24 h, com um banho de 60s, a porcentagem de inibição foi de 5-7% passando para 8-13% em 48h, com dois banhos de 60s (figuras 20A e 20B). Os valores baixos de inibição de *S. mutans* nestes ensaios podem mostrar que as soluções de nanopartículas de quitosana utilizadas possuem efeito bacteriostático e a sua eficácia clínica dependerá do tempo de contato e frequência do uso das soluções.

Diferentemente, quando as soluções de nanopartículas de quitosana permaneceram em contato direto por 24h (G3) e 48h (G4) com o biofilme maduro, as mesmas inibiram cerca de 90% do crescimento bacteriano em 24h e 99,9% em 48h, não havendo diferença estatística entre as três concentrações e a solução de digluconato de clorexina 0,12% (figuras 20C e 20D). Estes resultados mostram que com o aumento do tempo de contato das soluções com *S. mutans*, as soluções de nanopartículas de quitosana possuem atividade bactericida mesmo na CIM (475 µg/mL), não importando o aumento da concentração, possuindo até um efeito bactericida similar ao da clorexidina 0,12%. Nosso estudo possuiu maior %I (99,9%) com concentração menor de quitosana (475 µg/mL) nas mesmas condições do estudo de Costa et al. (2013), os quais utilizaram concentrações de 1, 2 e 4 mg/mL de quitosana em contato contínuo com *S. mutans* por 48 h e encontraram % I de 20 a 40% para quitosana de baixo peso molecular. O melhor resultado do nosso estudo se deve ao fato da síntese da

quitosana em nanopartículas, não utilizada no estudo de Costa et al. (2013). Assim, é provável que as nanopartículas de quitosana consigam penetrar no interior do biofilme mais facilmente e interagir com o ácido teicóico da parede celular das bactérias, resultando na distorção e ruptura da parede celular, expondo a membrana celular ao choque osmótico, ocorrendo exsudação de seu conteúdo citoplasmático e, finalmente, a morte celular (HAYASHI et al., 2007). Além disso, a atividade bactericida por 48 h em um biofilme de 96h é um indicio de potencial substantividade da solução, o qual caracteriza-se pelo tempo de permanência ativa na cavidade bucal, como ocorre com o digluconato de clorexidina.

A solução de digluconato de clorexidina 0,12% apresentou resultados significativamente superiores aos das soluções de nanopartículas de quitosana na inibição de aderência e formação do biofilme de *S. mutans* (Figuras 18 e 19), porém deve-se considerar que não foi encontrada a CIM da clorexidina, portanto a ação antibacteriana da CIM da ChNP foi comparada à concentração de clorexidina normalmente utilizada para bochechos. De todos os antimicrobianos utilizados em odontologia, a clorexidina é ainda o agente mais frequentemente usado para reduzir o biofilme dentário, com efetividade contra bactérias associadas a cárie dentária, principalmente *S. mutans* (RUIZ-LINHARES et al., 2014; THOMAS et al., 2015; AGHILI et al., 2015). Segundo Zanatta e Rosing (2007), a clorexidina apresenta substantividade, de aproximadamente 12 horas, o que é explicado pela sua natureza dicatiônica. Por outro lado, Franca et al. (2014) salientaram que além de não haver evidências de resultados clínicos do uso da clorexidina a longo prazo, essa substância pode acarretar efeitos colaterais como alteração de paladar, coloração dos dentes e sensação de ardência nos tecidos moles. Diante disso, torna-se interessante avaliar o desenvolvimento de soluções antimicrobianas, como a solução de nanopartículas deste estudo, que apresente compostos naturais, ausência de toxicidade, biocompatibilidade, atividade antimicrobiana e adequada substantividade para ser clinicamente utilizada.

A solução de nanopartículas sintetizada neste estudo ainda é experimental, necessitando de estudos de estabilidade das nanopartículas sintetizadas e de futuros ensaios microbiológicos em biofilme multi-espécie, além de avaliação da biocompatibilidade. Este foi o primeiro estudo que mostrou que a solução com baixa concentração de nanopartículas de quitosana possuiu ação bactericida

contra biofilme de *S. mutans* permanecendo com atividade por 48h, entretanto, quando utilizada como solução para um bochecho diário por 60s, a inibição de bactérias no biofilme foi baixa, sendo necessário investigar uma maior frequência de contato da solução com o biofilme. Porém, estes resultados podem sugerir outras formas de aplicação da solução de nanopartículas de quitosana, como incorporação em materiais odontológicos, dentifrícios, solução para irrigação subgengival, e até mesmo a incorporação em soluções de clorexidina visando um prolongamento da liberação do fármaco na cavidade bucal.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados, conclui-se que:

1. A espectroscopia de infravermelho comprovou a presença de grupos característicos da quitosana e TPP na solução sintetizada, podendo representar um indício de que a superfície da nanopartícula é composta basicamente de quitosana e que o TPP encontra-se em seu interior;
2. A MET mostrou que o método de geleificação iônica foi eficaz na síntese de nanopartículas de quitosana, apresentando tamanhos médios aproximadamente de 0,05 μm (50 nm);
3. Houve atividade antibacteriana contra *S. mutans*, sendo encontrado o valor de 475 $\mu\text{g/mL}$ de CIM e CBM;
4. A solução de nanopartículas de quitosana (CIM, CIMx2 e CIMx4) inibiu cerca de 40% do crescimento bacteriano durante a fase de aderência inicial;
5. A solução de nanopartículas de quitosana quando em contato contínuo apresentou de 90 a 100% de inibição do crescimento de *S. mutans* em biofilme maduro (com tempo de ação de até 48h). Porém, quando utilizada em contato por 60s, a solução de nanopartículas de quitosana exibiu baixa porcentagem de inibição (5 a 13%).

REFERÊNCIAS*

1. Aghili,H;Nadoushan,AAJ;Herandi,V.Antimicrobial Effect of Zataria Multiflora Extract in comparison with Chlorexidine Mouthwash on Experimentally Contaminated Orthodontic Elastomeric Ligatures. Journal of Dentistry.2015;12(1):1-10.
2. Ahmed,A;Dachang,W;Lei,Z;Jianjun,L;Juanjuan,Q;Yi,X. Effect of Lactobacillus species on Streptococcus mutans biofilm formation.Journal of Pharmaceutical Science.2014;27(5):1523-1528.
3. Arnaud, TMS; Neto, BB; Diniz, FB. Chitosan effect on dental enamel remineralization: An in vitro evaluation. Journal of dentistry. 2010;38:848-852.
4. Aydin,RST;Pulat,M. 5-Fluorouracil Encapsulated Chitosan Nanoparticles for pH-Stimulated Drug Delivery: Evaluation of Controlled Release Kinetics. Journal of Nanomaterials.2012;2012. doi:10.1155/2012/313961.
5. Bae,K;Jun,EJ;Lee,SM;Paik,DI;Kim,JB. Effect of water-soluble reduced chitosan on Streptococcus mutans, plaque regrowth and biofilm vitality.Clinical Oral Investigations.2006;10:102-107.
6. Bedran,TBL; Grignon,L; Spolidorio,DP; Grenier,D. Subinhibitory Concentrations of Triclosan Promote Streptococcus mutans Biofilm Formation and Adherence to Oral Epithelial Cells.Plosone.2014;9(2):1-7.
7. Bhattarai,N; Gunn,J;Zhang,M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews.2010;62:83-99.
8. Bhumkar,DR;Pokharkar,VB. Studies on Effect of pH on Cross-linking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note.AAPS Pharmaceutical Science Technology.2006;7(2):1-6.
9. Busscher, HJ; Engels, E; Dijkstra, RJB; Van Der Mei, HC. Influence of a chitosan on oral bacterial adhesion and growth in vitro. European Journal of Oral Sciences.2008; 116:493-495.
10. Canella,KMNC;Garcia,RB. Caracterização de quitosana por permeação em gel-Influência do método de preparação e do solvente. Química Nova.2001;24(1):13-17.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

11. Carvalho, MMSG de; Stamford, TCM; Santos,EP dos; Tenório,P;Sampaio,F. Chitosan as an oral antimicrobial agent. *Science against Microbial Patogens: Communicating Current Research and Technological Advances*.2011;1(3):542-550.
12. Chávez de Paz, LE; Resin, A; Howard, KA; Sutherland, DS; Wejse, PL. Antimicrobial Effect of Chitosan Nanoparticles on *Streptococcus mutans* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011; 77 (11): 3892–3895.
13. Chen,CY;Chung,YC. Antibacterial effect of water-soluble chitosan on representative dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli brevis*. *Journal of Applied Oral Science*. 2012;20(6):620-7.
14. Coelho,JF;Ferreira,PC;Alves,P;Cordeiro,R;Fonseca,AC;Góis,JR;Gil,MH. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments.*EPMA journal*.2010;1:164-209.
15. Costa Silva, HSR; Santos, KSCR; Ferreira,EI. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quimica Nova*.2006;.29(4):776-785
16. Costa, EM; Silva, S; Tavaría, FK; Pintado, MM. Study of the effects of chitosan upon *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation. *Anaerobe*.2013; 20:27-31.
17. Costa,EM;Silva,S;Madureira,AR;CardelleCobas,A;Tavaria,FK;Pintado,M M.A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwashupon oral microorganism's biofilm formation in vitro. *Carbohydrate Polymers*.2014;101: 1081-1086.
18. Costa,EM;Silva,S;Pina,C; Tavaría,FK; Pintado,MM. Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens.*Anaerobe*.2012;18:305-309.
19. Dash, M; Chiellini, F;Ottenbrite, RM;Chiellini, E. Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*.2011;36(8):981–1014.
20. Djordjevic,D;Wiedmann,M;McLandsborough,LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria mono-cytogenes* biofilm formation, *Applied and Environmental Microbiology*.2002;68:2950-2958.

21. Franca, JR; Luca,MPde; Ribeiro,TG; Castilho,RO;Moreira,NA; Santos,VR; Faraco,AAG. Propolis - based chitosan varnish: drug delivery,controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria.BMC Complementary and Alternative Medicine.2014;14:478-489.
22. Gagari E;Kabani S. Adverse effects of mouthwash use: A review. Oral Surg.Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1995; 80(4):432–439.
23. Hamidreza Poureslami (2012). The Effects of Plant Extracts on Dental Plaque and Caries, Contemporary Approach to Dental Caries, Dr. Ming-Yu Li (Ed.), ISBN: 978-953-51-0305-9, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/contemporary-approach-to-dental-caries/early-childhood-caries>
24. Hayashi,Y;Ohara,N;Ganno,T;Yamaguchi,K;Ishizaki,T;Nakamura,T;Sato, M. Chewing chitosan-containing gum effectively inhibits the growth of cariogenic bacteria. Archives of oral biology.2007;52:290-294.
25. Hejazi,R;Amiji,M. Chitosan–based gastrointestinal delivery systems. Journal of Controlled Release.2003;89(2):151-165.
26. Helander, IM; Nurmiäho-Lassila, E-L;Ahvenainen,R; Rhoades,J; Roller,S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. International Journal of Food Microbiology.2001;71:.235-244.
27. Huang,YC;Chen,JK;Lam,UI;Chen,SY. Preparing, characterizing, and evaluating chitosan/fucoidan nanoparticles as oral delivery carriers.Journal of Polymers Researches.2014;21:415-424.
28. Ing, LY; Zin, NM; Sarwar,A; Katas, H. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. International Journal of Biomaterials.2012; 2012.
29. Kong, M; Chen, XG; Xing,K; Park,H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. International Journal of Food Microbiology.2010;144:51-63,
30. Koo,H; Xiao, J; Klein, MI; Jeon, JG. Exopolysaccharides produced by Streptococcus mutans glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. Journal of Bacteriology.2010; 192(12):3024-3032

31. Laranjeira, MCM; Fávere, VTde. Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*. 2009; 32(3): 672-678.
32. Lima, JMde; Sarmiento, RR; Souza, JRde; Brayner, FA; Feitosa, APS; Padilha, R; Alves, LC; Porto, IJ; Batista, RFBD; Oliveira, JEde; Medeiros, ESde; Bonan, PRF; Castellano, LR. Evaluation of Hemagglutination Activity of Chitosan Nanoparticles Using Human Erythrocytes. *Biomed Research International*. 2015:1-6. Article ID 247965.
33. Liu, H; Chen, B; Mao, Z; Gao, C. Chitosan Nanoparticles for Loading of Toothpaste Actives and Adhesion on Tooth Analogs. *Journal of Applied Polymer Science*. 2007; 106: 4248–4256.
34. Liu, H; Du, Y, Wang, X; Sun, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; 95: 147-155.
35. Marinho, BVS; Araújo, ACS. Use mouthwash in gingivitis and dental biofilm. *International Journal of Dentistry*. 2007; 6(4): 124-131.
36. Marsh, PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *Journal of Dentistry*. 2010; 38(Suppl.11), S11–S15.
37. NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
38. Neilands, J; Sutherland, A; Resin, A; Wejse, PL; Chávez de Paz, LE. Chitosan Nanoparticles Affect the Acid Tolerance Response in Adhered Cells of *Streptococcus mutans*. *Caries Research*. 2011; 45: 501-505.
39. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006; 31: 603-632.
40. Ruiz-Linares, M; Ferrer-Luque, CM; Arias-Moliz, T; Castro, P de; Aguado, B; Baca P. Antimicrobial activity of alexidine, chlorhexidine and cetrimide against *Streptococcus mutans* biofilm. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2014 Aug 20; 13: 41
41. São Pedro, AS; Cabral-Albuquerque, E; Ferreira, D; Sarmiento, B. Chitosan: an option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care? *Carbohydrate Polymers*. 2009; 76: 501-508.

42. Shu,XZ;Zhu,KJ. A novel approach to prepare tripolyphosphate:chitosan chitosan beads: the influence of anion structure.International Journal of Pharmaceutics.2000;201:51-58.
43. Shu,XZ;Zhu,KJ. Controlled drug release properties of ionically cross-linked. complex beads for controlled release drug delivery. International Journal of Pharmaceutics.2002;233:217-225.
44. Silva, RLda. Sistema de liberação controlada de quitosana contendo antígeno capsular Vi de *Salmonella* Typhi [dissertação]. Belém: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará; 2012.
45. Sun,FC;Engelman,EE;Mcguire,JA;Kosmoski,G;Carratello,L;RicciNittel,D; Zhang,JZ;Schemehorn,BR;Gambogi,RJ. Impact of an Anticaries Mouthrinse on In Vitro Remineralization and Microbial Control.International Journal of Dentistry.2014. Article ID 982071.
46. Tagliari,MP. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana e alginato de sódio para incorporação de ácido glicirrízico,ácido salicílico ou cafeína visando liberação tópica [tese]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2012.
47. Tarsi,R;Muzzarelli,RAA;Guzman,CA;Pruzzol,C. Inhibition of Streptococcus mutans adsorption to Hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans.Journal of Dentistry Research.1997;76(2):665-672.
48. Tavares, IS. Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana [dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2011.
49. Teitelbaum,AP. Avaliação do controle mecânico e químico do biofilme dental em pacientes portadores de síndrome de down [dissertação].Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa;2008.
50. Thomas,A;Thakur,S;Mhambrey,S. Comparison of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine, sodium fluoride, fluoride with essential oils, alum, green tea, and garlic with lime mouth rinses on cariogenic microbes.Journal of International Society of Preventive and Community.2015;5(4):302-308.

51. Torres,CRG;Kubo,CH;Anido,AA;Rodrigues,JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos.2000;3(2):43-52.
52. Zanatta,FB;Rosing,CK. Clorexidina: Mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival.Scientific-A.2007;1(2):35-43.