

**UNIVERSIDADE PAULISTA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ODONTOLOGIA**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTOXICIDADE EM  
CÉLULAS HUMANAS DE CIMENTOS DE IONÔMERO  
DE VIDRO MODIFICADOS POR QUITOSANA  
E HIDROXIAPATITA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

**GABRIEL PERES COLONELLO**

**São Paulo**  
**2021**

**UNIVERSIDADE PAULISTA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ODONTOLOGIA**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTOXICIDADE EM  
CÉLULAS HUMANAS DE CIMENTOS DE IONÔMERO  
DE VIDRO MODIFICADOS POR QUITOSANA  
E HIDROXIAPATITA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cintia Helena Coury Saraceni.

**GABRIEL PERES COLONELLO**

**São Paulo**  
**2021**

Colonello, Gabriel Peres.

Atividade antimicrobiana e citotoxicidade em células humanas de cimentos de ionômero de vidro modificados por quitosana e hidroxiapatita / Gabriel Peres Colonello. - 2021.

17 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Dentística.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cintia Helena Coury Saraceni.

1. Biocompatibilidade. 2. Materiais biocompatíveis. 3. Cimentos ionoméricos. 4. *Streptococcus mutans*. 5. Cultura de células.

I. Saraceni, Cintia Helena Coury (orientadora). II. Título.

**GABRIEL PERES COLONELLO**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTOXICIDADE EM  
CÉLULAS HUMANAS DE CIMENTOS DE IONÔMERO  
DE VIDRO MODIFICADOS POR QUITOSANA  
E HIDROXIAPATITA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista - UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_- \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cintia Helena Coury Saraceni  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_- \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Carleto Andia  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_- \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Prof. Dr. Luciano de Souza Gonçalves  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho de pesquisa ao meu *nonno*, Gino Giusepino Colonello (*in memoriam*), meu maior incentivador desde o início da minha vida acadêmica, acompanhando de perto todas as minhas dificuldades e conquistas.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela força e sabedoria que me concede hoje e sempre.

Aos meus pais e familiares pelo apoio incondicional principalmente nos momentos mais difíceis. A todos os meus amigos e colegas de curso pelos bons momentos compartilhados.

À Universidade Paulista - UNIP, sua estrutura, corpo docente e todos seus funcionários, que com comprometimento e excelência tornou possível o desenvolvimento da pesquisa.

À minha orientadora, Profa. Cintia Helena Coury Saraceni pela oportunidade, parceria, dedicação, paciência e profissionalismo. Todo o apoio e atenção dedicados foram imprescindíveis para a elaboração e execução deste trabalho. Agradeço, também, aos professores Adriano Fonseca de Lima, Denise Carleto Andia e Ivana Barbosa Suffredini que contribuíram grandemente na execução dos experimentos.

À Michelle Sanchez Freitas Correia e todos os funcionários do laboratório de pesquisa da Universidade Paulista pela disponibilidade em fornecer os conhecimentos e contribuírem diretamente na realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela bolsa concedida, viabilizando meus estudos e o desenvolvimento do trabalho.

*“Mesmo que a vida pareça difícil, há sempre algo que você possa fazer para ter sucesso nela.”*

*(Stephen Hawking)*

## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a ação antimicrobiana e a citotoxicidade em células da polpa dentária humana (CPDHs) de CIV modificados com quitosana (QT) e hidroxiapatita (HAP). Amostras de 6x3mm de CIV modificados por 0,16%, 2% e 5% de quitosana e 2%, 5% e 10% de hidroxiapatita foram avaliadas quanto à ação antimicrobiana sobre biofilme bacteriano de *S. mutans* por meio de ensaio de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), em dois tempos, 24h e 7 dias (n=30). Para avaliação da citotoxicidade, amostras de 10x1mm de CIV controle (CIV-CT) e modificados por 2% de quitosana (CIV-QT) e 5% de hidroxiapatita (CIV-HAP) foram confeccionadas e avaliadas em dois tempos, imediato e 24 horas (n=6). As amostras dos grupos 24 horas foram mantidas em placa de Petri com umidade relativa antes de serem imersas no meio de cultura (DMEM), enquanto que as amostras dos grupos imediato foram manipuladas e colocadas no meio de cultura após 8 minutos. Para avaliar a viabilidade mitocondrial de CPDHs após os tratamentos, foi realizado o ensaio MTT nos grupos experimental e controle (meio de cultura puro). Para análise de morte celular, CPDHs expostas aos extratos foram colhidas e avaliadas por citometria de fluxo usando corante de ácido nucleico 7-Amino-Actinomicina (PE-7AAD) e proteína de ligação de fosfolípídeo anexina V (FITC-Anexina V). O pH dos extratos foi determinado por meio de um medidor de pH de bancada digital. Para o teste antimicrobiano, foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para determinar o perfil não paramétrico dos grupos. Em seguida, foi realizado Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunnett, com  $p < 0.05$ . Para o teste de viabilidade celular, a análise de Variância a dois critérios (ANOVA two-way) foi aplicada para comparação dos grupos experimentais, considerando como fatores "CIV" e "tempo de análise". A comparação entre os grupos foi realizada teste de Tukey. Para comparação dos grupos experimentais com o controle meio de cultura puro (G1), foi realizado o teste de Dunnett com  $p < 0.05$ . Como resultado do teste antimicrobiano, 0,16% de quitosana ao CIV apresentou menor quantidade de bactérias aderidas em 24 horas e em 7 dias, enquanto que 2% apresentou menor quantidade de bactérias em 7 dias. O CIV incorporado de hidroxiapatita na concentração de 5% apresentou redução bacteriana após 7 dias. Os cimentos incorporados com 2% de QT e 5% de HAP foram eleitos para a realização do teste de citotoxicidade. Em relação à citotoxicidade, para o ensaio de MTT, no tempo imediato todos os materiais apresentaram toxicidade



semelhante às CPDHs. Após 24 horas, o CIV-QT teve menor toxicidade em comparação com os demais materiais ( $p < 0.05$ ), que apresentaram redução do metabolismo celular semelhante para 24 horas. Quanto à análise de morte celular, a porcentagem de células viáveis para CIV-CT foi de 66,8% e 69,5% para os grupos imediato e 24h, respectivamente, para CIV-QT foi de 70,5% e 71,4% para os grupos imediato e 24h, respectivamente e para CIV-HAP foi de 66,9% e 69,7% para os grupos imediato e 24h, respectivamente. A apoptose foi o mecanismo principal desencadeado pelas CPDHs. A citotoxicidade para todos os eluatos, com exceção do controle meio, foi considerada leve. A incorporação de 2% de quitosana e 5% de hidroxiapatita potencializaram a ação antimicrobiana do CIV; Todos os cimentos apresentaram citotoxicidade leve. O CIV modificado por quitosana foi o que apresentou maior viabilidade celular após 24 horas. A incorporação de hidroxiapatita não alterou a característica citotóxica do cimento.

Palavras-chave: Biocompatibilidade. Materiais biocompatíveis. Cimentos ionoméricos. *Streptococcus mutans*. Cultura de Células.

## ABSTRACT

To evaluate the antimicrobial action and cytotoxicity in human dental pulp cells (HDPCs) of GICs modified with chitosan (CH) and hydroxyapatite (HAP). 6x3mm samples of CIV modified by 0.16%, 2% and 5% chitosan and 2%, 5% and 10% hydroxyapatite were evaluated for antimicrobial action on bacterial biofilm of *S. mutans* by MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium), in two times, 24h and 7 days (n=30). To evaluate cytotoxicity, 10x1mm samples of control GIC (GIC-CT) and modified by 2% chitosan (GIC-CH) and 5% hydroxyapatite (GIC-HAP) were prepared and evaluated at two times, immediate and 24 hours. (n=6). The samples from the 24h groups were kept in a Petri dish with relative humidity before being immersed in the culture medium (DMEM), while the samples from the immediate groups were manipulated and placed in the culture medium after 8 minutes. To evaluate the mitochondrial viability of HDPCs after the treatments, the MTT assay was performed in the experimental and control groups (pure culture medium). For cell death analysis, HDPCs exposed to the extracts were harvested and evaluated by flow cytometry using 7-Amino-Actinomycin (PE-7AAD) nucleic acid dye and annexin V phospholipid binding protein (FITC-Annexin V). The pH of the extracts was determined using a digital benchtop pH meter. For the antimicrobial test, the Shapiro-Wilk normality test was applied to determine the non-parametric profile of the groups. Then, Kruskal-Wallis was performed followed by Dunnett's test, with  $p < 0.05$ . For the cell viability test, two-way analysis of variance (two-way ANOVA) was applied to compare the experimental groups, considering as factors "GIC" and "time of analysis". The comparison between groups was performed using the Tukey test. To compare the experimental groups with the control pure culture medium (G1), the Dunnett's test was performed with  $p < 0.05$ . As a result of the antimicrobial test, 0.16% of chitosan to the GIC had a lower amount of bacteria adhered in 24h and in 7 days, while 2% had a lower amount of bacteria in 7 days. The GIC incorporated with hydroxyapatite at a concentration of 5% showed bacterial reduction after 7 days. Cements incorporated with 2% CH and 5% HAP were chosen for the cytotoxicity test. Regarding cytotoxicity, for the MTT assay, in the immediate time all materials showed toxicity similar to HDPCs. After 24 hours, GIC-CH had lower toxicity compared to the other materials ( $p < 0.05$ ), which showed a similar reduction in cellular metabolism at 24h. Regarding the analysis of cell death, the percentage of viable cells for GIC-CT was 66.8% and

69.5% for the immediate and 24h groups, respectively, for GIC-CH it was 70.5% and 71.4 % for the immediate and 24h groups, respectively, and for GIC-HAP was 66.9% and 69.7% for the immediate and 24h groups, respectively. Apoptosis was the main mechanism triggered by HDPCs. Cytotoxicity for all eluates, with the exception of the medium control, was considered slight. The incorporation of 2% chitosan and 5% hydroxyapatite potentiated the antimicrobial action of GIC; All cements showed slight cytotoxicity. The chitosan-modified GIC showed the highest cell viability after 24 hours. The incorporation of hydroxyapatite did not change the cytotoxic characteristic of the cement.

Keywords: Biocompatibility. Biocompatible materials. Ionomeric cements. Streptococcus mutans. Cell Culture.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>11</b>
<b>2 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>14</b>
<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O cimento de ionômero de vidro (CIV) é produto da reação de ácidos poliméricos fracos com pó de vidro de característica básica. O líquido é composto principalmente de ácido poliacrílico, podendo conter também outros poliácidos, como ácido tartárico, itacônico, maleico, os quais modulam a reação e interferem nas propriedades reológicas do material. O pó contém vidro e outros elementos como estrôncio, fosfato, zinco, cálcio ou sódio, embora algumas formulações apresentem os ácidos na forma liofilizada em sua estrutura <sup>(1)</sup>.

Durante o processo de aglutinação, desencadeia-se uma reação ácido-base entre as partículas de flúor-alumino-silicato (FAS) e o ácido poliacrílico, seguida de liberação de íons, de acordo com a composição do cimento. A liberação de cálcio e alumínio iniciam o processo de geleificação, via ligações iônicas, com os íons carboxílicos ionizados presentes no ácido poliacrílico. Sais de poliacrilato, inicialmente de cálcio e depois de alumínio são formados durante a reação. Durante os primeiros minutos da reação, o material permanece sensível a possíveis alterações no balanço hídrico, o que o torna instável. O gel de sílica resultante da reação ácido-base se forma na superfície das partículas FAS parcialmente reagidas, permitindo que se fixem na matriz, protegendo o cimento de hidrólise, por aumentarem a insolubilidade do cimento. Esse fenômeno é fundamental para a estabilização do cimento. A reação de presa é muito lenta e propriedades mecânicas aceitáveis são estabelecidas somente após 24 horas, período em que o cimento é altamente suscetível a alterações físicas como a sinérese e embebição. A reação de presa pode se suceder por semanas ou até meses, caracterizando o processo de maturação do material <sup>(1)</sup>.

O cimento apresenta adesividade à estrutura dentária por quelação do cálcio e ação bacteriostática, resultante da liberação sustentada de flúor, o que o habilita para selamento e descontaminação dentinária após procedimento de remoção seletiva de cárie <sup>(2,3,4)</sup>. Entretanto, a biocompatibilidade deste material pode ser um fator limitante a essa indicação <sup>(5)</sup>. Autores creditam a baixa biocompatibilidade do cimento a dois fatores: baixo pH, pela presença do ácido poliacrílico no líquido e alta concentração de íons F<sup>-</sup>, AL<sup>3+</sup>, NA<sup>+</sup>, SI<sup>2+</sup>, CA<sup>2+</sup> e ZN<sup>3+</sup> <sup>(6)</sup>. O mecanismo complexo de liberação de flúor dos CIVs também poderia estar diretamente correlacionado com seus efeitos citotóxicos, uma vez que o flúor inibe o crescimento celular, proliferação, atividade

mitocondrial e síntese proteica, podendo provocar apoptose por meio da via mitocondrial/caspase-9/caspase-3-dependente <sup>(6)</sup>.

Materiais bioativos têm sido incorporados ao CIV com o intuito de incrementar a biocompatibilidade e a ação antimicrobiana, e conseqüentemente seu potencial reparador e remineralizador sobre a dentina <sup>(7,8,9)</sup>. Entre esses materiais, estão a quitosana e a hidroxiapatita <sup>(10,11)</sup>.

A quitosana é um polissacarídeo natural de carga positiva, obtido a partir do processo de desacetilação alcalina do biopolímero natural quitina, encontrado em crustáceos marinhos e na parede celular de fungos <sup>(12)</sup>. Sua formulação ( $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-deoxy-D-glucan residues) contém 3 grupos funcionais denominados: grupo amina/acetamido; grupo hidroxila primário; grupo hidroxila secundário. O grupo amina é o principal grupo reativo e está relacionado à sua quelação e funções biológicas <sup>(10,13)</sup>. Uma série de efeitos biológicos relacionados à quitosana são citados, entre eles: redução da inflamação e infecção; redução microbiana; aumento na expressão de marcadores de mineralização – osteopontina e fosfatase alcalina; aceleração da regeneração tecidual / angiogênese <sup>(14,15,16)</sup>.

Além dos vários efeitos biológicos, a biocompatibilidade e biodegradabilidade da quitosana permitem sua aplicação na área da saúde e, especialmente na odontologia, como um agente antimicrobiano de amplo espectro sobre bactérias cariogênicas e patógenos periodontais <sup>(17)</sup>. Estudos mostram que materiais à base de quitosana pode aumentar a viabilidade celular sem gerar efeitos tóxicos em células da polpa dentária humana <sup>(15,18)</sup>, além de induzir a mineralização e aumentar a proliferação, migração e diferenciação odontoblástica <sup>(12)</sup>.

Quando associada ao cimento de ionômero de vidro, a quitosana pode atuar em duas principais características do cimento que poderiam resultar em melhoria significativa das propriedades: potencialização da ação antimicrobiana e redução da toxicidade <sup>(10,17)</sup>. Com relação à ação antimicrobiana, estudos referem que há inibição do crescimento bacteriano decorrente de danos causados pela quitosana à parede celular das bactérias através de interações eletrostáticas <sup>(19)</sup>. Quanto à ação sobre a toxicidade, uma possível explicação seria a reação do grupo amina ( $\text{NH}_2$ ), presente na quitosana, com o grupo carboxílico ( $\text{COOH}$ ) do ácido poliacrílico do CIV, o que resultaria na formação de cadeias poliméricas que poderiam mudar as propriedades mecânicas e biológicas do cimento original, entre elas, o aumento do pH, melhorando sua bioatividade <sup>(20,21,22)</sup>. Apesar de estudos apontarem redução da toxicidade do CIV

incorporado de quitosana em fibroblastos <sup>(10)</sup>, não há estudos sobre células pulpares, como também não há definição de qual concentração seria mais eficaz.

A hidroxiapatita é um material inorgânico composto principalmente por um fosfato de cálcio bioativo e biocompatível, presente em diferentes tecidos do corpo <sup>(23)</sup>. É uma importante fonte de minerais dentários, como cálcio e fosfato, o que reduz a desmineralização e pode induzir a remineralização <sup>(24)</sup>. Como apresenta alta biocompatibilidade e similaridade com a apatita da estrutura dental tem boa reatividade quando incorporada a materiais odontológicos <sup>(25)</sup>.

A hidroxiapatita quando incorporada ao CIV, faz com que o cimento mantenha todas as propriedades desejáveis de sua formulação original e ainda atua nas propriedades antimicrobianas e mecânicas, incluindo maior liberação de flúor <sup>(26)</sup>, resistência mecânica <sup>(11)</sup> e maior adesão à estrutura dental <sup>(27)</sup>. A interação química entre a hidroxiapatita e o CIV eleva a quantidade de cálcio e fósforo no cimento, aumentando a densidade e causando um estreitamento entre as partículas no interior da matriz ionomérica, o que eleva a resistência mecânica <sup>(28)</sup>. Acredita-se que uma maior ligação à estrutura dentária se deva a trocas iônicas decorrentes de um maior teor de cálcio ao cimento <sup>(29)</sup>. O aumento da ação antimicrobiana é explicado pela liberação prolongada de flúor e pela capacidade tampão de ácido láctico pela eluição de íons cálcio <sup>(11)</sup>. Estudos relatam haver aumento na viabilidade celular de fibroblastos, diretamente proporcional ao aumento da concentração de hidroxiapatita. A diminuição da citotoxicidade pode ocorrer devido a interações químicas pela grande quantidade de cálcio e fósforo presentes, proporcionando um ambiente mais favorável para a proliferação celular <sup>(28,29)</sup>.

Estudos que contribuam para uma definição da concentração ideal desses bioativos no CIV que resulte em melhoria da ação antimicrobiana e da citotoxicidade do cimento, sem, contudo, alterar as características positivas do material, são necessários, ponto que justifica a realização do nosso estudo.

Esse estudo tem o propósito de: 1. Analisar a ação antimicrobiana do CIV modificado por várias concentrações de quitosana e de hidroxiapatita; 2. Avaliar a biocompatibilidade em CPDHs dos cimentos modificados que apresentaram melhor ação antimicrobiana. A elucidação dos benefícios promovidos pela utilização desses bioativos ao tecido pulpar, bem como sua ação sobre os processos celulares envolvidos, permitirá uma indicação clínica mais segura e eficaz desses materiais.

## 2 CONCLUSÃO GERAL

1. A incorporação de 2% de quitosana e 5% de hidroxiapatita potencializaram a ação antimicrobiana do CIV, principalmente à longo prazo;
2. Todos os cimentos apresentaram citotoxicidade leve, classificados de acordo com a porcentagem de células viáveis;
3. O CIV modificado por quitosana foi o que apresentou maior viabilidade celular após 24 horas;
4. A incorporação de hidroxiapatita não alterou a característica citotóxica do cimento.



## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

1. Francois P, Fouquet V, Attal JP, Dursun E. Commercially Available Fluoride-Releasing Restorative Materials: A Review and a Proposal for Classification. *Materials (Basel)*. 2020 May 18;13(10):2313.
2. Hafshejani TM, Zamanian A, Venugopal JR, Rezvani Z, Sefat F, Saeb MR, Vahabi H, Zarrintaj P, Mozafari M. Antibacterial glass-ionomer cement restorative materials: A critical review on the current status of extended release formulations. *J Control Release*. 2017 Sep 28;262:317-328.
3. Sidhu SK, Nicholson JW. A Review of Glass-Ionomer Cements for Clinical Dentistry. *J Funct Biomater*. 2016 Jun 28;7(3):16.
4. Silva, R.; Cabral, R.N.; Pascotto, R.C.; Borges, A.F.S.; Martins, C.; Navarro, M.F.D.L.; Sidhu, S.K.; Leal, S. Mechanical and optical properties of conventional restorative glass-ionomer cements—A systematic review. *J. Appl. Oral Sci*. 2019.
5. Roussou K, Nikolaidis AK, Ziouti F, Arhakis A, Arapostathis K, Koulaouzidou EA. Cytotoxic Evaluation and Determination of Organic and Inorganic Eluates from Restorative Materials. *Molecules*. 2021 Aug 13;26(16):4912.
6. Kanjevac T, Milovanovic M, Volarevic V, Lukic ML, Arsenijevic N, Markovic D, Zdravkovic N, Tesic Z, Lukic A. Cytotoxic effects of glass ionomer cements on human dental pulp stem cells correlate with fluoride release. *Med Chem*. 2012 Jan;8(1):40-5.
7. Saraceni CHC, Kabadayan F, Lima B, Braga R, Cunha B, Suffredini I. Mechanical properties of a glass ionomer cement incorporated with Amazon plant extract. *Dent Mater J*. 2019 Jun 1;38(3):411-417.
8. Tüzüner T, Dimkov A, Nicholson JW. The effect of antimicrobial additives on the properties of dental glass-ionomer cements: a review. *Acta Biomater Odontol Scand*. 2019 Jan 10;5(1):9-21.
9. Nunes, JMFFIAP, Farias,C.A. Vieira,T.M. Ribeiro,F.C. Sampaio,V.A. Menezes. Antimicrobial activity and toxicity of glass ionomer cement containing an essential oil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2020;53(12) 479.
10. Zhou J, Xu Q, Fan C, Ren H, Xu S, Hu F, Wang L, Yang K, Ji Q. Characteristics of chitosan-modified glass ionomer cement and their effects on the adhesion and proliferation of human gingival fibroblasts: an in vitro study. *J Mater Sci Mater Med*. 2019 Mar 6;30(3):39.
11. Imataki R, Shinonaga Y, Nishimura T, Abe Y, Arita K. Mechanical and Functional Properties of a Novel Apatite-Ionomer Cement for Prevention and Remineralization of Dental Caries. *Materials*. 2019. 12 3998.

12. Aguilar A, Zein N, Harmouch E, Hafdi B, Bornert F, Offner D, et al. Application of Chitosan in Bone and Dental Engineering. *Molecules*. 2019 Aug 19;24(16):3009.
13. Husain S, Al-Samadani KH, Najeeb S, Zafar MS, Khurshid Z, Zohaib S, Qasim SB. Chitosan Biomaterials for Current and Potential Dental Applications. *Materials (Basel)*. 2017 May 31;10(6):602.
14. Mohebbi S, Nezhad MN, Zarrintaj P, Jafari SH, Gholizadeh SS, Saeb MR. Chitosan in Biomedical Engineering: A Critical Review. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2018. 13 (00): 1-24.
15. Zhang C, Hui D, Du C, Sun H, Peng W, Pu X, Li Z, Sun J, Zhou C. Preparation and application of chitosan biomaterials in dentistry. *Int J Biol Macromol*. 2021 Jan 15;167:1198-1210. 2020
16. Wan MC, Qin W, Lei C, Li QH, Meng M, Fang M, Song W, Chen JH, Tay F, Niu LN. Biomaterials from the sea: Future building blocks for biomedical applications. *Bioact Mater*. 2021 Apr 29;6(12):4255-4285.
17. Debnath A, Kesavappa S, Singh G, et al. Comparative Evaluation of Antibacterial and Adhesive Properties of Chitosan Modified Glass Ionomer Cement and Conventional Glass Ionomer Cement: An In vitro Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017. 11 (3).
18. Subhi H, Reza F, Husein A, Al Shehadat SA, Nurul AA. Gypsum-Based Material for Dental Pulp Capping: Effect of Chitosan and BMP-2 on Physical, Mechanical, and Cellular Properties. *Int J Biomater*. 2018 Jul 26;2018:3804293.
19. Matica MA, Aachmann FL, Tøndervik A, Sletta H, Ostafe V. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 24;20(23):5889.
20. Chavasit V, Torres JA. Chitosan-poly(acrylic acid): mechanism of complex formation and potential industrial applications. *Biotechnol Prog*. 1990 Jan-Feb;6(1):2-6.
21. Wanachottrakul N, Chotigeat W, Kedjarune-Leggat U. Effect of novel chitosan-fluoroaluminosilicate resin modified glass ionomer cement supplemented with translationally controlled tumor protein on pulp cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2014 Apr;25(4):1077-85.
22. Kim DA, Lee JH, Jun SK, Kim HW, Eltohamy M, Lee HH. Sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle-incorporated glass ionomer cement with or without chitosan for enhanced mechanical and biomineralization properties. *Dent Mater*. 2017 Jul;33(7):805-817.
23. Mederos M, Cuevas-Suarez CE, Sanchez W, Miranda P, Francia A, Pardo H, Villanueva-Stark JP, Kreiner M, Grazioli G. Effect of the incorporation of hydroxyapatite on the diametral tensile strength of conventional and hybrid glass ionomer cements. *Odontology*. 2021 Oct;109(4):904-911.

24. Pepla E, Besharat LK, Palaia G, Tenore G, Migliau G. Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Ann Stomatol (Roma)*. 2014 Nov 20;5(3):108-14.
25. Wrzyszczyk-Kowalczyk A, Dobrzynski M, Grzesiak-Gasek I, Zakrzewski W, Mysiak-Debska M, Nowak P, Zimolag M, Wiglusz RJ. Application of Selected Biomaterials and Stem Cells in the Regeneration of Hard Dental Tissue in Paediatric Dentistry-Based on the Current Literature. *Nanomaterials (Basel)*. 2021 Dec 13;11(12):3374.
26. Chiu SY, Shinonaga Y, Abe Y, Harada K, Arita K. Influence of Porous Spherical-Shaped Hydroxyapatite on Mechanical Strength and Bioactive Function of Conventional Glass Ionomer Cement. *Materials (Basel)*. 2017 Jan 3;10(1):27.
27. Kheur M, Kantharia N, Lakha T, Kheur S, Al-Haj Husain N, Özcan M. Evaluation of mechanical and adhesion properties of glass ionomer cement incorporating nano-sized hydroxyapatite particles. *Odontology*. 2020 Jan;108(1):66-73.
28. Genaro LE, Anovazzi G, Hebling J, Zuanon ACC. Glass Ionomer Cement Modified by Resin with Incorporation of Nanohydroxyapatite: In Vitro Evaluation of Physical-Biological Properties. *Nanomaterials (Basel)*. 2020 Jul 19;10(7):1412.
29. Thomas B, Gupta K. In vitro biocompatibility of hydroxyapatite-added GIC: An SEM study using human periodontal ligament fibroblasts. *J Esthet Restor Dent*. 2017 Nov 12;29(6):435-441.