UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

LEONARDO ANTÔNIO DE MORAIS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BIOMATERIAIS NANOCOMPÓSITOS DE POLIAMIDA 6 COM NANOPARTÍCULAS DE TRIMETAFOSFATO DECORADAS COM NANOPARTÍCULA DE PRATA

ARAÇATUBA - SP

2021

LEONARDO ANTÔNIO DE MORAIS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BIOMATERIAIS NANOCOMPÓSITOS DE POLIAMIDA 6 COM NANOPARTÍCULAS DE TRIMETAFOSFATO DECORADAS COM NANOPARTÍCULA DE PRATA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Odontológica – Área de Biomateriais.

Orientador Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem
Coorientador: Profª. Ass. Dra Débora Barros Barbosa

ARAÇATUBA - SP
2021

Catalogação na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Morais, Leonardo Antônio de.

M827a Avaliação da atividade antimicrobiana de biomateriais nanocompósitos de poliamida 6 com nanopartículas de trimetafosfato decoradas com nanopartícula de prata / Leonardo Antônio de Morais. - Araçatuba, 2021

76 f. :il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Coorientadora: Profa. Débora Barros Barbosa

1. Anti-infecciosos 2. Nanocompostos 3. Fosfatos 4. Prata T.

Black D15

CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dados Curriculares

LEONARDO ANTÔNIO DE MORAIS

Nascimento	15/12/1992 Jataí-GO
Filiação	Waldeci Antônio de Morais Cleide Maria de Morais
2008/2011	Curso Técnico Integrado de Nível Médio em Informática
2013/2017	Curso de graduação em Odontologia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
2014/2017	Desenvolvimento de Projetos de Iniciação Científica, com bolsas PIBIC-CNPq.
2018/Atual	Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica – área de Biomateriais, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP.
Associações	CROSP- Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO- Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

Dedicatória

Dedicatória

Aos meus pais, Waldeci e Cleide:

Por todo apoio, suporte, dedicação, "puxões de orelha" e amor que vocês me proporcionam. Vocês são meus maiores exemplos de pais, família, dedicação, trabalho duro e incentivo para correr atrás dos nossos sonhos. Nada disso seria possível sem o apoio de vocês. Obrigado por sempre estarem ao meu lado me ajudando a levantar a cada tombo e me mostrando que sempre existe uma luz no fim do túnel, apenas precisamos ter paciência e determinação para caminhar até lá! Meu amor por vocês é algo inimaginável e só tenho a agradecer por ter vocês na minha vida!! Muito Obrigado por tudo!!

Aos meus irmãos, Lucas e Luan:

Por todas as brigas, conversas, festas, churrascos, viagens, apoios e conselhos. Dedico esse trabalho a vocês que estão sempre ao meu lado, me estimulando a seguir sempre o melhor caminho, tal como meus pais nos ensinaram! Vocês são a minha saudade diária de casa! Obrigado por tudo, amo vocês!

Agradecimentos especiais

Agradecimentos Especiais

À Deus

*Por todas as bençõe*s que o senhor coloca na minha vida. Obrigado por guiar o meu caminho e por não me abandonar nos momentos difíceis ou mesmo os felizes. Sinto abençoado por todas as pessoas que o senhor colocou em minha vida que torcem pelo o meu sucesso e eu pelo o deles.

À minha família

Por serem meus maiores incentivadores e motivadores. Meus exemplos de pessoas. Obrigado por estarem sempre ao meu lado e fazerem com que eu nunca desistisse dos meus sonhos! Cada conquista em minha vida é por vocês, sem o apoio de vocês nada seria possível.

Ao meu orientador Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Obrigado Professor pela a oportunidade de realizar mais um sonho na minha vida. Sem os seus conselhos e incentivo, nada disso seria possível. Obrigado pela a confiança, disponibilidade, ajuda e suporte durante toda essa caminhada. Só tenho a agradecer e me espelhar no senhor! Tenho muito orgulho de ter sido seu orientado. Muito Obrigado!

À Profª. Ass. Dra Débora Barros Barbosa

Agradeço por toda co-orientação desse trabalho, por toda ajuda, dedicação, incentivo e ensinamentos passados. Agradeço a disponibilidade, boa vontade e preocupação conosco o que nos motiva a continuar. Obrigado por tudo!

Agradecimentos Especiais

Aos professores do departamento

Por todos ensinamentos passados em aulas e clínicas e pela boa convivência. Sou grato por ter a oportunidade de aprender diariamente com pessoas excepcionais como vocês.

Aos meus amigos Jataienses

Por se fazerem presentes mesmo distantes, por serem grandes amigos e pessoas incríveis. Obrigado por cada risada, companheirismo, apoio e suporte nos dias difíceis e também por comemorarem comigo nos dias alegres. Sinto muita falta de vocês no meu dia a dia, mas isso faz parte da nossa caminhada e luta diária! Torço muito pelo o sucesso de vocês e só tenho a agradecer por nossas amizades de anos e que dure muitos anos ainda!

Aos meus amigos Araçatubenses

Obrigado por todo incentivo, churrascos, conselhos e companheirismo. Vocês fizeram meus dias melhores em Araçatuba e só tenho a agradecer por toda amizade.

Aos amigos do laboratório e pós-graduação

Obrigado por toda companhia, ideias, conselhos, frustações, experiências e aprendizado com vocês. Considero cada um de vocês como irmãos, pois passamos tanto tempo juntos que nos importamos um com os outros! Passamos a ter empatia por todos ali presente, vivenciando as alegrias e tristezas de cada um! Obrigado por tudo!

À Thayse Yumi Hosida

Thayse, muito obrigado por toda ajuda, cooperação e assistência prestadas. Só tenho a agradecer pelas "chamadas de atenção", conselhos, direcionamentos, risadas, comidas, cafés, indicações e aprendizado! Aprendi muito com você e só tenho a te agradecer por isso! Que nossa amizade dure

muitos anos. Só desejo coisas boas na sua vida e certeza que o seu sucesso será certeiro! Muito obrigado!

Ao Francisco Nunes Souza Neto

Só tenho a agradecer por essa amizade que criamos e se desenvolveu nesse período. Obrigado por toda ajuda, dicas, estudos e conhecimentos. Mesmo distante nos reuníamos, conversávamos e nos ajudávamos na medida do possível! Desejo muito sucesso em sua carreira e pode sempre contar comigo! Muito Obrigado.

Aos meus amigos de apartamento Diego, Gabriel e Igor

Muito obrigado pela a convivência diária com vocês! Cada um com suas particularidades, mas todos com um grande coração. Vocês são pessoas que irei levar comigo para toda vida. Só tenho a agradecer pelo o companheirismo, risadas, discussões filosóficas e outras não tão filosóficas assim, mas que tornaram os meus dias em Araçatuba mais leves e gratificantes! Desejo muitos cafés e risadas para nós. Obrigado por tudo, contem sempre comigo e que nossa amizade se perdure por muitos anos! Um grande abraço!

Ao meu grupo de pesquisa Caio, Igor, Emanuel, Thamires Cavazana, Tamires Passadori, Thayse e Viviane

Muito obrigado por toda ajuda, companheirismo, conhecimentos e risadas! De certa forma nos entendemos, nos conhecemos e criamos essa amizade que irei levar para o resto da minha vida! Muitas risadas e lágrimas nos fluxos, muitas histórias compartilhadas e isso que nos fazem únicos! Muito obrigado por toda essa vivência e parceria. Contem sempre comigo!

Agradecimentos

Agradecimentos

*À **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor **Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem**.*

*Ao programa de **Pós-Graduação em Ciência Odontológica** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP representado pelo seu coordenador **Prof. Assoc. Luciano Tavares Ângelo Cintra**, pela competência e qualidade na condução do programa de pós-graduação.*

*Aos funcionários da Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, Lilian Sayuri Mada e Cristiane Regina Lui Matos**, pela eficiência e profissionalismo.*

*Aos funcionários da área de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Luiz, Mário e Ricardo**, pela ajuda, atenção e suporte prestados a mim.*

À **FAPESP** (**Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)** processo #2018/16041-1 e a **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)** pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho,

Minha eterna gratidão!

Epígrafe

Epígrafe

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis".

José de Alencar

Resumo

Resumo

Morais, LA. **Avaliação da atividade antimicrobiana de biomateriais nanocompósitos de poliamida 6 com nanopartículas de trimetafosfato decoradas com nanopartícula de prata.** 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Biomateriais) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2021.

O uso de novos materiais nanocompósitos para fabricação de dispositivos protéticos, matrizes para preenchimento de defeitos ósseos, proteção do tecido pulpar de dentes e túbulos dentinários expostos pode colaborar significativamente na qualidade de vida da população. Objetivo: Realizar o processamento da matriz polimérica de poliamida-6 (P6) impregnada com nanopartículas de trimetafosfato (TMP) e nanopartícula de prata (AgNP), avaliar a atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans e a* liberação de TMP e Ag^{+}. Métodos: Foi determinado a concentração inibitória mínima (CIM) da AgNP com ou sem a presença da NH_3 para *S. mutans* e *C. albicans*. Em seguida, realizado a síntese e caracterização dos nanocompósios (P6, P6-2,5, 5 e 10%TMP associado ou não a AgNP), quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC), determinação do halo de inibição e quantificação de TMP e Ag^{+} liberados durante 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 24 horas em água deionizada. Os dados foram submetidos à análise de variância bidirecional, seguida do teste de Fisher LSD ($p<0,05$). Resultados: A CIM para *C. albicans* foi de 9,40 mg/mL com ou sem a presença da NH_3 e para o *S. mutans* foi de 601,9 mg/mL com NH_3 e 300,9 mg/mL sem NH_3. Nos testes de caracterização foi possível incorporar a P6 com TMP sem alterar suas propriedades. A maior quantidade de Ag^{+} liberada ocorreu nas primeiras três hora para todos os grupos decorados com AgNP. Houve liberação de TMP nas primeira três horas para os grupos P6-5%TMP e P6-10%TMP e para as demais membranas não foram detectadas liberações. No ensaio de difusão em ágar os halos formados para *C. albicans* e *S. mutans* mostraram ação da AgNP para ambos os microrganismos. Os grupos P6-Ag-2,5%TMP e P6-Ag-5%TMP com AgNP apresentam maior redução de UFC para *S. mutans* quando comparado aos demais grupos, com maior redução no tempo de 18 horas. Para *C. albicans* todos os grupos apresentaram redução na UFC quando comparado ao controle, sem diferença estatística entre os

mesmo. Conclusão: Foi possível desenvolver um matriz polimérica de P6 impregnada com TMP e AgNP com ação antimicrobiana contra os microrganismos testados.

Palavras-chave: Antimicrobianos; Nanocompósito; Fosfatos; Prata.

Abstract

Morais, LA. **Evaluation of the antimicrobial activity of polyamide 6 nanocomposite biomaterials with trimetaphosphate nanoparticles decorated with silver nanoparticles**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Biomateriais) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2021.

The use of new nanocomposite materials for the manufacture of prosthetic devices, matrices for filling bone defects, protection of the pulp tissue of exposed teeth and dentinal tubules can significantly contribute to the quality of life of the population. Objective: To perform the processing of the polymeric matrix of polyamide. 6 (P6) impregnated with trimetaphosphate nanoparticles (TMP) and silver nanoparticles (AgNP), evaluate the antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* and the release of TMP and Ag +. Methods: The minimum inhibitory concentration (MIC) of AgNP was determined with or without the presence of NH3 for *S. mutans* and *C. albicans*. Then, the synthesis and characterization of the nanocomposites (P6, P6-2.5, 5 and 10% TMP associated or not with AgNP), quantification of colony forming units (CFU), determination of the inhibition halo and quantification of TMP and Ag + released during 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12, 14, 16, 18, 20 and 24 hours in deionized water. The data were submitted to bidirectional analysis of variance, followed by the Fisher LSD test ($p < 0.05$). Results: The MIC for *C. albicans* was 9.40 mg / mL with or without the presence of NH3 and for *S. mutans* it was 601.9 mg / mL with NH3 and 300.9 mg / mL without NH3. In the characterization tests it was possible to incorporate the P6 with TMP without changing its properties. The highest amount of Ag + released occurred in the first three hours for all groups decorated with AgNP. There was TMP release in the first three hours for the P6-5% TMP and P6-10% TMP groups and for the other membranes, no releases were detected. In the agar diffusion assay, halos formed for *C. albicans* and *S. mutans* showed AgNP action for both microorganisms. The P6-Ag-2.5% TMP and P6-Ag-5% TMP groups with AgNP show a greater reduction in CFU for *S. mutans* when compared to the other groups, with a greater reduction in the time of 18 hours. For *C. albicans*, all groups showed a reduction in CFU when compared to the control, with no statistical difference between them. Conclusion: It was possible to develop a

polymeric matrix of P6 impregnated with TMP and AgNP with antimicrobial action against the microorganisms tested.

Keywords: Antimicrobials; Nanocomposite; Phosphates; Silver.

Lista de figuras

Figura 1. (A): Espectros de UV-Vis da amostra de AgNP. (B): Difratograma de DRX da amostra de AgNP. (C): Micrografia da amostra de AgNP. (D): Histograma da amostra de AgNP e (E): Distribuição de tamanho das AgNP pela técnica de DLS.

Figura 2. (A): Difratograma de raios X do TMP após moagem por 48h. (B) Espectro *survey* de XPS da amostra de TMP moída por 48h. (C) Espectro de XPS em alta-resulução (P 2p). (D) Espectro de XPS em alta-resolução (O 1s).

Figura 3. Imagens de MEV das fibras de P6 e de seus nanocompósitos. A: Fibra de P6. B: Nanocompósito P6-2,5%TMP. C: Nanocompósito P6-5%TMP D: Nanocompósito P6-10%TMP.

Figura 4. Imagens de MEV com mapeamento em 3D das fibras de P6-TMP-AgNP e de seus nanocompósitos decorados com as AgNP. A: Fibra de P6-Ag. B: Nanocompósito P6-2,5%TMP-Ag. C: Nanocompósito P6-5%TMP-Ag. D: Nanocompósito P6-10%TMP-Ag.

Figura 5. Histogramas de EDX das fibras de P6 e de seus nanocompósitos. A: Fibra de P6; B: Nanocompósito P6-2,5%TMP; C: Nanocompósito P6-5%TMP; D: Nanocompósito P6-10%TMP.

Figura 6. Espectro de FTIR das amostras de P6, TMP e de seus nanocompósitos.

Figura 7. A: Espectros de ^{13}C de RMN em estado sólido da P6-Ag e de seus nanocompósitos. B: Espectro de ^{31}P de RMN em estado sólido do TMP e dos nanocompósitos de P6-TMP-Ag.

Figura 8. A: Curvas termogravimétricas e suas derivadas da P6 e seus nanocompósitos; B: Curvas de DSC da P6 e de seus nanocompósitos.

Figura 9. Comportamento mecânicos dos nanocompósitos. As letras minúsculas apresentam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 10. A: Valores médios de liberação de Ag^+ dentre 12 horas de ciclagem; B: Valores médios acumulativos iônicos da Ag^+ durante a ciclagem; C: Valores médios de TMP liberado dentre 12 horas de ciclagem; D: Valores médios acumulativos de TMP liberados durante a ciclagem.

Figura 11. Médias e desvio-padrão (barras) dos diâmetros dos halos de inibição para *Streptococcus mutans* (a) e *Candida albicans* (b). Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos.

Figura 12. Logaritmo (média ± dp) das unidades formadoras de colônias por cm^2 para *S. mutans* (A) *e Candida albicans* (B) e em biofilmes de duas espécies. As letras minúsculas apresentam diferença estatística entre os grupos no mesmo período de tempo ($p < 0,05$). As letras maiúsculas distintas significa diferença estatística entre os grupos em um determinado tempo.

Sumário

SUMÁRIO

1. RESUMO... 23
2. INTRODUÇÃO 24
3. OBJETIVO..... 25
4. METODOLOGIA..... 26
5. DISCUSSÃO 35
6. REFERÊNCIAS..... 41

7. ANEXOS
7.1 ANEXO A 54
7.2 ANEXO B 71
7.3 ANEXO C 72
7.4 ANEXO D 73
7.5 ANEXO E 74
7.6 ANEXO F 75
7.7 ANEXO G 76

Avaliação da atividade antimicrobiana de biomateriais nanocompósitos de poliamida 6 com nanopartículas de trimetafosfato decoradas com nanopartícula de prata.

Objetivo: Realizar o processamento da matriz polimérica de poliamida-6 (P6) impregnada com nanopartículas de trimetafosfato (TMP) e nanopartícula de prata (AgNP), avaliar a atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans e a* liberação de TMP e Ag^+. Métodos: Foi determinado a concentração inibitória mínima (CIM) da AgNP com ou sem a presença da NH_3 para *S. mutans* e *C. albicans*. Em seguida, realizado a síntese e caracterização dos nanocompósios (P6, P6-2,5, 5 e 10%TMP associado ou não a AgNP), quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC), determinação do halo de inibição e quantificação de TMP e Ag^+ liberados durante 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 24 horas em água deionizada. Os dados foram submetidos à análise de variância bidirecional, seguida do teste de Fisher LSD ($p<0,05$). Resultados: A CIM para *C. albicans* foi de 9,40 mg/mL com ou sem a presença da NH_3 e para o *S. mutans* foi de 601,9 mg/mL com NH_3 e 300,9 mg/mL sem NH_3. Nos testes de caracterização foi possível incorporar a P6 com TMP sem alterar suas propriedades. A maior quantidade de Ag^+ liberada ocorreu nas primeiras três hora para todos os grupos decorados com AgNP. Houve liberação de TMP nas primeira três horas para os grupos P6-5%TMP e P6-10%TMP e para as demais membranas não foram detectadas liberações. No ensaio de difusão em ágar os halos formados para *C. albicans* e *S. mutans* mostraram ação da AgNP para ambos os microrganismos. Os grupos P6-Ag-2,5%TMP e P6-Ag-5%TMP com AgNP apresentam maior redução de UFC para *S. mutans* quando comparado aos demais grupos, com maior redução no tempo de 18 horas. Para *C. albicans* todos os grupos apresentaram redução na UFC quando comparado ao controle, sem diferença estatística entre os mesmo. Conclusão: Foi possível desenvolver um matriz polimérica de P6 impregnada com TMP e AgNP com ação antimicrobiana contra os microrganismos testados.

Palavras-chave: Antimicrobianos; Nanocompósito; Fosfatos; Prata.

1. Introdução

A perda de tecido causado pela a cárie dentária ou por traumas incentivam pesquisas na área da engenharia tecidual, com biomateriais, na intenção de regenerar a estrutura e reestabelecer forma e função [1]. Materiais poliméricos sempre se destacaram no desenvolvimento de novos materiais, mas com o advento da nanotecnologia e dos nanocompósitos, seu papel foi ampliado e surgiram novas possiblidades e desafios tecnológicos e científicos, como o desenvolvimento e entendimento de suas propriedades para aplicações nas distintas áreas do conhecimento [2]. Nas últimas décadas, vários estudos empregaram materiais poliméricos, na forma de substratos tridimensionais porosos (*scaffolds*), para atuarem como matriz extracelular no crescimento, proliferação e suporte para a formação de novos tecidos vivos [3, 4].

Como uma alternativa para os *scaffolds*, as fibras poliméricas de poliamida-6 (P6) são excelentes biomateriais devido à elevada relação entre sua área superficial e seu volume, à interconectividade de suas fibras e à existência de espaço intertiscial, apresentando diferentes aplicações no campo biomédico [5, 6]. A técnica de *electrospinning* é considerada a mais versátil para a produção de fibras poliméricas devido ao controle dimensional e a reprodutibilidade de resultado das nanofibras geradas [7]. No entanto, características superficiais, como a hidrofilicidade e a baixa funcionalidade da P6 dificultam a sua aplicação como *scaffold* [8]. Para minimizar ou solucionar este problema, a funcionalização da P6 com grupos fosfato tem sido utilizada para iniciar a mineralização *in vitro* de tecidos ósseos e dentários [9].

Grupos aniônicos, como os fosfatos, têm a capacidade de nuclear cristais de apatita [10], os quais também podem induzir a mineralização do tecido dentário [11]. Neste caso, os fosfatos reagem com os grupos amino ou hidroxila das proteínas, fixando-os às cadeias de aminoácidos [12]. O trimetafosfato de sódio (TMP) é o ciclofosfato mais estudado para aplicações odontológicas [13] devido a sua ação anticárie [14, 15] por intermédio da adsorção do ciclofosfato na superfície do esmalte dentário [16], o qual facilita a difusão de cátions [17]. Ademais, o tamanho das partículas do TMP pode ser

uma estratégia eficiente para aumentar o seu potencial anticárie. Delbem *et* al.[18] demostrou que a adição de nanopartículas de TMP, ao invés do material comercial micrométrico, aos dentifrícios fluoretados foi eficaz no processo de remineralização do esmalte dentário *in situ*. O desenvolvimento destas nanopartículas de ciclofosfatos propiciou o aumento do efeito anticárie, utilizando menores quantidades de fosfatos em dentifrícios fluoretados [19]. Favretto *et* al.[20] mostrou que o tratamento da dentina com TMP leva a precipitação de apatita na superfície e interior dos túbulos dentinários aumentando o conteúdo mineral da dentina. A utilização de fosfatos deixa a superfície do substrato com maior quantidade de sítios doadores de elétrons propiciando uma maior adsorção de fosfato de cálcio na superfície [21]. Além disso, a adesão celular é influenciada pela interação eletrostática com a superfície dos biomateriais e está relacionada com os componentes polar da energia livre de superfície já que maiores valores de sítios doadores de elétrons leva a maior adesão celular [22].

A P6 e o TMP não apresentam atividade antimicrobiana [23, 24], porém quando o TMP é impregnado com nanopartículas de prata (AgNP), este composto demonstra significante atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* [25]. Sendo assim, seria interessante o desenvolvimento de um novo material que apresente ação antimicrobiana para serem empregados como *scaffold* para a regeneração de tecidos dentários baseados na P6 e TMP decorados com AgNP.

2. Objetivo

A proposta do presente estudo foi desenvolver um material formado por uma matriz polimérica de P6 impregnada com nanopartículas de TMP em diferentes concentrações decoradas com AgNP, e avaliar sua atividade antimicrobiana e a capacidade de liberação de TMP e Ag^{+}.

3. Metodologia

3.1. Síntese das AgNP

A síntese das AgNP foi realizada como proposto por Lee e Oh *et* al. [26]. O método consiste na redução dos íons Ag+ na solução de nitrato de prata ($AgNO_3$) em meio alcoólico, no qual, o etanol atuou como solvente e como agente redutor para a formação das AgNP. A sua estabilização foi realizada empregando a polivinilpirrolidona (PVP com massa molar de 10000 g.mol-1) com relações molares de 1:1, respectivamente.

O sal de $AgNO_3$ (90 mM) e o polímero PVP (90 mM) foram preparados separadamente com a dissolução dos respectivos precursores em 50 mL de etanol anidro. O sistema de reação foi mantido sob refluxo e sob agitação constante por 4 h em um balão volumétrico de 3 bocas com capacidade volumétrica de 250,0 mL à temperatura de 80°C.

Para verificar a influência de um novo agente estabilizante no meio reacional, os sais de $AgNO_3$ e PVP foram solubilizados separadamente e posteriormente foi adicionado 0,3 mL de hidróxido de amônio (NH_4OH). O sistema reacional foi mantido sob refluxo e sob agitação constante por 4 h à temperatura de 80°C.

3.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) das AgNP

O método de microdiluição foi realizado de acordo com as diretrizes do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI: M27-A2 e M07-A9). As AgNPs sintetizadas na presença ou ausência de NH_3, foram diluídos em água deionizada em progressão geométrica, de 2 a 1024 vezes. Posteriormente, cada concentração de AgNP obtida anteriormente foi diluída (1:5) em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) para *Candida albicans* (ATCC 10231), e em Brain Heart Infusion (BHI, Difco, Le Pont de Claix, França) para *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Os inóculos de culturas de 24 h foram ajustados ao equivalente de turbidez padrão de 0,5 McFarland em solução salina (NaCl a 0,85%). As suspensões de cada cepa foram diluídas (1:5) em NaCl (0,85 %) e

posteriormente diluídas (1:20) em RPMI 1640 para *C. albicans* ou caldo BHI para *S. mutans*. Cada suspensão de microrganismo (100 µL) foi adicionada nos poços das placas de microtitulação contendo 100 µL de cada concentração de nanocompósito. As placas de microtitulação foram incubadas a 37 °C, e os CIMs foram determinados visualmente com a menor concentração de AgNPs sem crescimento de microrganismo após 48 h [24]. Após 48 h, o conteúdo de cada poço foi semeado em SDA (para *C. albicans*) ou ágar BHI (para *S. mutans*) para determinar a Concentração Fungicida Mínima (MFC) e a Concentração Bactericida Mínima (MBC) das soluções contra as cepas testadas. Os ensaios foram realizados em triplicata em três ocasiões independentes.

3.3. *Preparação do TMP em escala nanométrica*

As nanopartículas de TMP foram obtidas empregando uma metodologia de reação em estado sólido (moagem) descrito por *Danelon et al.* [18].

3.4. *Preparo das membranas de P6 contendo TMP e decoradas com AgNP*

A produção das nanofibras de P6 (Sigma-Aldrich 99%) foi realizada seguindo a metodologia proposta por Andre *et al.* [27] e Mi *et al.* [28] com adaptações. A P6 foi solubilizada em ácido fórmico em uma concentração de 15% (m/v) sob agitação magnética constante por 5 horas a 25°C. P6 contendo TMP (2,5%, 5% e 10%) foram solubilizados em ácido fórmico com descrito previamente. Em seguida, a solução homogeneizada foi eletrofiada em um aparelho de *electrospinning* (EC-DIG - IME Technologies, Geldrop, Netherlands) com uma tensão de 25 kV e vazão de 10 µL.hora^{-1} empregando um substrato coletor posicionado a uma distância de 10 cm da seringa. A seguir, as membranas P6-TMP, nas concentrações de 0%, 2,5%, 5% e 10%, foram recobertas com as AgNP por meio da imersão das membranas em 15 mL de uma suspensão de AgNP por 24 horas à temperatura ambiente.

Baseado em estudos pilotos prévios, as concentrações (P6, P6-2,5%TMP, P6-5%TMP e P6-10%TMP) foram as que apresentaram melhores

propriedades mecânicas e químicas. Devido a isso foram as concentrações eletivas para os ensaios experimentais.

3.5. Caracterização do TMP, AgNP, P6, P6-TMP e P6-TMP-AgNP

O TMP, AgNP e as membranas de P6-TMP-AgNP foram caracterizados no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (LIEC/DQ – UFSCar). As diferentes concentrações das membranas obtidas foram caracterizadas pela técnica de espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDX) [49], espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio (FTIR) [29], microscopia eletrônica de varredura (MEV) [24], ressonância magnética nuclear em estado sólido (ss-RMN) [30], análise termogravimétrica (TGA) [31], calorimetria diferencial de varredura (DSC) [32] e análise termodinâmica e mecânica (DMTA) [33], técnica de espectrofotometria de absorção UV-Vis [34] , técnica de Difração de raio X (DRX) e Soluções em Conversão de Energia (XPS) [35, 36], técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), técnica espalhamento dinâmico de luz (DLS) [37].

3.6. Liberação de TMP e Ag^+ das membranas de P6-TMP-AgNP

Seis discos de cada grupo foram confeccionados com o auxílio de um perfurador com 5 mm de diâmetro. Essas amostras foram colocadas em microtubos de centrifugação contendo 2 mL com água deionizada, mantidos em estufa a 37°C. Após o período de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 24 horas foram realizadas as dosagens de TMP e Ag^+ liberada. O TMP liberado pelas membranas foi quantificado pela determinação do fósforo, após hidrólise em meio ácido sob aquecimento [38], pelo método colorimétrico de Fiske & Subbarow [38]. Os valores obtidos foram convertidos para µg TMP/cm^2. Para determinar a quantidade de prata iônica (Ag^+) liberada, um eletrodo específico 9616 BNWP (Thermo Scientific, Beverly, MA, EUA) foi conectado a um analisador de íons (Orion 720 A^+, Thermo Scientific, Beverly, MA, EUA) e calibrado previamente com padrões contendo 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg

Ag/mL. Em 1 mL da amostra, adicionou-se 0,020 mL de ISA (ISA, Cat. N° 940011, Thermo Scientific). Os valores foram obtidos em mV, em duplicata, e convertidos em µg Ag/cm^2 [39].

3.7. Avaliação da atividade antimicrobiana das membranas

3.7.1. Cepas de microrganismos e condições de crescimento

Duas cepas da American Type Culture Collection (ATCC) foram incluídas neste estudo: *C. albicans* ATCC 10231 e *S. mutans* ATCC 25175. Para *C. albicans*, colônias previamente cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (SDA; Difco, Le Pont de Claix , França) foram suspensos em 10 mL de caldo Sabouraud dextrose (Disco) e incubados aerobicamente durante a noite a 120 rpm e 37 °C. Simultaneamente, colônias de *S. mutans* cultivadas em ágar de infusão de cérebro e coração (BHI Agar; Difco) foram suspensas em 10 mL de caldo BHI (Difco) e incubadas estaticamente durante a noite em 5% de CO_2 a 37 °C. Posteriormente, as células fúngicas e bacterianas foram recuperadas por centrifugação (8.000 rpm, 5 min) e os sedimentos celulares lavados duas vezes com 10 mL de NaCl 0,85%. O número de células de *C. albicans* foi ajustado para 1×10^7 células mL^{-1} usando uma câmara de contagem de Neubauer, enquanto o número de células bacterianas foi ajustado espectrofotometricamente (640 nm) para 1×10^8 células mL^{-1}.

3.7.2. Determinação de Viabilidade Celular

As cepas de *C. albicans* ATCC 10231 e *S. mutans* ATCC 25175 foram reativadas em ágar SDA (Sabouraud Dextrose, Difco, Le Pont de Claix, France) e BHI (Difco), por 48 h a 37 °C em aerobiose e microaerofilia, respectivamente para cada microrganismo. As células foram lavadas em solução salina (0,85% NaCl) e ressuspendidas em BHI após crescerem por uma noite à 37ºC. Em seguida, foram ajustadas a uma concentração de 2×10^7 células/mL para *C. albicans* + 2×10^8 células/mL para *S. mutans.* Em seguida, três membranas de cada grupo (5 mm) foram suspensas em microtubulos de 2 mL, contendo 200

µL de suspensões celular de *S.mutans* e *C.albicans*, por 1, 2, 4, 6, 12, 18 e 24 h. Após cada período, as membranas foram removidas e ressuspendidas em tubos falcon contendo 1 mL de NaCl (0.85%). Logo após, as membranas foram removidas para diluição da suspensão em progressão geométrica. As diluições foram plaqueadas em CHROMagar Candida (Difco), para contagem de *C. albicans*, e em ágar BHI suplementado com anfotericina B (7 µg/mL; Sigma-Aldrich), para contagem do *S. mutans*. As placas de ágar foram incubadas por 24–48 h a 37 ºC, e o número de Unidade Formadora de Colônias (UFC) foram expressos em log10 UFC/cm² [40]. O ensaio foi realizado em triplicata e em três ocasiões diferentes.

3.7.3. Determinação do Halo de inibição

O método de difusão em ágar foi realizado de acordo com as normas do National Committee for Clinical and Laboratory Standards (Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard - Eighth Edition. NCCLS 13 document M2-A8, 2003a.) com modificações [41]. As cepas de *C. albicans* (ATCC 10231) e *S. mutans* (ATCC25175) foram reativadas em ágar SDA (Sabouraud Dextrose, Difco, Le Pont de Claix, France) e BHI, por 48 horas a 37°C em aerobiose e microaerofilia, respectivamente para cada microrganismo. Em seguida, 5 colônias de cada espécie foram inseridas em caldo BHI individualmente e incubadas a 37 °C por 18-24 h. Uma alíquota de 300 µL de cada suspensão bacteriana e fúngica (densidade óptica de 0,6 e absorbância de 550 nm) foi homogeneizada com 15 mL de BHI-ágar a 45 ^{o}C. Após a geleificação do meio de cultura, discos de 5 mm de diâmetro membranas, esterilizados previamente por radiação ultra violeta, foram colocados sobre a superfície do meio ágar. Para cada experimento foi utilizada, como controle positivo, solução de digluconato de clorexidina (CHX) a 0,2 %. As placas foram mantidas por 2 h na temperatura ambiente para permitir a difusão das soluções e em seguida incubadas a 37 ^{o}C por 24 h. Duas medidas de cada halo de inibição foram mensuradas (mm) com o auxílio de paquímetro digital e as médias calculadas.

4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) ($p<0,05$). Os experimentos microbiológicos foram realizados em triplicata, em três momentos diferentes. A normalidade dos dados foram verificados pelo teste de Shapiro - Wilk, seguido por ANOVA bidirecional e teste *post hoc* de Fisher LSD (Software SigmaPlot 12.0, Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA). Todas as análises foram realizadas com um nível de significância de 5%.

5. Resultados

5.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Para as células planctônicas de *C. albicans*, os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) da AgNP foram 9,40 e 300,9 mg/mL com ou sem a presença de NH_3 (Tabela 1). Para *S. mutans* os valores de CIM e concentração bactericida mínima (MBC) de 601,9 e 601,9 mg/mL respectivamente, para AgNP com NH_3 e 300,9 e 300,9 mg/mL para AgNP sem NH_3 (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados de CIM, MBC e MFC de AgNP com NH_3 ou AgNP sem NH_3 contra as cepas testadas (n = 9)

Espécies	**AgNP com NH_3**		**AgNP sem NH_3**	
	CIM (mg/mL)	**MFC/MBC (mg/mL)**	**CIM (mg/mL)**	**MFC/MBC (mg/mL)**
C. albicans ATCC 10231	9,40	300,94	9,40	300,94
S. mutans	601,88	601,88	300,94	300,94

ATCC 25175

5.2. Síntese e Caracterização das Nanopartículas de Prata

A Figura 1-A mostra os espectros de UV-Vis dos coloides AgNP no intervalo de 300 nm - 800 nm, confirmando sua formação. Uma característica macroscópica das AgNP é a coloração amarela, característica de uma morfologia esférica como mostrado na Figura 1-A. Além disso, o espectro de absorção das AgNP apresenta uma banda simétrica de SPR em 410 nm confirmando que os íons Ag^{+} foram reduzidos à Ag^{0} em meio alcoólico.

A Figura 1-B apresenta os difratogramas de raios X das amostras de prata obtidos. A formação das AgNP, foi evidenciada pela comparação entre os padrões de reflexões obtidos experimentalmente e a ficha cristalográfica correspondente (JCPDS 04-0783). O sólido cristalizou no sistema cúbico de face centrada, apresentando os picos de reflexão relativos aos planos cristalográficos representados pelos índices de Miller: (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0), (3 1 1) e (2 2 2).

As Figuras 1-C, D e E mostram a imagem das AgNPs com os seus respectivos histogramas obtidos pela técnica de MET e DLS. Foram obtidas partículas esféricas com estreita distribuição de tamanho (aproximadamente 5 nm) e com a adição do estabilizador PVP, foi formada uma camada sobre as partículas que as protegeu de possível aglomeração e crescimento. A metodologia utilizada resultou em partículas em escala nanométrica, não havendo mistura de fases cristalinas.

5.3. *Síntese e Caracterização do TMP Nanométrico*

A Figura 2-A mostra o difratograma de raios X das amostras de TMP após 48 h submetidas ao processamento de moagem. A obtenção de TMP, cuja fórmula empírica é ($Na_3P_3O_9$), foi evidenciada pela comparação entre os

padrões de reflexões obtidos experimentalmente e a ficha cristalográfica correspondente (PDF#72-1628). O sólido cristalizou em rede ortorrômbica (a célula unitária apresenta 3 eixos com comprimentos de arestas diferentes, formando ângulos retos).

A análise do espectro *survey* (espectro de baixa resolução), Figura 2-B, mostra a presença dos seguintes analitos na superfície do material moído por 48 horas: Si, P, C, O, Fe e Na. Figura 2-C o sinal do fósforo (P 2p) foi deconvoluído em duas componentes. O pico principal centrado em aproximadamente 133 eV (P $2p_{3/2}$) indica que o estado de oxidação do P no TMP moído por 48 horas é pentavalente, sendo que o átomo de P forma 4 ligações químicas (P tetracoordenado) como é o caso dos fosfatos cíclicos. O segundo pico em aproximadamente 135 eV (P $2p_{1/2}$) é atribuído à ligação P-O-P de metafosfatos. O sinal do oxigênio (O 1s) foi deconvoluído em três componentes, Figura 2-D. Os picos de O 1s indicam a presença de diferentes estados químicos do átomo de oxigênio. O pico do O 1s próximo a 530 eV é atribuída ao oxigênio ligado ao grupo fosfato (P=O). O pico próximo a 532 eV é atribuído ao grupamento P-O-P. O pico próximo a 535 eV é atribuído ao átomo de O quimissorvido proveniente de moléculas de água.

5.4. Síntese e Caracterização das Membranas P6-TMP-AgNP

O processo de eletrofiação das membranas produziu fibras homogeneas, sem porosidades ou defeitos na superfície (Figura 3) e a presença da AgNP decorando a membrana (Figura 4). Os elementos químicos sódio (Na) e fósforo (P) e prata (Ag) foram detectados pela análise do EDX (Figura 5). A espectroscopia de absorção na região do infravermelho mostrou a presença das bandas características das ligações C-O, N-H e C-H da P6, bem como, uma banda 1100 cm^{-1}, característica do estiramento simétrico (P-O-P) em fosfatos, mostrando a incorporação do TMP nas fibras de P6 (Figura 6). Para os as membranas com AgNP não foi possível observar as bandas de absorção mencionadas anteriormente.

A caracterização estrutural do material polimérico e de seus nanocompostos (técnica de RMN) mostrou que os materiais apresentam 5

deslocamentos químicos que são atribuídos aos grupos funcionais da P6 (Figura 7-A) e como não há um deslocamento nos picos dos nanocompostos em comparação a P6, isso significa que o TMP está ligado fisicamente à P6. O espectro ^{31}P-RMN do TMP apresenta dois picos característicos em -15,7 e -19,2 ppm (Figura 7-B). O pico centrado em -15,7 ppm é atribuída ao sítio de fósforo (P_A) e pico centrado em -19,2 ppm aos dois átomos (P_B).

As curvas termogravimétricas das amostras de P6 e de seus nanocompostos são apresentadas na Figura 8-A. As curvas termogravimétricas mostraram que a evolução da perda de massa é mais lenta nos nas membranas devido à presença de nanopartículas, indicando que embora as nanopartículas de TMP promovam um aumento na perda de massa, a cinética de degradação das membranas é mais lenta. A Figura 8-B mostra que os P6-TMP apresentaram um aumento na temperatura de transição vítrea (*Tg*) em comparação à P6, pois houve um aumento na viscosidade das soluções poliméricas levando a uma diminuição no volume livre restringindo assim a mobilidade da cadeia polimérica e aumentando o valor de *Tg*

A incorporação do TMP na matriz polimérica de P6 leva a uma melhora nas propriedades mecânicas da matriz polimérica, dentre elas o aumento no módulo de elasticidade e a resistência à tração. A membrana com P6-2,5%-TMP apresentou os melhores resultados de elasticidade e tração (Figura 9).

5.5. Liberação de Ag^+ e TMP

A maior quantidade de Ag^+ liberada ocorreu nas primeiras três horas para todos os grupos decorados com AgNP (Figura 10A) e a media de liberação não diferiu entre estes grupos ($p>0,05$). Os valores acumados durante as 24 h (Figura 10B) foram maiores para as membranas P6-Ag e P6-5%TMP-Ag que os demais grupos ($p<0,001$). Não houve liberação para os grupos sem AgNP.

Houve pequena liberação de TMP nas primeiras três horas para os grupos P6-5%TMP e P6-10%TMP (Figura 10C) e para as demais membranas não foram detectadas liberações. A média ou acumulado liberado indicam que não há uma liberação de TMP, independente do grupo (Figura 10C e 10D).

5.6. *Avaliação da atividade antimicrobiana das membranas*

No ensaio de difusão em ágar os grupos de membrana contendo AgNP mostraram formação do halo de inibição para *C. albicans* e *S. mutans* (Figura 11). Para *C. albicans*, todos os grupos contendo AgNP apresentaram ação inibitória. Os grupos P6-5%TMP-Ag e P6-10%TMP-Ag não diferiram entre si ($p>0,05$), porém apresentaram os maiores halos de inibição quando comparado aos demais grupos ($p<0,001$). Para *S. mutans*, os grupos P6-2,5%TMP-Ag, P6-5%TMP-Ag e P6-10%TMP-Ag não diferiram na formação do halo de inibição ($p>0,05$), porém estes foram maiores comparados aos demais grupos ($p<0,001$). Os grupos sem AgNP não apresentaram atividade antimicrobiana e o controle positivo, a Clorexidina, apresentou os maiores halos de inibição ($p<0,001$).

Os grupos P6-Ag-2,5%TMP e P6-Ag-5%TMP com AgNP apresentam maior redução de UFC para *S. mutans* quando comparado aos demais grupos ($p<0,001$), com maior redução no tempo de 18 horas. Para *C.albicans* todos os grupos apresentaram redução na UFC quando comparado ao controle, sem diferença estatística entre os mesmo. Para *C albicans* os tempos de 1 e 2 horas apresentaram maior redução de UFC para todos os grupos avaliados (Figura 12).

6. Discussão

O avanço tecnológico tem impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento de novos biomateriais para o tratamento e recuperações de lesões ocasionadas por traumas e doenças degenerativas [1, 42, 43]. No campo da odontologia, o foco tem sido o combate à doença cárie [44]. O presente estudo sintetizou membrana de P6 impregnadas com nanoparticulas de TMP decoradas com AgNP, mostrando uma significativa ação antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans.*

Nanopartículas metálicas, em particular AgNP, têm sido estudadas como um agente antimicrobiano alternativo contra um amplo espectro de espécies no

controle de biofilmes orais [45]. Dentre os agentes estabilizadores utilizados no método de reação química para sintetizar AgNP está a amônia (NH_3), na qual controla o crescimento de partículas e preveni a agregação das mesmas. Logo, a NH_3 estabiliza AgNP induzindo complexos de prata solúvel, que prendem íons de prata livres responsáveis pelo aumento do tamanho das partículas [46]. estabilidade dessas nanopartículas em água seria útil em uma variedade de aplicações, como por exemplo, agentes antimicrobianos em dispositivos médicos e odontológicos [47].

Apesar desta característica, no teste da concentração inibitória mínima a solução de AgNP sem NH_3 necessitou de uma menor concentração para inibir o crescimento de *S. mutans* quando comparado a solução com NH_3. Além disso, a presença da NH_3 como agente estabilizador durante a síntese das nanopartículas acaba interferindo também em sua coloração. Yunji Lee *et al.* [48] registrou que à medida que eles acrescentavam amônia na síntese de prata essa solução se mostrava com uma coloração mais escura por observação visual.

A maior suscetibilidade das células planctônicas de *C. albicans* em comparação às células planctônicas de *S. mutans* pode ser explicada principalmente pelas diferenças estruturais em suas membranas celulares. As membranas das bactérias são carregadas negativamente devido aos fosfolipídios aniônicos, enquanto a carga nas membranas dos fungos é similar às membranas eucarióticas neutras e rígidas [50]. Abbaszadegan *et al.* [51] afirma que a ação antimicrobiana das AgNP depende da carga da superfície externa das partículas influenciada pelos estabilizadores e agentes usados na síntese. Assim, as AgNP sintetizadas no presente estudo apresentam carga superficial negativa, pois no teste eletroquímico de potencial Zeta foi observado que as AgNP se mostraram com valores negativos (-30mV). De acordo com Mandal *et al.* [52] o mecanismo de ação do AgNP depende da carga externa das membranas bacterianas, e isso pode explicar a diminuição da suscetibilidade de *S. mutans* e a necessidade de uma maior concentração para inibir o seu crescimento como observado na tabela 2.

De acordo a síntese e caracterização das membranas este apresentou resultados promissores, visto que as fibras se apresentaram homogêneas, sem porosidade e defeitos superficiais, além da incorporação das AgNP e TMP. As propriedades mecânicas adequadas são importante parâmetro na produção de *scaffolds* a serem utilizados na engenharia tecidual. Um dos parâmetros para aplicações de *scaffolds* é que estes devem ser elásticos o suficiente para resistir à pressão e fluxo durante a implantação em longo prazo sem rasgar. A incorporação do TMP na matriz polimérica de P6 leva a uma melhora nas propriedades mecânicas da matriz polimérica, dentre elas aumento no módulo de elasticidade, a resistência à tração (aumentou no compósito com 2,5% de TMP).

As curvas termogravimétricas mostraram que quimicamente o aumento na estabilidade térmica de P6 com a inserção de TMP se deve a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos amida da P6 e o átomo de oxigênio do TMP, sendo que é requerida uma energia maior para a ruptura de tais ligações. A adição do TMP leva a uma mudança na temperatura de degradação inicial devido a sua boa dispersão na matriz polimérica, permitindo que as nanopartículas preencham os espaços entre as cadeias poliméricas, resultando na necessidade de uma maior temperatura para decompor a matriz polimérica de P6.

Uma possível explicação para o aumento da *Tg* das membranas é que há um aumento nas interações entre cadeias por meio de interações de hidrogênio, e esse aumento coletivo na rigidez contribui para o aumento da *Tg.* Após a inserção do TMP, as cadeias poliméricas se interagem pelas ligações de hidrogênio, e para a movimentação do segmento molecular das membranas é requerida uma maior enérgia térmica.

A atividade antimicrobiana das AgNPs é bem estabelecida, no entanto, o seu mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido. As AgNP se ligam e aderem à membrana celular causando danos diretos [53] ou, ao permear a membrana celular dissolvem-se e há liberação dos íons de prata [24]. Então, uma vez dentro da célula do microrganismo, as AgNP levam a danos no DNA, principalmente através da produção de ROS [54] e também

podem afetar o gradiente eletroquímico de prótons através do processo respiratório, interrompendo a síntese de ATP, levando à morte celular. Além disso, a combinação de AgNP com outros compostos pode melhorar sua atividade antimicrobiana [55, 56].

De acordo com a literatura, o TMP não tem efeito sobre a composição microbiológica do biofilme dental [57]. Os resultados do presente estudo demonstraram que a associação de AgNP com TMP não impediu o efeito antimicrobiano da prata, na verdade, a propriedade do polifosfato de adsorção na proteína por sítios hidroxila e amino [58, 59] pode aumentar a disponibilidade de Ag^{+} e melhorar o efeito antimicrobiano desses compostos. Isso foi observado nesse estudo, especialmente para *C. albicans*, os grupos com maior concentração de TMP (5% e 10%) decorada com AgNP apresentaram maior halo de inibição quando comparado aos outros grupos testados, sem diferença estatística entre os mesmos. Assim como para *S. mutans,* os grupos 2,5%, 5% e 10% TMP associado à AgNP apresentaram melhor desempenho quando comparado a P6-Ag (Figura 8). Esses resultados demonstram que não apenas a presença de AgNP foi relevante para a eficácia antimicrobiana das membranas, mas sua associação com o TMP teve papel significativo no aumento do potencial antimicrobiano. Humphreys *et* al. [60] demostrou em seu estudo que o sinergismo entre polifosfatos e Ag^{+} pode aumentar a permeabilidade da membrana externa de bactérias associadas ao sequestro de cátions divalentes por polifosfato [61-63], permitindo a passagem de prata através da membrana e, em seguida, causando danos à célula, como perda de replicação de DNA e inativação de proteínas [64].

De acordo com Mendes-Gouvêa *et* al. [24], os grupos com maior concentração de TMP associados a AgNP foram os grupos que obtiveram maior ação antimicrobiana em relação aos outros grupos com menor concentração. O mesmo padrão pode ser observado no teste de formação de halo de inibição para *C. albicans*, na qual os grupos de P6-5%-TMP-Ag e P6-10%-TMP-Ag associado à AgNP apresentaram maior halo de inibição quando comparado aos outros grupos. Entretanto, quando analisado os dados de UFC

a maior concentração do TMP não potencializou ação antimicrobiana da AgNP para *S.mutans* e *C.albicans*.

Além disso, a maior liberação de Ag^{+} ocorreu nas primeiras três horas para todos os grupos decorados com AgNP e para o TMP uma pequena liberação no período de 10 horas para todos os grupos decorados com AgNP. Diante disso, a maior liberação de Ag^{+} nas primeiras três horas pode ter influenciado a maior redução de UFC para *C. albicans* nos grupos P6-Ag-5%TMP e P6-Ag-10%TMP nesse período. É importante ressaltar que esse resultado pode estar associado ao fato que biofilmes de espécies de *Candida sp*, podem exibir até 65 vezes mais tolerância à morte por metais do que as culturas planctônicas correspondentes [65]. Além disso, seria interessante avaliar sua ação em períodos de formação mais longos, pois a AgNP tende a formar agregados na ausência de qualquer suporte, reduzindo sua eficácia. Portanto, substratos decorados com AgNP exibem atividade antimicrobiana aumentada por períodos mais longos [66].

Com relação a *S. mutans* a maior redução UFC para os grupos contendo AgNP foi no período de 18 horas, na qual pode estar relacionada a pequena liberação de TMP no tempo de 10 horas, o que potencializaria a ação da AgNP, pois TMP apresenta grande afinidade por íons metálicos (Mg2 +, Ca2 +, K +, Al +, Fe3 +), formando complexos iônicos [67]. Tal propriedade permite que este fosfato se ligue à parede celular dos microrganismos, aumentando assim a permeabilidade celular, permitindo a passagem de prata através da membrana e, em seguida, causando morte celular. Os resultados diferem para *C. albicans*, o que pode ser justificado pela estrutura celular mais complexa das leveduras e hifas em comparação às bactérias, o que possivelmente dificulta os efeitos de ligação do TMP e aumento da permeabilidade.

Apesar dos resultados antimicrobianos serem promissores mais estudos ainda se fazem necessários para melhor avaliar a ação remineralizadora e antimicrobiana desses nanocompósitos como a utilização de testes em biofilmes maduros, testes de citotoxicidade e outros.

7. Conclusão

A síntese dos nanocompósitos obtidos por eletrofiação se mostraram estáveis com potencial aplicação para biomateriais odontológicos. A eficácia antimicrobiana dos nanocompósitos foi observada contra *S. mutans* e *C. albicans*, quando associados ao TMP em maiores concentrações melhorando assim o efeito antimicrobiano das AgNP.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo #2018/16041-1) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, PROCAD/2013 - Proc. 88881.068437/2014–2001).

8. Referências bibliográficas

[1] F. J O'BRIEN, Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering, Materials Today, (2011) 88.

[2] J. JANCAR, J. F. DOUGLAS, F. W. STARR, S. K. KUMAR, P. CASSAGNAU, A. J. LESSER, S. S. STERNSTEIN & M. J. BUEHLER, Current issues in research on structure–property relationships in polymer nanocomposites, Polymer, (2010) 3321.

[3] L. GU, Y. GAO, Y. QIN, X. CHEN, X. WANG, & F. WANG, Biodegradable poly(carbonate-ether)s with thermoresponsive feature at body temperature, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 51 (2013)282.

[4] B. K. SHRESTHA, H. M. MOUSA, A. P. TIWARI, S. W. KO, C. H. PARK & C. S. KIM, Development of polyamide-6,6/chitosan electrospun hybrid nanofibrous scaffolds for tissue engineering application, Carbohydrate Polymers, 148 (2016) 107.

[5] J. D. ÁVILA JÚNIOR, A. F. ÁVILA & M. H. TRIPLETT, Caracterização morfológica de nanomembranas de poliamida-66 dopadas com grafeno obtidas por electrospinning. Polímeros, 23 (2012) 74.

[6] M. K. JOSHI, A. P TIWARI, B. MAHARJAN, K. S. WON, H. J. KIM, C. H. PARK & C. S. KIM, Cellulose reinforced nylon-6 nanofibrous membrane: Fabrication strategies, physicochemical characterizations, wicking properties and biomimetic mineralization, Carbohydrate Polymers, 147 (2016) 104.

[7] R. NIRMALA, R. NAVAMATHAVAN, S.-J. PARK & H. Y. KIM, Recent progress on the fabrication of ultrafine polyamide-6 based nanofibers via electrospinning: a topical review, Nano-Micro Letters, 6 (2014) 89.

[8] H. R. PANT & C. S. KIM, Biomimetic synthesis of hollow calcium phosphate nanospheres on core–shell structured electrospun calcium lactate/nylon-6 nanofibers, Materials Letters, 92 (2013) 90.

[9] V. WINTGENS, F. DALMAS, B. SEBILLE & C. AMIEL, Novel phosphorus-containing cyclodextrin polymers and their affinity for calcium cations and hydroxyapatite, Carbohydrate Polymers, 98 (2013) 896.

[10] L. S. GU, J. KIM, Y. K. KIM, Y. LIU, S. H. DICKENS, D. H. PASHLEY, J. Q. LING & F. R. TAY, A chemical phosphorylation-inspired design for type I collagen biomimetic remineralization, Dental Materials, 26 (2010) 1077.

[11] L. GU, Y. K. KIM, Y. LIU, H. RYOU, C. E. WIMMER, L. DAI, D. D. AROLA, S. W. LOONEY, D. H. PASHLEY & F. R. TAY, Biomimetic analogs for collagen biomineralization, Journal of Dental Research, 90 (2011) 82.

[12] Y. LIU, N. LI, Y. QI, L. N. NIU, S. ELSHAFIY, J. MAO, L. BRESCHI, D. H. PASHLEY & F. R. TAY, The use of sodium trimetaphosphate as a biomimetic analog of matrix phosphoproteins for remineralization of artificial caries-like dentin, Dental Materials, 27 (2011) 465.

[13] C. M. MANNA, M. Y. NASSAR, D. TOFAN, K. CHAKARAWET & C. C. CUMMINS, Facile synthesis of mononuclear early transition-metal complexes of kappa3cyclo-tetrametaphosphate ([P4O12]4-) and cyclo-trimetaphosphate ([P3O9]3-), Dalton transactions, 43 (2014) 1509.

[14] M. GONZALEZ, Effect of trimetaphosphate ions on the process of mineralization, Journal of Dental Research, 50 (1971).

[15] M. DANELON, E. M. TAKESHITA, K. T. SASSAKI & A. C. B. DELBEM, In situ evaluation of a low fluoride concentration gel with sodium trimetaphosphate in enamel remineralization, American Journal of Dentistry, 26 (2013).

[16] M. M. MANARELLI, A. C. B. DELBEM, T. M. T. LIMA, F. C. N. CASTILHO & J. P. PESSAN, In vitro remineralizing effect of fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate, Caries Research, 48 (2014) 299.
[17] A. C. B. DELBEM, M. BERGAMASCHI, E. RODRIGUES, K. T. SASSAKI, A. E. M. VIEIRA & E. M. C. MISSEL, Anticaries effect of dentifrices with calcium citrate and sodium trimetaphosphate, Journal of Applied Oral Science, 20 (2012).
[18] M. DANELON, J. P. PESSAN, F. N. SOUZA NETO, E. R. CAMARGO & A. C. B. DELBEM, Effect of toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on dental caries: In situ study, Journal of Dentistry, 43 (2015) 806.
[19] E. M. TAKESHITA, M. DANELON, L. P. CASTRO, K. T. SASSAKI & A. C. B. DELBEM, Effectiveness of a toothpaste with low fluoride content combined with Trimetaphosphate on dental biofilm and enamel demineralization in situ, Caries Research, 49 (2015) 394.
[20] C. O. FAVRETTO et al., Dentinal tubule obliteration using toothpastes containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles, Clinical oral investigations, (2018) 1-9.
[21] J. NEVES, et al., Painel 29-Análise da energia livre de superfície no esmalte dentário após tratamento com hexametafosfato de sódio, cálcio e fosfato: estudo in vitro, ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION, 5 (2017).
[22] E. M. HARNETT, J. ALDERMAN, T. WOOD, The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture, Colloids and surfaces B: Biointerfaces, (2007) 90-97.
[23] A. D. EREM et al, In vitro assesment of antimicrobial activity and characteristics of polyamide 6/silver nanocomposite fibers, Fibers and polymers, (2013) 1415-1421.
[24] C. C. MENDES-GOUVÊA, et al., Sodium trimetaphosphate and hexametaphosphate impregnated with silver nanoparticles: mcharacteristics and antimicrobial efficacy, Biofouling, (2018) 1-10.
[25] C. C. M. GOUVÊA, et al., Avaliação da ação antimicrobiana do trimetafosfato de sódio associado ao fluoreto e nanopartículas de prata, Brazilian Oral Research, 36 (2016).
[26] Y. LEE & S.-G. OH, Ostwald ripening and control of Ag ion reduction degree by ammonium hydroxide in alcohol reduction process, J. Ind. Eng. Chem, 21 (2015) 768.
[27] R. S. ANDRE, A. PAVINATTO, L. A. MERCANTE, E. C. PARIS, L. H. C. MATTOSO & D. S. CORREA, Improving the electrochemical properties of polyamide 6/polyaniline electrospun nanofibers by surface modification with ZnO nanoparticles, RSC Advances, 5 (2015) 73875.
[28] H. Y. MI, S. PALUMBO, X. JING, L. S. TURNG, W. J. LI & X. F. PENG, Thermoplastic polyurethane/hydroxyapatite electrospun scaffolds for bone tissue engineering: effects of polymer properties and particle size, J. Biomed, Mater. Res. B, 102 (2014) 1434.
[29] HARRY G. BRITTAIN, Chapter four-mid-infrared spectroscopy of pharmaceutical solids, profiles of drug substances, excipients and related methodology, Academic Press, 43 (2018) 321-358.
[30] A. POULHAZAN, ARNOLD A. A. ARNOLD, D. E. WARSCHAWSKI, I. MARCOTTE, Unambiguous ex situ and in cell 2D ^{13}C solid-state NMR characterization of starch and Its constituents, Int J Mol Sci, 12 (2018) 3817.
[31] A. A. DONGARGAONKAR, J.D. CLOGSTON, Quantitation of surface coating on nanoparticles using thermogravimetric analysis. Methods Mol Biol, (2018) 57-63.
[32] B. SHEN, D. ZHANG, Y. WEI, Z. ZHAO, X. MA, X. ZHAO, S. WANG, W. YANG, Preparation of Ag doped keratin/PA6 nanofiber membrane with enhanced air filtration and antimicrobial properties, Polymers (Basel), 9 (2019).

[33] D. S. JONES, Y. TIAN, O. ABU-DIAK, G. P. ANDREWS, Aplicações farmacêuticas de análise térmica mecânica dinâmica, Adv Drug Deliv Ver, (2012) 440-8.
[34] B. AJITHA, Y. A. KUMAR REDDY, P. S. REDDY, H.-J. JEON & C. W. AHN, Role of capping agents in controlling silver nanoparticles size, antibacterial activity and potential application as optical hydrogen peroxide sensor. RSC Advances, 6 (2016) 36171.
[35] Z. ZHANG, F. ZHOU, & E. J. LAVERNIA, On the analysis of grain size in bulk nanocrystalline materials via X-Ray diffraction. Metallurgical and Materials Transactions A, 34 (2003) 1349.
[36] A. M. PUZIY, O. I PODDUBNAYA, R. P. SOCHA, J. GURGUL, & M. WISNIEWSKI, XPS and NMR studies of phosphoric acid activated carbons. Carbon, 46 (2008) 2113.
[37] K. ASHIZAWA, Nanosize particle analysis by dynamic light scattering (DLS). Yakugaku Zasshi. 139 (2019) 237-248.
[38] CH Fiske, Y. Subbarow, The colorimetric determination of phosphorus. Journal of Biological Chemistry, 66 (1925) 375–400.
[39] G. FERNANDES, et al., Nanosynthesis of silver-calcium glycerophosphate: promising association against oral pathogens, Antibiotics, 7 (2018).
[40] R. A. FERNANDES, D. R. MONTEIRO, L. S. ARIAS, G. L. FERNANDES, A. C. B. DELBEM, D. B. BARBOSA, Biofilm formation by Candida albicans and Streptococcus mutans in the presence of farnesol: A quantitative evaluation, Biofouling, 32 (2016) 329–338.
[41] T. Y. HOSIDA, T. P. CAVAZANA, M. HENRIQUES; J. P. PESSAN, A. C. B. DELBEM, D. R. MONTEIRO, Interactions between Candida albicans and Candida glabrata in biofilms: Influence of the strain type, culture medium and glucose supplementation. Mycoses, 61 (2018) 270-278.
[42] A. E. HAGGERTY, M. OUDEGA, Biomaterials for spinal cord repair, Neurosci Bull, 29 (2013) 445-59.
[43] A. A. ZADPOOR, The evolution of biomaterials research, Materials Today, 16 (2013) 408-409.
[44] L. S. GU et al. A chemical phosphorylation-inspired design for type I collagen biomimetic remineralization. Dent Mater, 26 (2010) 1077-1089
[45] M. A. PEREZ-DIAZ, L. BOEGLI, G. JAMES, C. VELASQUILLO, R. SANCHEZ-SANCHEZ, R. E. MARTINEZ-MARTINEZ, G. A. MARTINEZ- CASTANON, F. MARTINEZ-GUTIERREZ, Silver nanoparticles with antimicrobial activities against *Streptococcus mutans* and their cytotoxic effect. Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl., (2015); 360–366.
[46] L. F. GORUP, E. LONGO, E. R. LEITE, E. R. CAMARGO, Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the turkevich method. J. Colloid Interface Sci, (2011) 355–358.
[47] D. R. MONTEIRO, L. F. GORUP, A. S. TAKAMIYA, A. C. RUVOLLO-FILHO, E. R. DE CAMARGO, D. B. BARBOSA, The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: Antimicrobial effect of medical devices containing silver, Int. J, Antimicrob. Agents, (2009) 103–110.
[48] Y. LEE, S. G. OH, Ostwald ripening and control of Ag ion reduction degree by ammonium hydroxide in alcohol reduction process - Journal of Industrial and Engineering Chemistry, (2015).
[49] T. SHALABY, H. HAMAD, E. IBRAHIM, O. MAHMOUD, A. Al-Oufy, Electrospun nanofibers hybrid composites membranes for highly efficient antibacterial activity, Ecotoxicol Environ, (2018) 354-364.
[50] N. MALANOVIC, K. LOHNER, Gram-positive bacterial cell envelopes: the impact on the activity of antimicrobial peptides, Biochim Biophys Acta, 1858 (2016) 936–946.

[51] A.ABBASZADEGAN, Y.GHAHRAMANI , A.GHOLAMI,B. HEMMATEENEJAD, S. DOROSTKAR, M. NABAVIZADEH, H. SHARGHI, The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study, J Nanomater, (2015) 1–8.

[52] D. Mandal, S. Kumar Dash, B. Das, S. Chattopadhyay, T. Ghosh, D. Das, S. Roy, Bio-fabricated silver nanoparticles preferentially targets gram positive depending on cell surface charge, Biomed Pharmacother, 83 (2016) 548–558.

[53] Q. LI, S. MAHENDRA, D. Y. LYON, L. BRUNET, M. V. LIGA, D. LI & P. J. J. ALVAREZ, Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications, Water Research, 42 (2008).

[54] N. DURÁN, M. DURÁN, M. B. JESUS, A. B. SEABRA, W. J. FÁVARO & G. NAKAZATO, Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity, nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 12 (2016) 789.

[55] S. PAL, Y. K. TAK, J. M. SONG, Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 73 (2007) 1712–1720.

[56] D. R. MONTEIRO, S. SILVA, M. NEGRI, L. F. GORUP, E. R. DE CAMARGO, R. OLIVEIRA, D. B. BARBOSA, M. HENRIQUES, Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with nystatin and chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. Mycoses. 5 (2013) 672–680.

[57] T. P. CAVAZANA, T. Y. HOSIDA, J. P. PESSAN, C. SAMPAIO, D. R. MONTEIRO, A. C. B. DELBEM, Activity of sodium trimetaphosphate, associated or not with fluoride, on dual-species biofilms, Biofoulin, (2019) 718-718.

[58] G. LEONE , P. TORRICELLI, R. GIARDINO, R. BARBUCCI, New phosphorylated derivatives of carboxymethylcellulose with osteogenic activity, Polym Adv Technol, 19 (2008) 824–830.

[59] X. LI, J. CHANG, Preparation of bone-like apatite-collagen nanocomposites by a biomimetic process with phosphorylated collagen, J Biomed Mater Res A, 85 (2008) 293–300.

[60] G. HUMPHREYS, G. L. LEE, S. L. PERCIVAL, A. J. MCBAIN, Combinatorial activities of ionic silver and sodium hexametaphosphate against microorganisms associated with chronic wounds. J Antimicrob Chemother, 66 (2011) 2556–2561.

[61] S. K. MAIER, S. SCHERER, M. J. LOESSNER, Long-chain polyphosphate causes cell lysis and inhibits *Bacillus cereus* septum formation, which is dependent on divalent cations. Appl Environ Microbiol, 65 (1999) 3942– 3949.

[62] S. AKHTAR, D. PAREDES-SABJA , M. R. SARKER, Inhibitory effects of polyphosphates on clostridium perfringens growth, sporulation and spore outgrowth, Food Microbiol, 25 (2008) 802–808.

[63] J. A. OBRITSCH, D. RYU, L. E. LAMPILA, L. B. BULLERMAN, Antibacterial effects of long-chain polyphosphates on selected spoilage and pathogenic bactéria, J Food Prot, 71 (2008) 1401–1405.

[64] Q. L. FENG, J. WU, G. Q. CHEN, F. Z. CUI, T. N. KIM, J. O. KIM, A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, J Biomed Mater Re, 52 (2000) 662–668.

[65] J. J. HARRISON, H. CERI, J. YERLY, M. RABIEI, Y. HU, R. MARTINUZZI, R. J. TURNER, Metal ions may suppress or enhance cellular differentiation

in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilms. Appl Environ Microbiol, 73 (2007) 4940–4949.
[66] S. AGNIHOTRI, S. MUKHERJI, S. MUKHERJI, Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: Elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver, Nanoscale, 5 (2013) 7328–7340.
[67] I. K Choi, W. W. Wen, R. W. Smith, The effect of a long chain phosphate on the adsorption of collectors on kaolinite. Miner Eng. 6 (1993)1191–1197.

Figuras

Figura 1. Caracterização das AgNP.

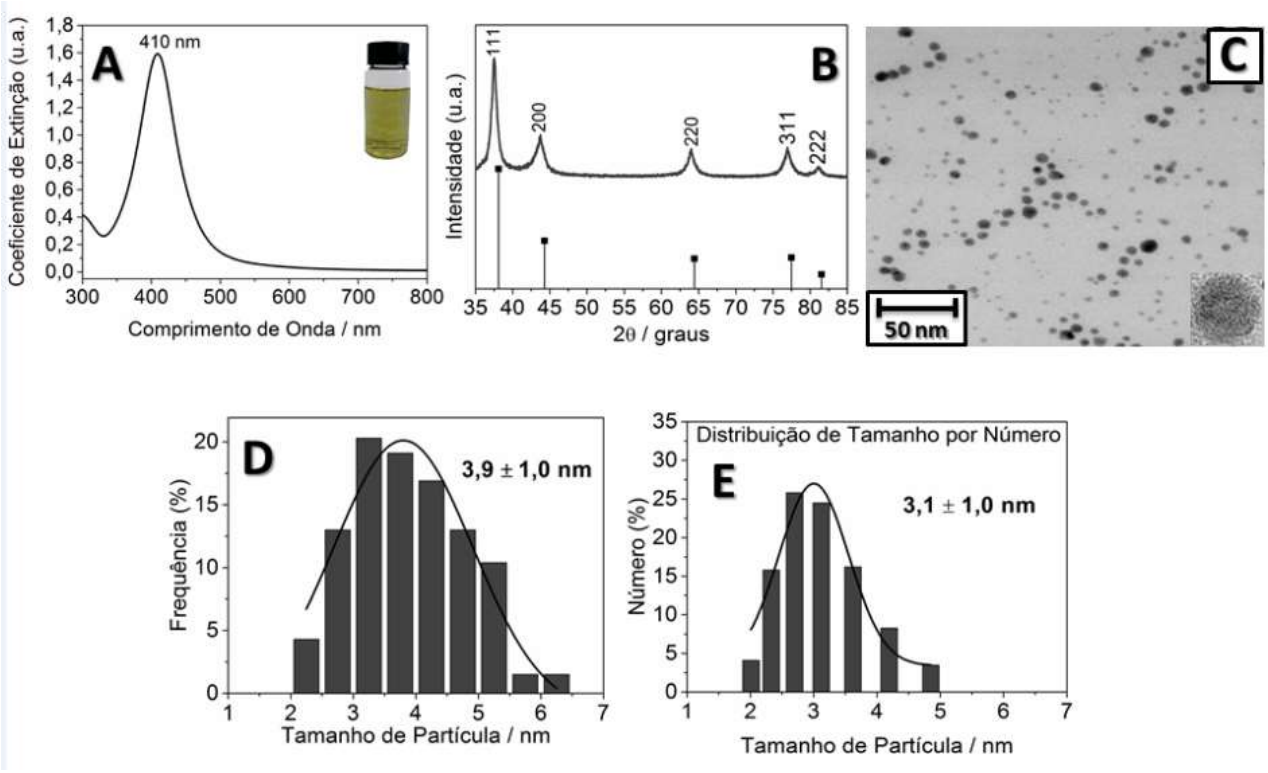


Figura 2. Caracterização do TMP nanométrico.

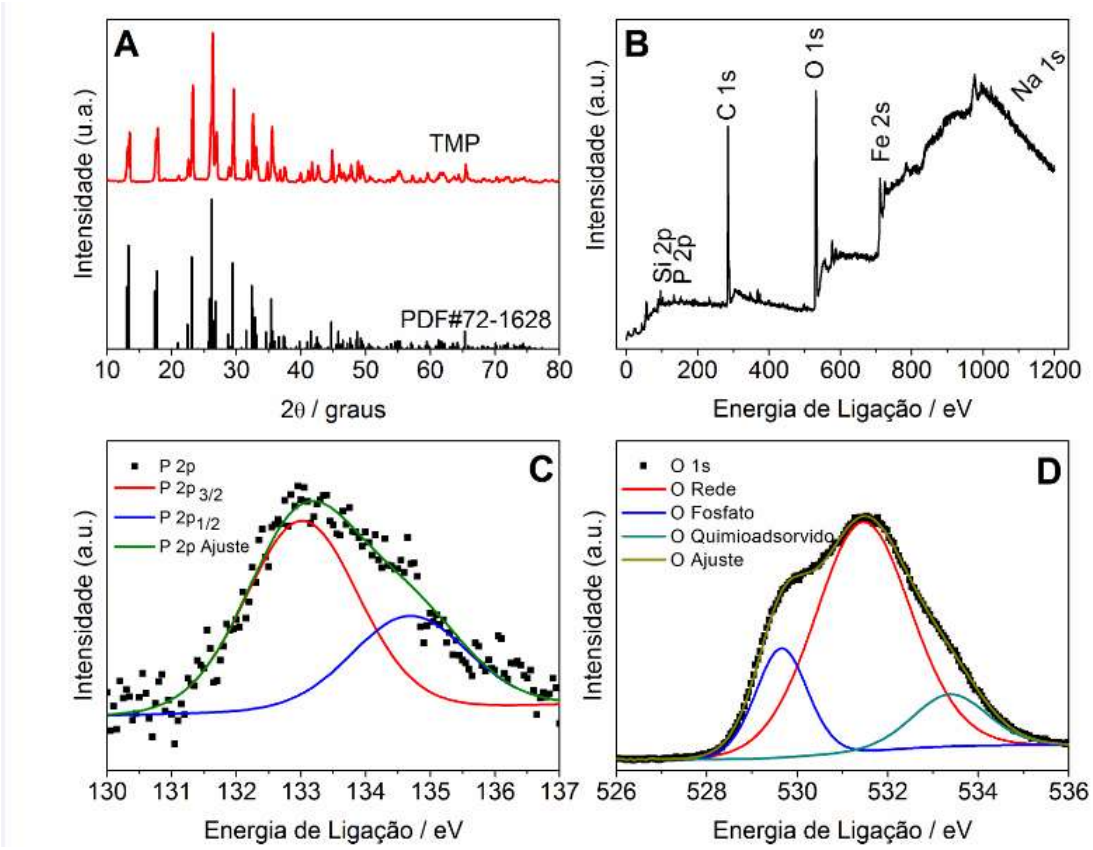


Figura 3. Imagens de MEV das fibras de P6 e de seus nanocompósitos.

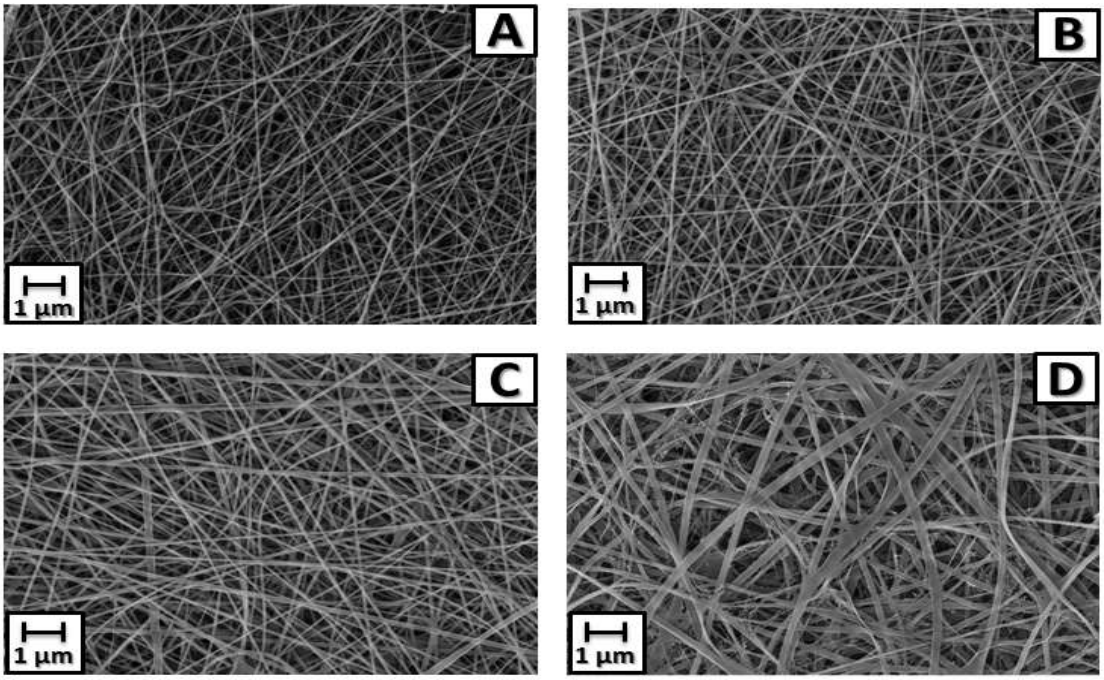


Figura 4. Imagens de MEV com mapeamento em 3D das fibras de P6-TMP-AgNP e de seus nanocompósitos decorados com as AgNP.

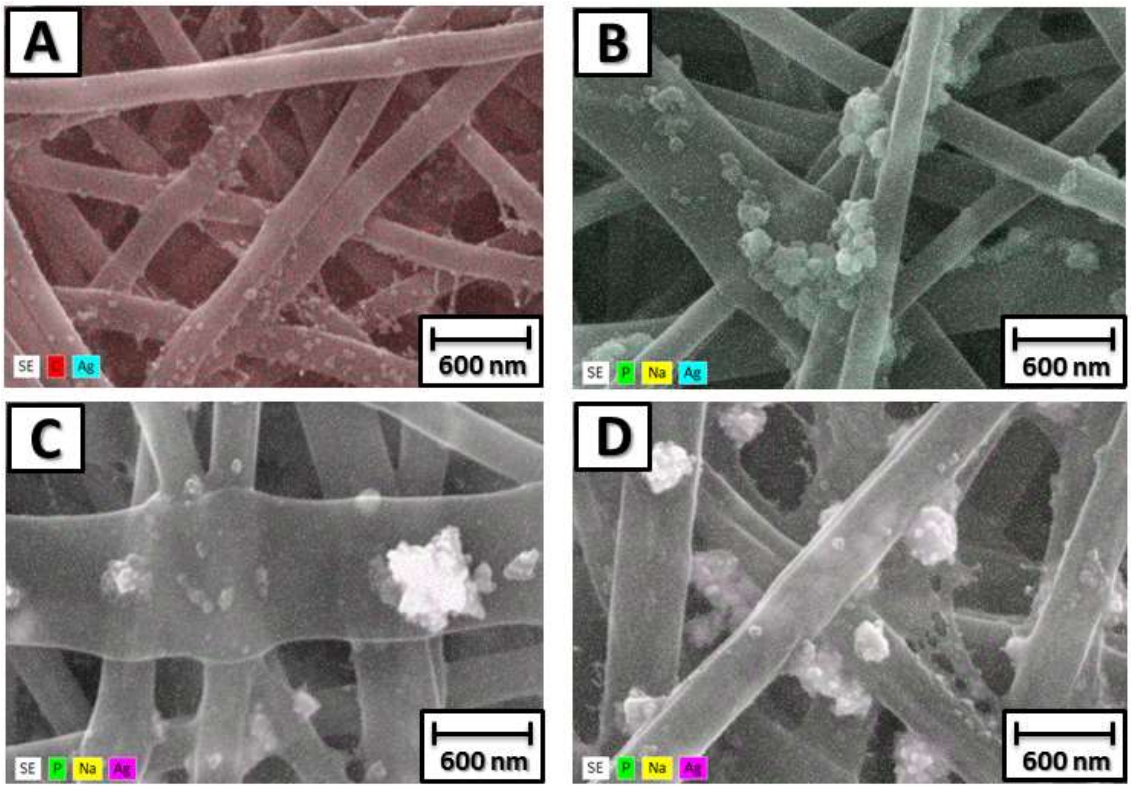


Figura 5. Histogramas de EDX das fibras de P6 e de seus nanocompósitos.

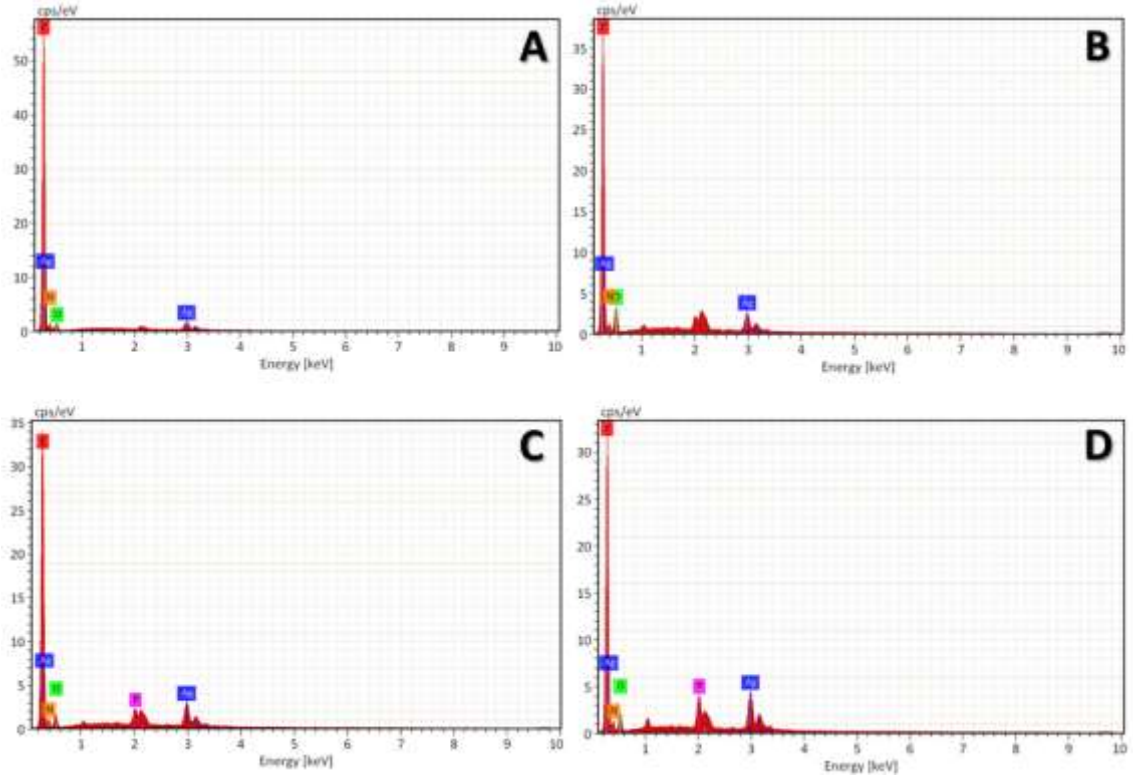


Figura 6. Espectro de FTIR das amostras de P6, TMP e de seus nanocompósitos.

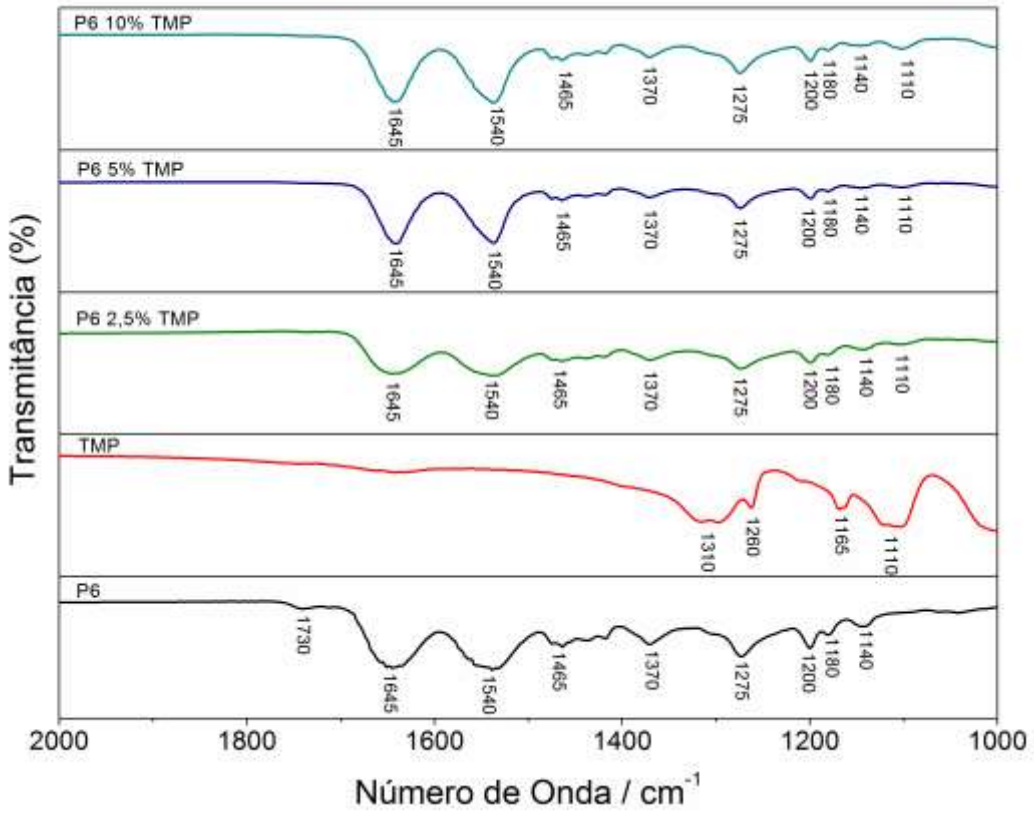


Figura 7. Espectros de RMN em estado sólido da P6-Ag e de seus nanocompósitos.

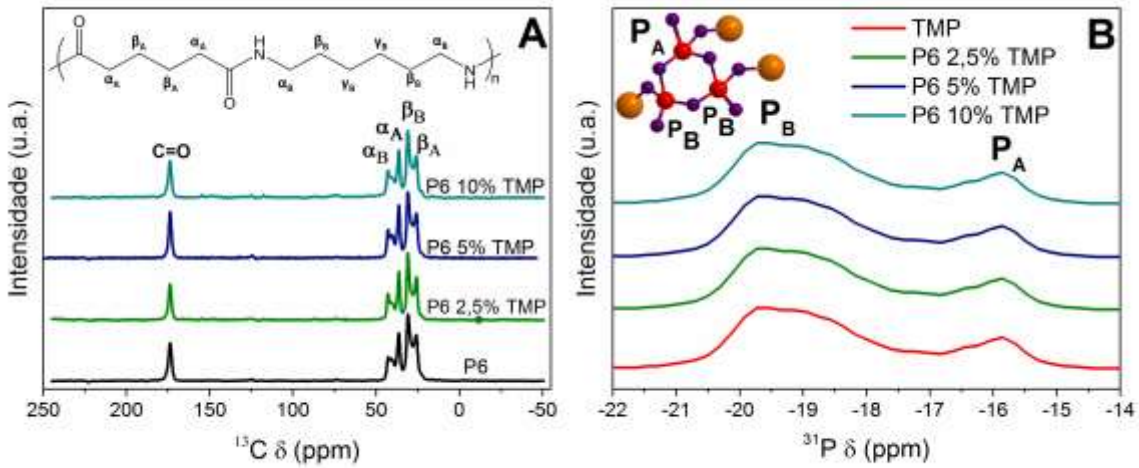


Figura 8. Curvas termogravimétricas e suas derivadas da P6 e seus nanocompósitos.

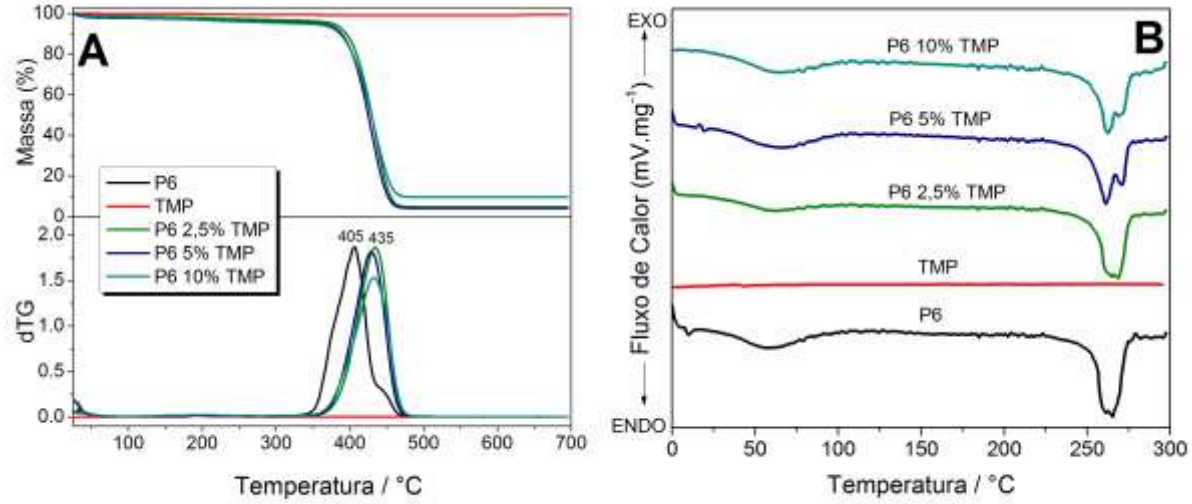


Figura 9. Comportamento mecânicos dos nanocompósitos.

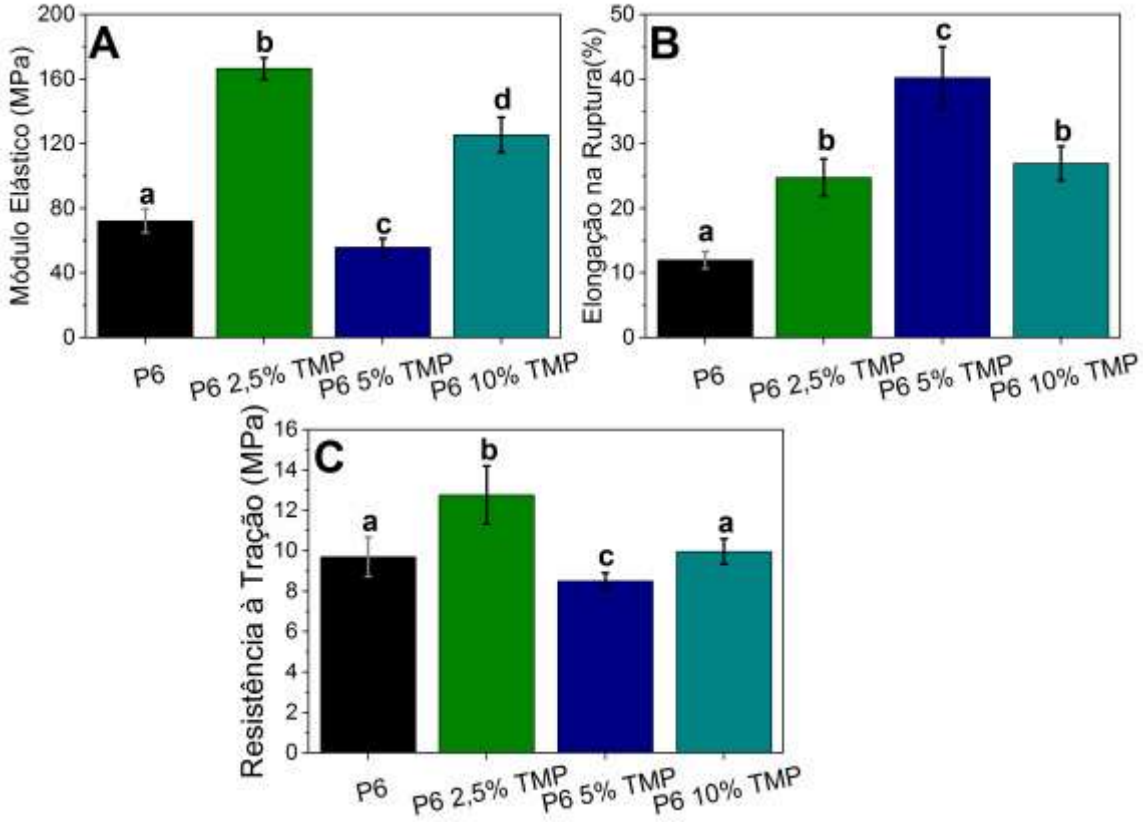


Figura 10. Valores médios de liberação de Ag+ e TMP dentre 12 horas.

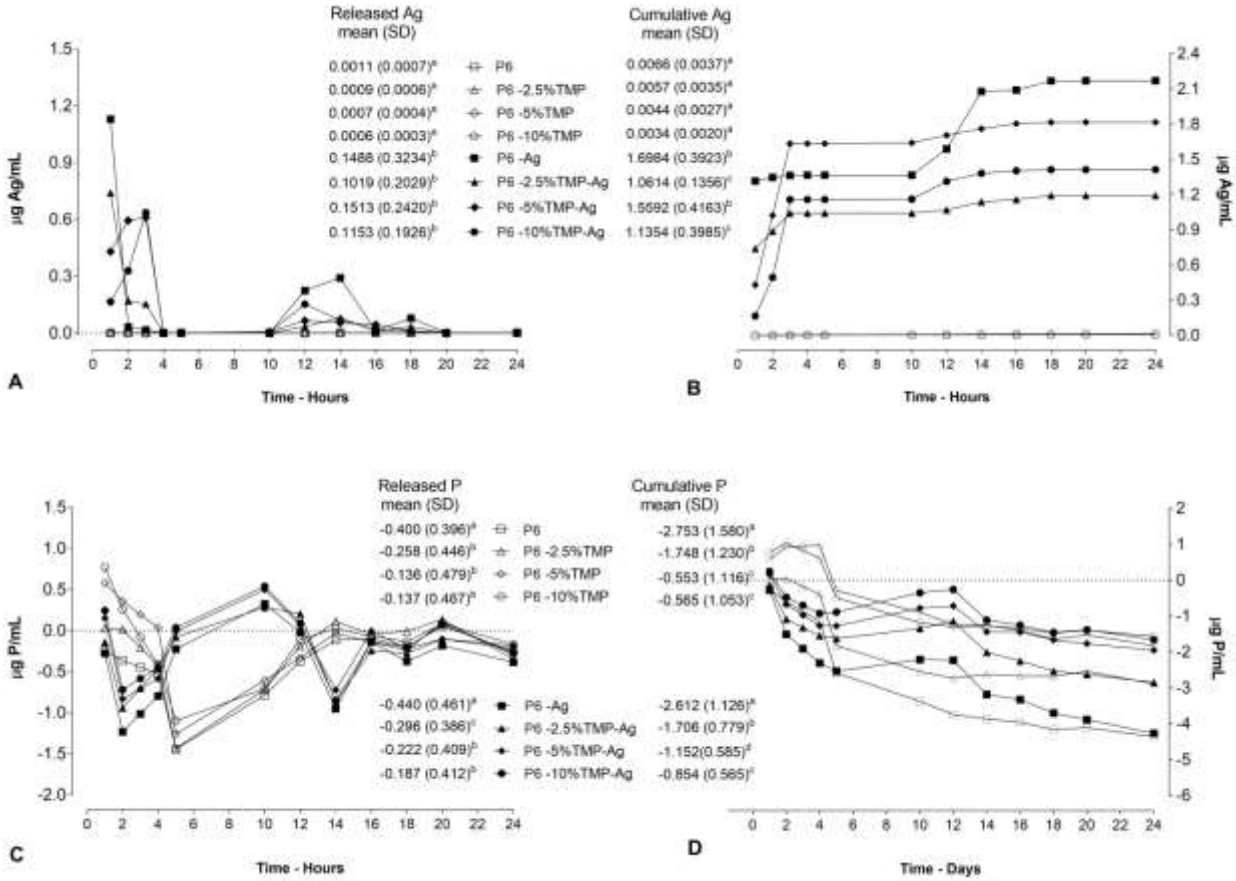


Figura 11. Médias e desvio-padrão (barras) dos diâmetros dos halos de inibição para *S. mutans* (a) e *C. albicans* (b).

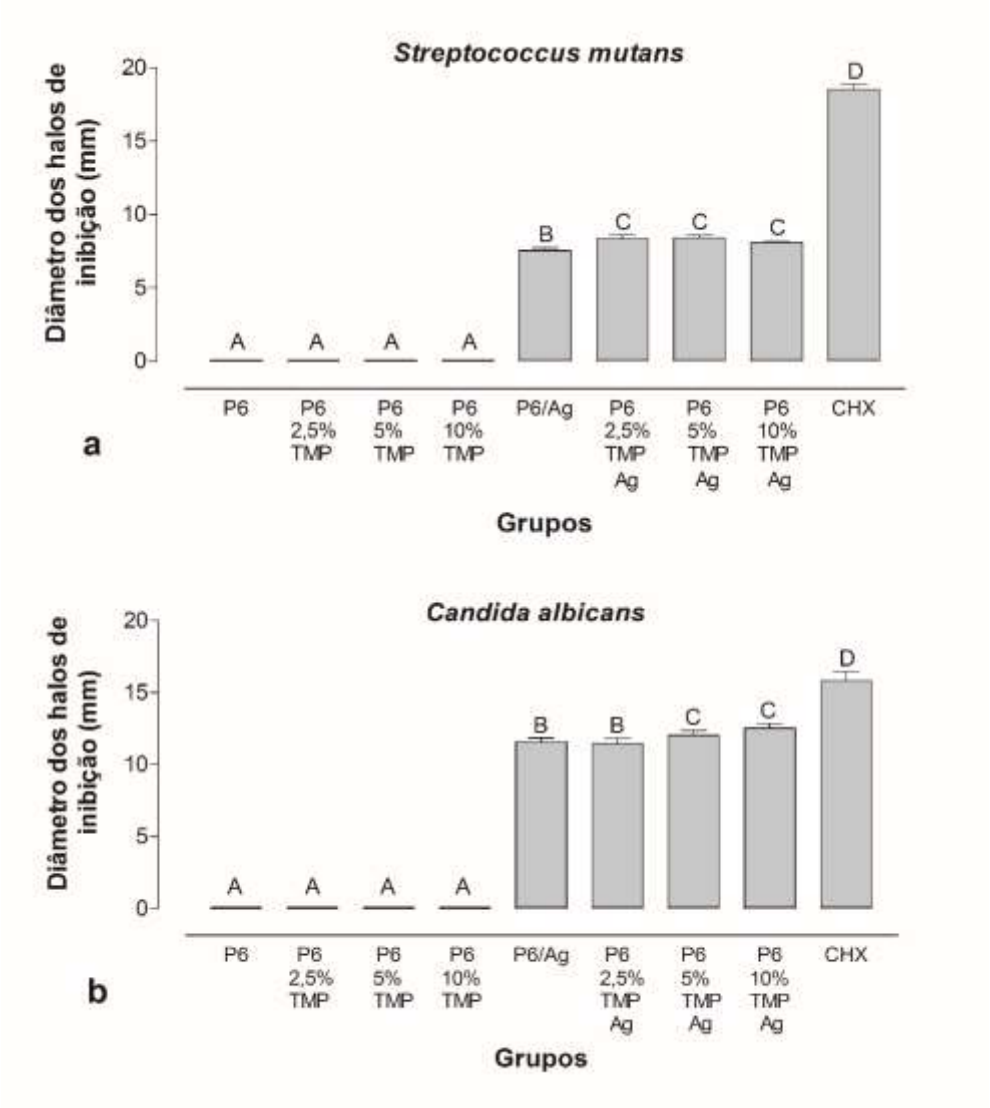
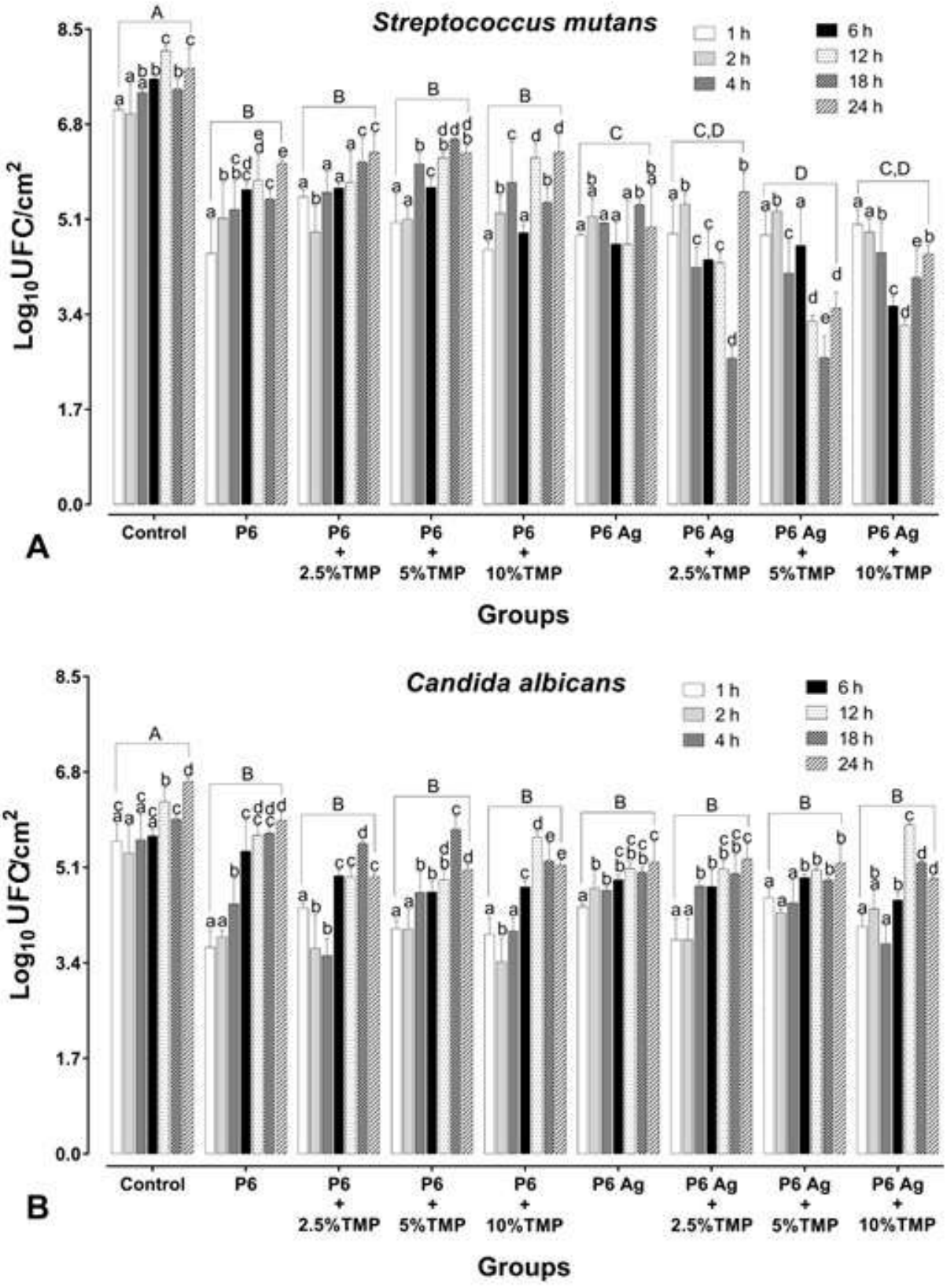


Figura 12. Logaritmo (média ± dp) das unidades formadoras de colônias por cm² para *S. mutans* e *C. albicans* em biofilme misto.



Anexos

9. ANEXOS

9.1 ANEXO A

JOURNAL OF DENTISTRY

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

JOURNAL OF DENTISTRY

IMPACT FACTOR
2016: 3.456 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2017

INTRODUCTION

The Journal of Dentistry is the leading international dental journal within the field of Restorative Dentistry. Placing an emphasis on publishing novel and high-quality research papers, the Journal aims to influence the practice of dentistry at clinician, research, industry and policy-maker level on an international basis.

Topics covered include the management of dental disease, periodontology, endodontology, operative dentistry, fixed and removable prosthodontics, and dental biomaterials science, long-term clinical trials including epidemiology and oral health, dental education, technology transfer of new scientific instrumentation or procedures, as well clinically relevant oral biology and translational research.

Submissions are welcomed from other clinically relevant areas, however, the Journal places an emphasis on publishing high-quality and novel research.

Queries in relation to manuscript content should be directed to the Journal Editorial Office in the first instance.

Submissions

Authors are requested to submit their original manuscript and figures via the online submission and editorial system for Journal of Dentistry. Using this online system, authors may submit manuscripts and track their progress through the system to publication. Reviewers can download manuscripts and submit their opinions to the editor. Editors can manage the whole submission/review/revise/publish process. Please register at: http://ees.elsevier.com/jjod

Types of paper

Contributions falling into the following categories will be considered for publication:- Original Research

Reports: maximum length 6 printed pages approximately 20 typescript pages, including illustrations and tables.

- Review articles: maximum length 10 printed pages, approximately 33 typescript pages, including illustrations and tables.

- Short communication for rapid publication: maximum length 2 printed pages, approximately 7 typescript pages, including illustrations.

- Letters providing informed comment and constructive criticism of material previously published in the Journal.

All typescripts must be accompanied by a Permission Note. This is a letter signed by each author (not just the corresponding author), affirming that the paper has been submitted solely to Journal of Dentistry and that it is not concurrently under consideration for publication in another journal.

Prospective authors should confirm that the submitted work, including images, are original. Authors are reminded that if included images (e.g. Tables and Figures) have been previously published may require copyright permission.

Please note the Journal of Dentistry does not accept Case Reports and these will be removed from the system if submitted.

Authorship

Only those persons who have made a significant contribution to the manuscript submitted should be listed as authors. The Editor-in-Chief expects that a manuscript

should normally have no more than 6 authors, unless a case is made by the corresponding author within the article cover letter to include other authors. All of the named authors should have been involved in the work leading to the publication of the paper and should have read the paper before it is submitted for publication.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present: One author has been designated as the corresponding author with contact details:

• E-mail address
• Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

• Include keywords
• All figures (include relevant captions)
• All tables (including titles, description, footnotes)
• Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
• Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

• Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
• All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
• Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
• A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
• Journal policies detailed in this guide have been reviewed
• Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements.

For further information, visit our Support Center.

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Cross Check.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Clinical trial results

In line with the position of the International Committee of Medical Journal Editors, the journal will not consider results posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides to be prior publication if the results posted are presented in the form of a brief structured (less than 500 words) abstract or table. However, divulging results in other circumstances (e.g., investors' meetings) is discouraged and may jeopardise consideration of the manuscript. Authors should fully disclose all posting in registries of results of the same or closely related work.

Reporting clinical trials Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The CONSORT checklist and template flow diagram are available online.

Registration of clinical trials

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with International Committee of Medical Journal Editors recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

Article transfer service This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

More information.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

• Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.

• No open access publication fee payable by authors.

Open access

• Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.

• An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, per permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is USD 2200, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: http://www.elsevier.com/openaccesspricing.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more. This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via http://ees.elsevier.com/jjod.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a double blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the

article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.
To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.
Introduction
The introduction must be presented in a structured format, covering the following subjects, although not under subheadings: succinct statements of the issue in question, and the essence of existing knowledge and understanding pertinent to the issue. In keeping with the house style of Journal of Dentistry, the final paragraph of the introduction should clearly state the aims and/or objective of the work being reported. Prospective authors may find the following form of words to be helpful: "The aim of this paper is to ..." Where appropriate, a hypothesis (e.g. null or a priori) should then be stated. Essential title page information
• Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
• Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the
e-mail address of each author.
• Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
• Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.
The title page should contain the following information:
- Title of paper
- Short title
- Name(s), job titles and address(es) of author(s) (no academic degrees necessary)
- Name, address, telephone, fax and e-mail of the corresponding author
- Up to 6 keywords
Spelling: International English.
Authors are urged to write as concisely as possible.
The house style of Journal of Dentistry requires that articles should be arranged in the following order: Title, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Tables, Figures. A cover letter should accompany the new manuscript submission, within which the authors should indicate the significance of the work being submitted in a statement no more than 100 words. A signed permission note (details below) must also be included.
Abstract: should not exceed 250 words and should be presented under the following subheadings:
Objectives, Methods; Results; Conclusions (For Reviews: Objectives; Data; Sources; Study selection; Conclusions). A 50 word 'Clinical Significance' statement should appear at the end of the abstract advising readers of the clinical importance and

relevance of their work. These subheadings should appear in the text of the abstract. Please repeat the title of the article at the top of the abstract page.
Introduction: must be presented in a structured format, covering the following subjects, although not under subheadings: succinct statements of the issue in question, and the essence of existing knowledge and understanding pertinent to the issue. In keeping with the house style of Journal of Dentistry, the final paragraph of the introduction should clearly state the aims and/or objective of the work being reported. Prospective authors may find the following form of words to be helpful: "The aim of this paper is to ..." Where appropriate, a hypothesis (e.g. null or a priori) should then be stated.
Keywords: up to 6 keywords should be supplied.
Abbreviations and acronyms: terms and names to be referred to in the form of abbreviations or acronyms must be given in full when first mentioned. Units: SI units should be used throughout. If non-SI units must be quoted, the SI equivalent must immediately follow in parentheses. The complete names of individual teeth must be given in the test. In tables and legends for illustrations individual teeth should be identified using the FDI two-digit system.
Statistics
Statistical methods should be described with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, findings should be quantified and appropriate measures of error or uncertainty (such as confidence intervals) given. Details about eligibility criteria for subjects, randomization and the number of observations should be included. The computer software and the statistical method(s) used should be specified with references to standard works when possible (with pages specified). See http://www.icmje.org/manuscript_1prepare.htmL for more detailed guidelines.
Illustrations: should be submitted electronically using appropriate commercial software. Prospective authors should follow the relevant guidelines (available from: http://www.elsevier.com/ artworkinstructions). In addition, it is noted that while authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, journals published by Elsevier apply the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.
Abstract
The Abstract should not exceed 250 words and should be presented under the following subheadings:
Objectives, Methods; Results; Conclusions. A 50 word 'Clinical Significance' statement should appear at the end of the abstract advising readers of the clinical importance and relevance of their work. These subheadings should appear in the text of the abstract. Please repeat the title of the article at the top of the abstract page. For Review Articles the abstract should be presented under the following subheadings: Objectives; Data; Sources; Study selection; Conclusions.
Graphical abstract
Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information

site. Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmLy established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa]. It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly.

For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

• Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
• Embed the used fonts if the application provides that option.
• Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
• Number the illustrations according to their sequence in the text.
• Use a logical naming convention for your artwork files.
• Provide captions to illustrations separately.
• Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
• Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.
Please do not:
• Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
• Supply files that are too low in resolution;
• Submit graphics that are disproportionately large for the content.
Color artwork
Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.
Illustration services
Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.
Figure captions
Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.
Tables
Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.
References
Citation in text
Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.
Reference links
Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged. A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available

online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. Journal of Geophysical Research, https://doi.org/10.1029/2001JB000884. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M.

(2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. Journal of Geophysical Research, https://doi.org/10.1029/2001JB000884. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. Journal of Geophysical Research, https://doi.org/10.1029/2001JB000884. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue Reference management software Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as

well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-dentistry When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ....' List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. http://www.cancerresearchuk.org/ aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. https://doi.org/10.17632/ xwj98nb39r.1.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly

relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB in total. Any single file should not exceed 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page. For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the

paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor.

Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

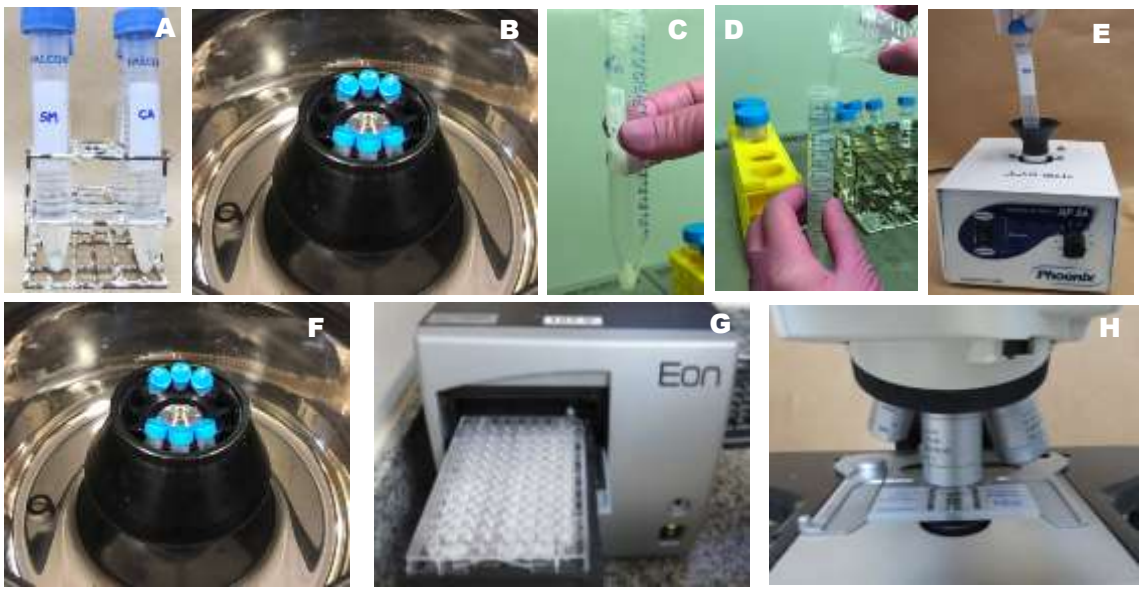
The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link. The decision of the Editor-in-Chief is final in relation to all manuscript submissions.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

9.2 ANEXO B

ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PREPARAÇÃO DO INÓCULO DA CEPA DE *S. MUTANS* E *C. ALBICANS*



(A)Preparação do pré-inóculo de *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231; (B) Inóculo foi centrifugado a 8000 rpm durante 5 min; (C) Obtenção do pellet de células e descarte do sobrenadante; (D) Células de *S. mutans e C. albicans* foram lavadas com NaCl (0,85%), (E) Homogeneizadas em vórtex e (F) Centrifugadas novamente (foram realizadas duas lavagens com NaCl); (G) Alíquotas de 200 µl foram adicionadas aos poços de placas de 96 poços e levadas para leitura em espectrofotômetro a 640 nm a fim de ajustar o número de células de *S. mutans* para 10^8 células/mL em BHI caldo. (H) O número de células de *C. albicans* foi ajustado para 10^7 células / mL em BHI caldo usando uma câmara de Neubauer.

9.3 ANEXO C

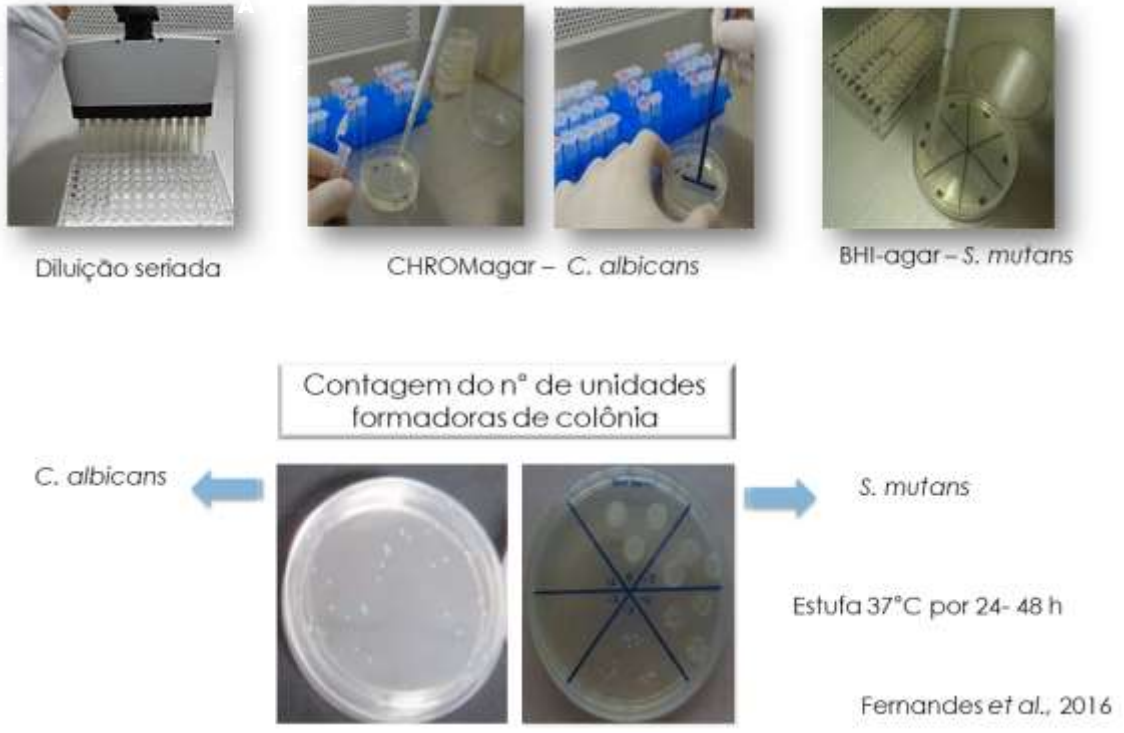
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA



(A) Diluição (1:5) das suspensões das AgNP com e sem NH_3 no meio de cultura BHI caldo (*S. mutans*) e RPMI (*C. albicans*); (B) Inoculação de colônias de *S. mutans e C. albicans* em solução salina 0,85%; (C) Homogenização em vórtex da suspensão da cepa; (D) Ajuste da turbidez da suspensão da cepa ao padrão 0,5 da escala McFarland; (E) Diluição (1:5) da suspensão celular em solução salina; (F) Diluição (1:20) da suspensão celular no meio BHI caldo e RPMI; (G) Inserção, com auxílio de pipeta multicanal, de 100 µl de cada concentração de AgNP diluído em BHI caldo ou RPMI + 100 µl da suspensão de *S. mutans* em BHI caldo ou de *C. albicans* em RPMI ; (H) Plaqueamento do conteúdo de cada poço após 48 horas de incubação para determinação da concentração bactericida mínima das AgNP.

9.4 ANEXO D

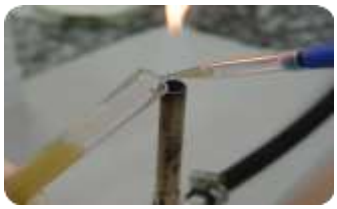
QUANTIFICAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC)



1. Diluição seriada em NaCl dos grupos de P6-TMP e P6-TMP-Ag em diferentes horas. 2. Plaqueamento das diluições no meio de cultura CHROMagar (*C. albicans*). 3. BHI ágar (*S. mutans*); 4 e 5. Crescimento das UFCs de *C. albicans e S. mutans*, respecitvamente.

9.5 ANEXO E

DETERMINAÇÃO DOS HALOS DE INIBIÇÃO



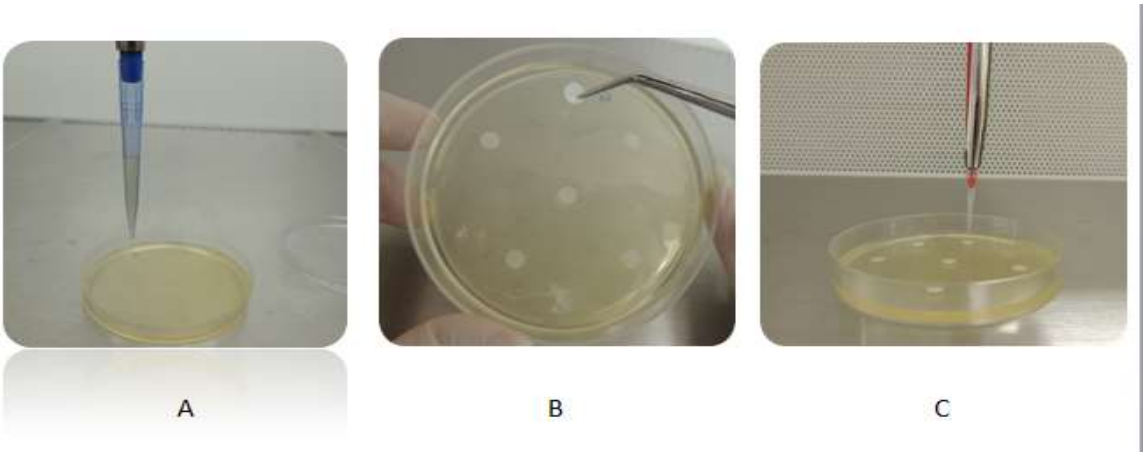


S. mutans



C. albicans

1. Preparo do inóculo de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* em meio de cultura BHI (caldo).
2.



(A) 300 µl de cada suspensão bacteriana. (B) inserção das membranas de P6 no ágar. (C) pipetagem da clorexidina 0,2% como controle positivo.

3. Após pipetagem, as placas de BHI são levadas para estufa de CO2 por 24 horas. Após 24 horas é feito a medição dos halos de inibição com o auxilio de um paquimetro digital.

9.6 ANEXO F

ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DE FOSFATO





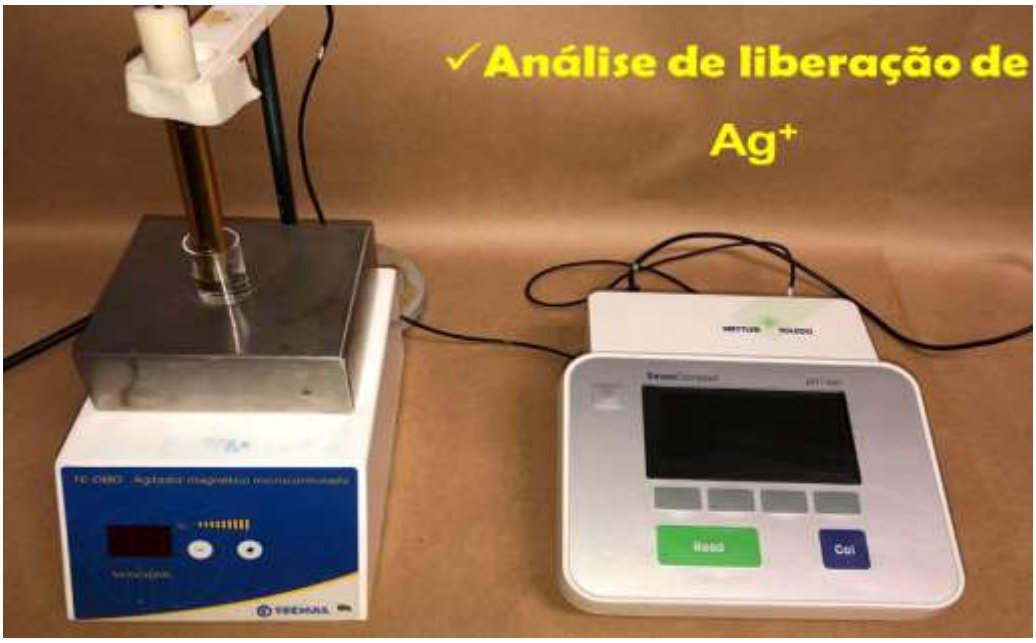
Método colorimétrico em placas de 96 poços



Leitura da placa no Espectrofotômetro

9.7 ANEXO G

ANÁLISE DE LIBERAÇÃO DE ÍONS PRATA



1. Para determinar a quantidade de prata iônica (Ag^+) presente nos biomateriais, um eletrodo específico foi conectado a um analisador de íons, calibrado previamente com padrões contendo 6,25 a 100 µg Ag/mL. Em 1 mL da amostra, adicionou-se 0,020 mL de ISA. Os valores foram obtidos em mV e, na sequência, convertidos em µg Ag/cm^2. As dosagens foram realizadas em duplicata.