



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

BIANCA CARVALHO DE ALMEIDA

**Avaliação da citotoxicidade de biomateriais
nanocompostos de poliamida 6 e nanopartículas
de trimetafosfato decoradas com nanopartículas
de prata**

**Araçatuba – SP
2023**

BIANCA CARVALHO DE ALMEIDA

**Avaliação da citotoxicidade de biomateriais
nanocompostos de poliamida 6 e nanopartículas
de trimetafosfato decoradas com nanopartículas
de prata**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Odontologia de Araçatuba da
Universidade Estadual Paulista
(Unesp), como parte dos requisitos
para obtenção do título de Cirurgião-
Dentista.

Orientador: Prof. Alberto Carlos
Botazzo Delbem

**Araçatuba – SP
2023**

Dedico este trabalho à
Deus por ter me dado
sabedoria e
direcionamento e aos
meus pais, Cinara e
Luciano por terem sido
meu alicerce durante toda
vida.

AGRADECIMENTOS

Estes agradecimentos são para as pessoas que fizeram parte da minha trajetória ao longo de todas esses anos e que foram indispensáveis para que eu pudesse percorrê-la.

A Deus:

Obrigada por me dar forças para caminhar todos os dias. O Senhor foi tão generoso comigo, quando me deu sabedoria, saúde e pessoas tão iluminadas. Obrigada, Papai, por guiar meus passos e cuidar de cada detalhe. TUDO foi graças ao Senhor.

Aos meus pais:

Pai, obrigada por nunca soltar a minha mão e por me apoiar em todas as minhas decisões. Esse sonho só pôde se tornar real, graças à confiança que depositou em mim. Saiba que seu abraço muitas vezes foi meu impulso para continuar.

Mãe, obrigada por sempre se fazer tão presente mesmo a quilômetros de distância. Cada passo da minha caminhada tinha por trás uma mulher forte e guerreira, em quem eu sempre pude me espelhar. Obrigada por confiar em mim e sonhar meus sonhos comigo.

Ao meu irmão:

Lu, você é meu sonho realizado. Minha luta diária sempre tinha uma razão. Você, pequeno, foi meu combustível. Seu jeitinho carinhoso e cheio de amor sempre me fazia enxergar que eu era e precisava ser capaz de vencer. Você via em mim uma figura de exemplo e isso, com certeza, me fez lutar. Eu queria que soubesse que a sua irmã estaria sempre aqui, forte e disponível para você.

Aos meus avós:

Vovó Bernadete, agradeço por sempre pedir a Deus que me desse sabedoria para que eu pudesse concluir esse ciclo. A senhora foi quem me ensinou a estudar e isso me impulsionou a lutar por minha formação. Obrigada por tantas vezes ter feito do seu colo, meu aconchego.

Vovó Ana, sou grata por tantas vezes ter me ouvido. Com a senhora pude ver como existem diferentes formas de demonstrar amor e afeto. Obrigada por fazer de cada uma das minhas tarefas, também as suas.

Vovô Jairo, pra mim o senhor é um grande exemplo de que persistir é sempre o melhor caminho para alcançar nossos objetivos. Seu apoio foi indispensável. Obrigada por vibrar por cada uma das minhas vitórias e se orgulhar tanto de mim.

Vovô Pepida, o senhor esteve presente em cada segundo, desde que eu ainda estava na barriga da minha mãe. Seu amor é tão puro e especial. Obrigada por me carregar no colo, por cada conversa, mensagem e ligação. Você é alicerce.

À minha madrastra:

Cássia, obrigada por se fazer presente durante todos esses anos e me presentear com a minha razão de lutar, meu irmãozinho Luciano.

Aos meus tios:

Tio Leonardo, sou grata por nossas conversas, por me aconselhar e me compreender sempre. Vivi e vivo, ao seu lado, momentos inesquecíveis e de muita alegria. Não troco nossa parceria por nada. Sorte a minha ter você, Peeta.

Tia Sônia, obrigada por cada conselho, cada abraço e cada demonstração de amor. Sou grata por confiar em mim, em momentos que nem eu confiava. E por nunca me deixar desistir. Seu abraço é como um lar.

Tia Eliana, obrigada por ter cuidado tão bem de mim e ter me dado tanto amor. Alto astral e muitas risadas sempre estiveram presentes nos nossos momentos juntas. Obrigada por ser fonte de alegria.

Tio Leandro, obrigada por se alegrar tanto pelas minhas conquistas e pelo seu jeito único de demonstrar carinho e afeto. O sorriso que sempre abre, ao me ver chegar, já diz tudo.

Às minhas bisas (in memorian):

Maria e Quintina, vocês foram para mim exemplos de sabedoria e amor e me deixaram ensinamentos que ficarão para sempre em meu coração. Obrigada por terem olhado por mim e me cuidado de longe. Tenho certeza que, de onde estiverem, serão capazes de sentir minha gratidão.

Ao meu namorado:

Pedro, você esteve comigo em cada segundo dessa jornada. Sem seu apoio e amor, eu jamais conseguiria chegar até aqui. Obrigada por cuidar de cada detalhe, por confiar tanto no meu potencial e por ter me dado a mão para levantar, o ombro para deitar e o peito para dormir. Sou grata por ter um homem tão incrível ao meu lado. Seu amor foi essencial.

À minha sogra:

Dona Laura, obrigada por sempre vibrar por mim. Você foi quem confiou que eu era capaz de passar no vestibular da UNESP e me deu todo apoio sempre. Ter sido sua aluna me fez ver o quão lindo e precioso é

transmitir amor em nosso trabalho. Obrigada por ser minha confidente, amiga e ser dona de um abraço tão cheio de amor.

Ao meu sogro:

Neto, obrigada pelo apoio sempre e pelas inúmeras risadas que você conseguiu me arrancar em dias difíceis.

Aos meus amigos:

Bruna Martins, Bruna Estevão, Rafaella e Matheus Volfe, sou tão grata por ter vocês durante todos esses anos na minha vida. Obrigada por terem sido essenciais para que eu pudesse estar na UNESP. A escola me deu uma família e vocês, com certeza, são os irmãos mais especiais que eu poderia ter. Que bom que o tempo e as trajetórias não foram capazes de apagar o companheirismo e o amor que temos uns pelos outros.

Laura Souza, obrigada por cada momento. Ter conhecido você foi, sem dúvida, indispensável para minha permanência em Araçatuba. Obrigada por cada jantinha, cada dia que você tirou para que pudéssemos cultivar essa nossa amizade tão especial e pelo companheirismo sempre. Espero ter você para sempre na minha vida, mesmo que distante.

Maria Paula, obrigada por sua dedicação, seus carinho e cuidado. Sou grata por seus abraços, na clínica, em dias difíceis, e por tantas vezes completar meu coraçãozinho. Que o tempo não seja capaz de nos afastar.

Emmily, você foi uma das primeiras amigas que fiz em Araçatuba e que, em pouquíssimo tempo, se tornou uma irmã. Obrigada por não ter me deixado desistir e confiado tanto em mim. Sou grata por ter você e por cada memória ao seu lado.

Júlia Moro, você foi quem me inspirou e incentivou a permanecer na odontologia. Sempre tive você como exemplo de estudante e profissional.

Obrigada por me socorrer tantas vezes em diversas situações e sobretudo por me fazer enxergar o quão longe eu poderia chegar, se me dedicasse.

Matheus Fonseca, obrigada por seus abraços calorosos todos os dias de manhã e por ser esse amigo tão alto astral. Little, sou grata por cada risada, cada gesto de carinho e por ser responsável por alegrar as manhãs cinzentas.

Geórgia, sua amizade surgiu num momento em que minha vida acadêmica estava tão turbulenta e você, com seu jeitinho carinhoso, se aproximou e me ajudou muito. Obrigada por todas as vezes que estive ao meu lado e por nossa parceria.

Emili, Analigia e Ana, obrigada por terem me acolhido tão bem desde o primeiro dia de aula e por terem aguentado minhas crises no primeiro ano.

Doany e Beatriz Costa, vocês foram minhas duplas de clínica, mas, além disso, foram grandes companheiras nessa jornada. Obrigada por nossa parceria e pela oportunidade de evoluirmos juntas a cada procedimento. Sou grata pela compreensão e acolhimento de vocês.

À Escola Presidente Vargas:

Minha eterna gratidão por tudo o que aprendi e vivi. Para mim, a escola sempre foi um lar. Sem esse ambiente de amor e aprendizado, eu jamais conseguiria chegar até aqui. Obrigada a cada um da família PV, essa conquista é nossa.

À minha Banca:

Meu Orientador, Profº Alberto Delbem, que foi indispensável para a concretização deste trabalho. Agradeço por me orientar tanto no TCC, quanto nos meus dois anos de Iniciação Científica. Obrigada pela

oportunidade de trabalharmos juntos, por cada ensinamento e pela paciência.

Leonardo Moraes, sou grata por nossa parceria. Obrigada por sempre ter me incentivado e por confiar sempre que eu era capaz. Todas as minhas apresentações tinham, na retaguarda, um pós graduando incrível e que me dava todo suporte do mundo. Você esteve presente em cada detalhe deste trabalho e ele é tão seu quanto meu.

Prof^o. Daniela Micheline, agradeço por seu profissionalismo e por ser uma pessoa tão bondosa. Sem dúvidas, levarei para sempre comigo cada ensinamento seu. Não só profissional, mas, também, sobre a forma empática e carinhosa com que trata as pessoas. Me sinto privilegiada por ter sido sua aluna e orientada na clínica.

Aos funcionários:

Obrigada por estarem sempre dispostos a nos ajudarem e por tornarem nossos dias mais leves. A dedicação de vocês fez com que eu pudesse chegar todos os dias na faculdade e saber que sempre estaria tudo em ordem e que eu sempre poderia contar com o apoio de pessoas tão solícitas.

À FOA UNESP:

Obrigada por ter sido minha casa durante esses quase 6 anos e por ter me proporcionado momentos felizes e de muito aprendizado. A estrutura da faculdade foi, sem dúvidas, indispensável para meu crescimento pessoal e profissional. Sou grata por fazer com que meu caminho cruzasse com o de profissionais e amigos tão incríveis.

“ Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas ”

O Pequeno Príncipe

“ 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

ALMEIDA, B. C. **Avaliação da citotoxicidade de biomateriais nanocompostos de poliamida 6 e nanopartículas de trimetafosfato decoradas com nanopartículas de prata.** 2023. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

A perda de tecido causado pela 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. Esse estudo avaliou a citotoxicidade de biomateriais nanocomposto de poliamida 6, trimetafosfato de sódio (TMP) e nanopartículas de prata (AgNP) para o desenvolvimento de novos biomateriais. Fibroblastos (NIH/3T3) foram cultivados em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 °C, 100% de umidade e 5% CO₂. As células foram subsequentemente semeadas em placas de 96 poços (10⁴ células/poço) juntamente com os nanocompostos (P6, P6-2,5% TMP, P6-5% TMP e P6-10% TMP) e incubadas por 24 h, nas mesmas condições descritas acima. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), após 24, 48 horas e 72 horas. Os resultados foram submetidos à ANOVA a dois critérios, seguidos pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Os grupos com P6-TMP apresentaram maior viabilidade quando comparado aos grupos com AgNP, independentemente do tempo ($p < 0,05$). Os grupos com AgNP, mostraram viabilidade celular reduzida para todas as diluições, com maior redução no tempo de 24 h, quando comparado a 48h e 72 horas ($p < 0,05$). Todos os grupos apresentaram um aumento da viabilidade no tempo de 72 horas ($p < 0,05$). Conclui-se que a associação do TMP e a AgNP no período de 72 horas reduz a citotoxicidade dos fibroblastos se mostrando como um composto interessante para o desenvolvimento de novos biomateriais.

Palavras-chave: Nanocomposto. Fosfatos. Nanopartículas. prata.

ALMEIDA, B. C. **Assessment of the cytotoxicity of nanocompounds biomaterials composed of polyamide 6 and trimetaphosphate nanoparticles decorated with silver nanoparticles.** 2023. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Tissue loss caused by dental caries or trauma encourages research in tissue engineering, with biomaterials, with the intention of regenerating structure and reestablishing form and function. This study evaluated the cytotoxicity of polyamide 6 nanocompounds biomaterials, sodium trimetaphosphate (TMP) and silver nanoparticles (AgNP) for the development of new biomaterials. Fibroblasts (NIH/3T3) were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C, 100% humidity and 5% CO₂. The cells were subsequently seeded in 96-well plates (104 cells/well) together with the nanocompounds (P6, P6-2.5% TMP, P6-5% TMP and P6-10% TMP) and incubated for 24 h in the same conditions described above. Cell viability was assessed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay after 24, 48 and 72 hours. The results were submitted to two-way ANOVA, followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). Groups with P6-TMP showed greater viability when compared to groups with AgNP, regardless of time ($p < 0.05$). The AgNP groups showed reduced cell viability for all dilutions, with a greater reduction at 24 h, when compared to 48 h and 72 h ($p < 0.05$). All groups showed an increase in viability at 72 hours ($p < 0.05$). It is concluded that the association of TMP and AgNP within 72 hours reduces the cytotoxicity of fibroblasts, showing itself as an interesting compound for the development of new biomaterials.

Keywords: Nanocompounds. Phosphates. Nanoparticles. Silver.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens de MEV das fibras de P6 e de seus nanocompostos. A: Fibra de P6. B: Nanocomposto P6-TMP2,5%. C: Nanocomposto P6-TMP-5%. D: Nanocomposto P6-TMP-10% 19

Figura 2 - Histogramas das fibras de P6 e de seus nanocompósitos. A: Fibra de P6. B: Nanocompósito P6-TMP-2,5%. C: Nanocompósito P6-TMP-5%. D: Nanocompósito P6-TMP-10% 20

Figura 3 - Histogramas de EDX das fibras de P6 e de seus nanocompósitos. A: Fibra de P6. B: Nanocompósito P6-TMP-2,5%. C: Nanocompósito P6-TMP-5%. D: Nanocompósito P6-TMP-10% 20

Figura 4 - Viabilidade dos fibroblastos NIH/3T3 determinada por um ensaio MTT de acordo com os grupos de P6-TMP com e sem Ag e o tempo de ensaio. Letras minúsculas distintas mostram diferença entre os grupos e tempo de ensaio ($p < 0,05$). Barras verticais indicam desvio-padrão 21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1 Preparação dos nanocompostos PA6 e TMP-AgNP	16
2.2 Avaliação da citotoxicidade de nanocompostos PA6 e TMP-AgNP	17
2.3 Análise Estatística	18
3 RESULTADOS	19
3.1 Síntese e Caracterização das membranas P6-TMP-AgNP	19
3.2 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio MTT	21
4 DISCUSSÃO	22
5 CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

O trimetafosfato sódio (TMP) é o ciclofosfato muito estudado para aplicações odontológicas (MANNA *et al.*, 2014) devido a sua ação anticárie (DANELON *et al.*, 2013; GONZALEZ, 1971) por intermédio da adsorção do ciclofosfato na superfície do esmalte dentário (MANARELLI *et al.*, 2014), o qual facilita a difusão de cátions para o esmalte dentário (DELBEM *et al.*, 2012). Reduzir o tamanho das partículas do TMP pode ser uma estratégia eficiente para aumentar o seu potencial anticárie. Estudos recentes demonstraram 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* (DANELON *et al.*, 2015). O desenvolvimento destas nanopartículas de ciclofosfatos propiciou o aumento do efeito anticárie, utilizando menores quantidades de fosfatos em dentifrícios fluoretados (TAKESHITA *et al.*, 2015).

Recentemente, a Poliamida 6 (P6) passou a ser estudada em engenharia tecidual óssea devido às suas excelentes propriedades mecânicas resultadas a partir da ligação de hidrogênio entre os grupamentos amida presentes nas macromoléculas de P6 (ABDAL-HAY; HAMDY; KHALIL, 2015; SHEN *et al.*, 2010), biocompatibilidade (SHEN *et al.*, 2011), atoxicidade (PANT *et al.*, 2013a), diferentes morfologias como fibras, baixo custo, estabilidade química e térmica (ABDAL-HAY; TIJING; LIM, 2013). No entanto, características superficiais, como a hidrofiliabilidade e a baixa funcionalidade da PA6, dificultam a sua aplicação como scaffold (PANT; KIM, 2013). Para minimizar ou solucionar este problema, a funcionalização da PA6 com grupos fosfato tem sido utilizada para iniciar a mineralização *in vitro* de tecidos ósseos e dentários (WINTGENS *et al.*, 2013). Cheng *et al.* (2013) mostrou que o nanocomposto de PA6 com nanohidroxiapatita agiu como um template para a adesão, crescimento e proliferação de células. Pant *et al.* (2013a, 2013b) verificaram que nanocompostos formados a partir de nanofibras de P6 apresentaram atoxicidade e proliferação de células osteoblásticas. Venkatesan e Kim

(2014) relataram que nanocomposto de P6 com fosfato apresentaram osteogênese.

Entretanto, nem o P6 e nem o TMP (EREM *et al.*, 2013; MENDES-GOUVÊA *et al.*, 2018) apresentam atividade antimicrobiana. Quando o TMP é impregnado com nanopartículas de prata (AgNP), este composto demonstra significativa atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* (GOUVEA *et al.*, 2016). As AgNP apresentam estabilidade (MENDES-GOUVÊA *et al.*, 2018), baixa toxicidade e atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* (FERNANDES *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2016). Porém, não só o tipo de fosfato (inorgânico ou orgânico) associado à AgNP pode influenciar na ação antimicrobiana (FERNANDES *et al.*, 2017; MENDES-GOUVÊA *et al.*, 2018), mas também a rota utilizada para estas sínteses como a via química ou a via “green” (SAUVESUK *et al.*, 2016). Assim, quando AgNP são associadas a novos compostos é necessária à realização de novos testes para determinar se os compostos sintetizados apresentarão comportamentos biológicos diferentes.

Considerando que a cárie na infância é um problema preocupante à saúde pública e tomando como base os recentes avanços na área de novos materiais a partir do advento da nanotecnologia, seria interessante o desenvolvimento de uma nova família de materiais nanocompostos que apresentem ação antimicrobiana e baixa citotoxicidade para serem empregados como scaffold para a regeneração de tecidos dentários baseados na PA6, nanopartículas de TMP e decorados com AgNP.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação dos nanocompostos PA6 e TMP-AgNP

As nanopartículas de TMP foram obtidas empregando uma metodologia de moagem otimizada por nosso grupo de pesquisas para a produção de grandes quantidades de TMP nanométrico (~23 nm) para a formulação de dentifrícios ativos contra a ação de cáries, como descrito por Danelon *et al.* (2015). TMP imerso em isopropanol é moído utilizando bolinhas de zircônia durante 48 horas. A síntese das AgNP foi realizada de acordo com o proposto por Lee e Oh (2015). O método consiste na redução dos íons Ag⁺ utilizando etanol que atuará como solvente e como agente redutor para a formação das AgNP.

A produção das nanofibras de P6 foi realizada seguindo a metodologia proposta por Andre *et al.* (2015). A P6 (MW= 20000 g.mol⁻¹) foi solubilizada em ácido fórmico em uma concentração de 15% (m/v) sob agitação magnética constante por 5 h à 25°C. Em seguida, a solução homogeneizada foi eletrofiada em um aparelho de electrospinning com uma tensão de 25 kV e vazão de 10 µL.hora⁻¹ empregando um substrato coletor de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) posicionado a uma distância de 10 cm da seringa.

Os nanocompostos de P6 com TMP nanoparticulado foram preparados como descrito por Mi *et al.* (2014). As amostras de P6 e de TMP foram solubilizadas em ácido fórmico sob agitação magnética constante por 5 horas à 25 °C em que foram variadas as concentrações de TMP em relação a massa de P6 (2,5, 5 e 10%). Posteriormente, a solução foi eletrofiada em um aparelho de electrospinning empregando as condições otimizadas na eletrofiação do P6. A impregnação de AgNP aos nanocompostos de P6-TMP nas concentrações de 2,5, 5 e 10% foi realizada pela imersão das membranas em 15 mL de uma solução de AgNP em concentração de 12 mM, durante 24 horas a temperatura ambiente.

Para investigação da morfologia das fibras foram obtidas imagens

utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura FEG-VP Zeiss Supra 35 ("Field Emission Electron Guns"), após recobrimento da superfície das amostras com ouro (sputtering) visando elevar a condutividade do material. A verificação da incorporação das nanopartículas de TMP e prata nas fibras de P6 foi realizada pela técnica de espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDX). Os diâmetros das fibras foram avaliados utilizando o software ImageJ. Para cada amostra a distribuição e diâmetro médio foi determinado a partir da análise de 200 fibras.

2.2 Avaliação da citotoxicidade de nanocompostos P6 e TMP-AgNP

As células de fibroblastos da linhagem NIH/3T3 foram cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% soro fetal bovino (SBF), penicilina G (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), anfotericina B (25 µg/mL) e incubadas em estufa a 37 °C, com 5 % de CO₂. As células foram sub-cultivadas a cada 5-7 dias, usando solução salina 0,9 % para lavá-las e tripsina 0,25 % para desagregá-las do frasco. Após desagregação, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos a 15°C, ressuspendidas em meio DMEM completo (suplementado com SBF). Os meios de cultura e demais reagentes utilizados no cultivo das células foram adquiridos da Gibco®. Os fibroblastos, sub-cultivados foram inoculados em microplacas de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células/poço. Em seguida, os nanocompostos P6 e TMP com e sem AgNP foram adicionadas aos poços da placa contendo as células e incubadas em estufa a 37 °C, com 5 % de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), após 24, 48 e 72 horas. Para tanto, foram retirados o meio de cultura com os nanocompostos e adicionados em cada poço 10 µL de solução de MTT (0,5 mg / mL) em DMEM sem SBF (1:10). A solução de MTT foi removida após 4 horas de incubação, os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL de álcool isopropílico.

A placa foi deixada em temperatura ambiente em uma câmara escura por 30 minutos em um agitador rotativo. A absorbância das placas foi avaliada a 550 nm usando uma leitora de microplacas (Eon Microplate Spectrophotometer; Bio Tek, Winooski, EUA). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.3 Análise Estatística

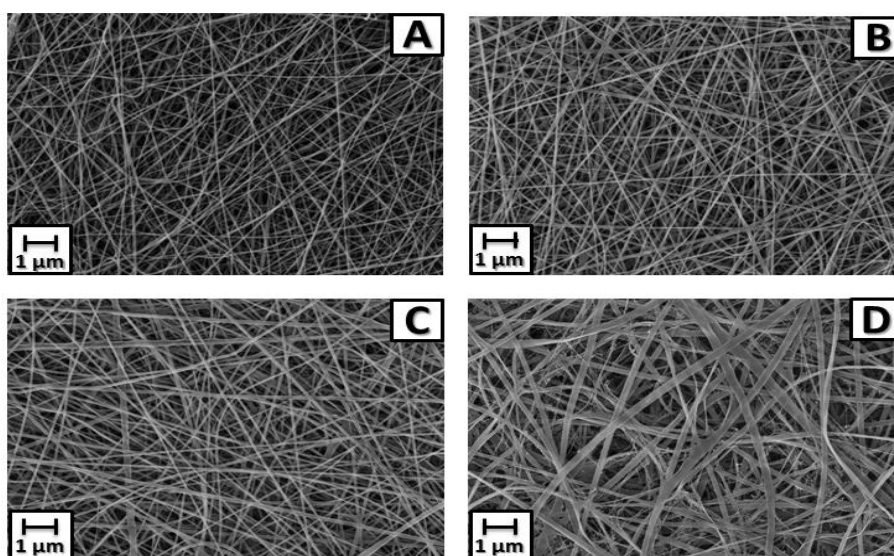
A análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) ($p < 0,05$). O experimento foi realizado em triplicata, em três momentos diferentes. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro - Wilk, seguido por ANOVA bidirecional a dois critérios, seguidos pelo teste de Student-Newman-Keuls (Software SigmaPlot 12.0, Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA). A análise foi realizada com um nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 Síntese e Caracterização das membranas P6-TMP

O processo de eletrofição das membranas produziu fibras homogêneas, sem porosidades ou defeitos na superfície (Figura 1). No entanto, uma análise detalhada da imagem de MEV do nanocompósito P6-TMP-10% mostrou a presença de fibras com largura muito pequena, conhecida como spider-net.

Figura 1 - Imagens de MEV das fibras de P6 e de seus nanocompostos. A: Fibra de P6. B: Nanocomposto P6-TMP-2,5%. C: Nanocomposto P6-TMP-5%. D: Nanocomposto P6-TMP-10%

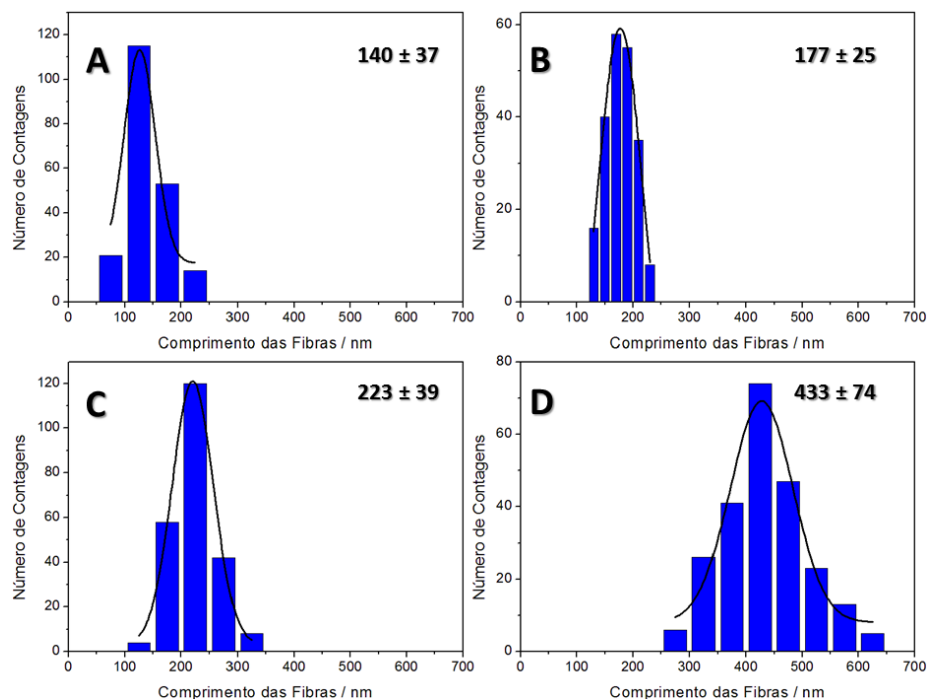


Fonte: Autor, 2023

O diâmetro das fibras (Figura 2) mostra que com a inserção de TMP o diâmetro médio das fibras tende a aumentar variando de 140 ± 37 nm à 433 ± 74 nm. Os elementos químicos sódio (Na) e fósforo (P) e prata (Ag) foram detectados pela análise do EDX (Figura 3).

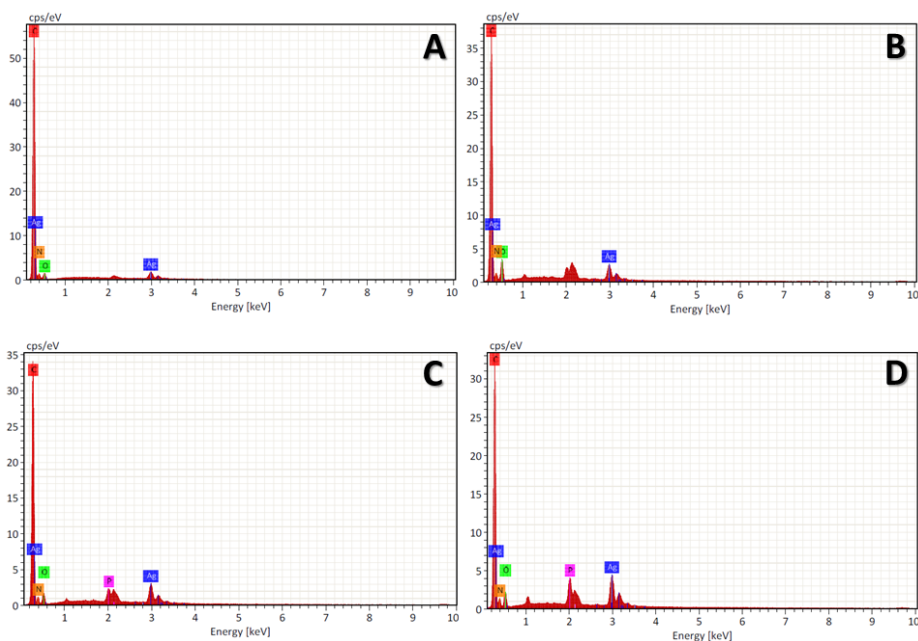
Figura 2 - Histogramas das fibras de P6 e de seus nanocompósitos. A: Fibra de P6. B: Nanocompósito P6-TMP-2,5%. C: Nanocompósito P6-TMP-5%.

D: Nanocompósito P6-TMP-10%



Fonte: Autor, 2023

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

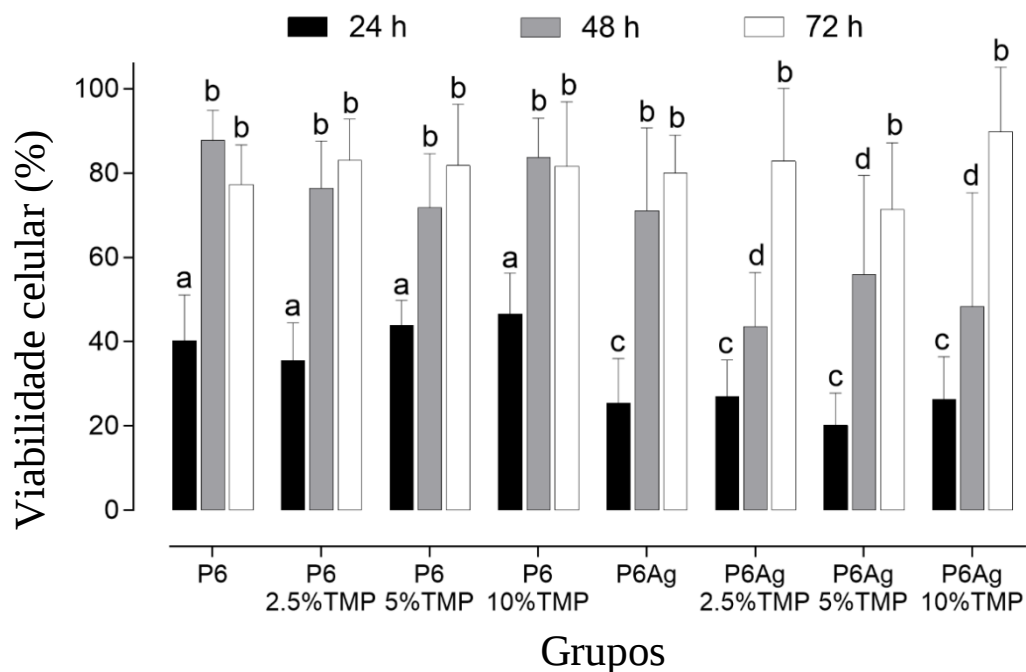


Fonte: Autor, 2023

3.2 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio MTT

Os grupos com P6-TMP apresentaram maior viabilidade quando comparado aos grupos com AgNP, independentemente do tempo ($p < 0,05$). Os grupos com AgNP, mostraram viabilidade celular reduzida para todas os grupos, com maior redução no tempo de 24 h, quando comparado a 48 e 72 horas ($p < 0,05$). Todos os grupos apresentaram um aumento da viabilidade no tempo de 72 horas, ($p < 0,05$). (Figura 4).

Figura 4 - Viabilidade dos fibroblastos NIH/3T3 determinada por um ensaio MTT de acordo com os grupos de P6-TMP com e sem Ag e o tempo de ensaio. Letras minúsculas distintas mostram diferença entre os grupos e tempo de ensaio ($p < 0,05$). Barras verticais indicam desvio-padrão



Fonte: Autor, 2023

4 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 (O'BRIEN, 2011; ZADPOOR, 2013). No campo da odontologia, o foco tem sido o combate à doença cárie (GU *et al.*, 2010). O presente estudo sintetizou membrana de P6 impregnadas com nanopartículas de TMP decoradas com AgNP, mostrando que os grupos com AgNP são citotóxicas para os fibroblastos e os grupos com nanopartículas de TMP apresentaram menor citotoxicidade se mostrando como um composto interessante para o desenvolvimento de novos biomateriais.

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 do TMP e a presença das AgNP, quando decoradas.

Os grupos com AgNP, mostraram viabilidade celular reduzida para todas os grupos, com maior redução no tempo de 24 h, quando comparado a 48 e 72 horas. Após 24 horas, houve um aumento da viabilidade celular. A diminuição na redução de MTT para formazan no tempo de 24 horas mostra a maior sensibilidade das células às AgNP. No entanto, no presente estudo, foi observado um aumento de células viáveis remanescentes em 48 e 72 h, sugerindo que a capacidade proliferativa foi preservada, no entanto, no tempo de 48 horas os grupos com AgNP ainda se mostraram com menor viabilidade celular do que os grupos com P6-TMP. Ainda assim, em 72 h, a viabilidade celular aumentou para todos os grupos, não havendo diferença estatística entre eles. Apesar de seus efeitos citotóxicos e genotóxicos produzidos pelo contato direto dos nanocompositos nas células, estes podem ser clinicamente atenuados ou neutralizados, que atua como barreira física dependendo de sua espessura ou mesmo a interação do AgNP com os componentes do meio pode interferir nos resultados. Dutra-Correa *et al.* (2018), demonstrou isso em seu estudo com AgNP associada a

adesivos que também houve um aumento da viabilidade celular no tempo de 72 horas, podendo ser causado pela barreira física do adesivo com as células testadas, levando a uma possível neutralização do efeito citotóxico das AgNPs.

Apesar dos resultados citotóxicos serem promissores mais estudos ainda se fazem necessários para melhor avaliar a ação remineralizadora e citotóxica desses nanocompostos como a utilização de testes mais precisos e amplos avaliando também outros componentes.

5 CONCLUSÃO

A síntese dos nanocompostos obtidos por eletrofição se mostraram estáveis com potencial aplicação para biomateriais odontológicos. Conclui-se que os grupos com AgNP são citotóxicos para os fibroblastos e os grupos com nanopartículas de TMP apresentaram menor citotoxicidade se mostrando como um composto interessante para o desenvolvimento de novos biomateriais.

REFERÊNCIAS

Abdal-Hay A, Hamdy AS, Khalil KA. Fabrication of durable high performance hybrid nanofiber scaffolds for bone tissue regeneration using a novel, simple in situ deposition approach of polyvinyl alcohol on electrospun nylon 6 nanofibers. *Materials Letters*. 2015;147:25-8.

Abdal-Hay A, Tijing LD, Lim JK. Characterization of the surface biocompatibility of an electrospun nylon 6/CaP nanofiber scaffold using osteoblasts. *Chemical Engineering Journal*. 2013;215-216:57-64.

Andre RS, Pavinatto A, Mercante LA, Paris EC, Mattoso LHC, Correa DS, Improving the electrochemical properties of polyamide 6/polyaniline electrospun nanofibers by surface modification with ZnO nanoparticles, *RSC Advances*. 2015;5:73875.

Cheng L, Li Y, Zuo Y, Li J, Wang H. Nano-hydroxyapatite/polyamide 6 scaffold as potential tissue engineered bone substitutes. *Materials Research Innovations*. 2013;12:192-9.

Danelon M, Takeshita EM, Sasaki KT, Delbem AC. In situ evaluation of a low fluoride concentration gel with sodium trimetaphosphate in enamel remineralization. *American Journal of Dentistry*. 2013;26:15-20.

Danelon M, Pessan JP, Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC. Effect of toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on dental caries: In situ study. *Journal of Dentistry*. 2015;43:806-13.

Delbem ACB, Bergamaschi M, Rodrigues E, Sasaki KT, Vieira AEM, Missel EMC. Anticaries effect of dentifrices with calcium citrate and sodium trimetaphosphate. *Journal of Applied Oral Science*. 2012;20:94-8.

Dutra-Correa M, Leite AABV, de Cara SPHM, Diniz IMA, Marques MM, Suffredini IB, Fernandes MS, Toma SH, Araki K, Medeiros IS. Antibacterial effects and cytotoxicity of an adhesive containing low concentration of silver nanoparticles. *Journal of Dentistry*. 2018;77:66-71.

Erem AD, Ozcan G, Skrifvars M, Cakmak M. In vitro assesment of antimicrobial activity and characteristics of polyamide 6/silver nanocomposite fibers. *Fibers and Polymers*. 2013;14:1415-21.

Fernandes GL, Fernandes RA, Amaral JG, Monteiro DR, Souza JAS, Delbem ACB, et al. Painei 1-Glicerofosfato de cálcio impregnado com nanopartículas de prata sintetizadas pela romã: potencial antimicrobiano e toxicidade celular. *Archives of Health Investigation*. 2017;5:4.

Gonzalez M. Effect of trimetaphosphate ions on the process of mineralization. *Journal of Dental Research*. 1971;50:1056-64.

Gouvea CCM, Amaral JG, Fernandes GL, Fernandes RA, Gorup LF, Camargo ER, et al. Avaliação da ação antimicrobiana do trimetafosfato de sódio associado ao fluoreto e nanopartículas de prata. *Brazilian Oral Research*. 2016;30:45.

Gu LS, Kim J, Kim YK, Liu Y, Dickens SH, Pashley DH, et al. A chemical phosphorylation-inspired design for type I collagen biomimetic remineralization. *Dental Matererials*. 2010;26:1077-89.

Lee Y, Oh SG. Ostwald ripening and control of Ag ion reduction degree by ammonium hydroxide in alcohol reduction process. *Journal of industrial and Engineering Chemistry*. 2015;21:768-71.

Manarelli MM, Delbem AC, Lima TM, Castilho FC, Pessan JP. In vitro remineralizing effect of fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate. *Caries Research*. 2014;48:299-305.

Manna CM, Nassar MY, Tofan D, Chakarawet K, Cummins CC. Facile synthesis of mononuclear early transition-metal complexes of kappa3cyclo-tetrametaphosphate ([P4O12]4-) and cyclo-trimetaphosphate ([P3O9]3. *Dalton Transactions*. 2014;43:1509-18.

Mendes-Gouvêa CC, Amaral JG, Fernandes RA, Fernandes GL, Gorup LF, Camargo ER, et al. Sodium trimetaphosphate and hexametaphosphate impregnated with silver nanoparticles: characteristics and antimicrobial

efficacy. *Biofouling*. 2018;34:299-308.

Mi HY, Palumbo S, Jing X, Turng LS, Li WJ, Peng XF. Thermoplastic polyurethane/hydroxyapatite electrospun scaffolds for bone tissue engineering: effects of polymer properties and particle size. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. 2014;102:1434-44.

O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials. Today*. 2011;14:88-95.

Pant HR, Risal P, Park CH, Tijing LD, Jeong YJ, Kim CS. Core-shell structured electrospun biomimetic composite nanofibers of calcium lactate/nylon-6 for tissue engineering. *Chemical Engineering Journal*. 2013a;221:90-8.

Pant HR, Risal P, Park CH, Tijing LD, Jeong YJ, Kim CS. Synthesis, characterization, and mineralization of polyamide-6/calcium lactate composite nanofibers for bone tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013b;102:152-7.

Pant HR, KIM CS. Biomimetic synthesis of hollow calcium phosphate nanospheres on core-shell structured electrospun calcium lactate/nylon-6 nanofibers. *Materials Letters*. 2013;92:90-3.

Sauvesuk L, Fernandes GL, Fernandes RA, Amaral JG, Souza JAS, Monteiro DR, et al. Potencial antimicrobiano de glicerofosfato de cálcio associado à nanopartículas de prata. *Brazilian Oral Research*. 2016;30:316.

Shen J, Li Y, Zuo Y, Zou Q, Cheng L, Zhang L, et al. Characterization and cytocompatibility of biphasic calcium phosphate/polyamide 6 scaffolds for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*. 2010;95B:330-8.

Shen J, Li Y, Zuo Y, Zou Q, Zhang L, Liu H. Surface modification of polyamide 6 immobilized with collagen: characterization and cytocompatibility. *International Journal of Polymeric Materials*. 2011;60:907-21.

Souza JAS, Barbosa DB, Silva AABE, Fernandes GL, Gorup LF, Amaral JG, et al. Silver nanoparticles obtained by green synthesis associated to the calcium glycerophosphate: characterization and antimicrobial efficacy. *Microbial Works of Art*. 2016;16:136.

Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Sasaki KT, Delbem AC. Effectiveness of a toothpaste with low fluoride content combined with trimetaphosphate on dental biofilm and enamel demineralization in situ. *Caries Research*. 2015;49:394-400.

Venkatesan J, Kim SK. Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering: a review. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2014;10:3124-40.

Wintgens V, Dalmas F, Sébille B, Amiel C. Novel phosphorus-containing cyclodextrin polymers and their affinity for calcium cations and hydroxyapatite. *Carbohydrate Polymers*. 2013;98:896-904.

Zadpoor AA. The evolution of biomaterials research. *Materials Today*. 2013;16:408-9.