



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas Y de la Salud  
Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León  
Ciencias odontológicas: Biomateriales dentales

**Resinas acrílicas con nanopartículas metálicas en la reducción de la adhesión de  
*Candida albicans* para bases de dentaduras**

TESIS

Que para optar por el grado de Maestra en Ciencias

PRESENTA

**BERENICE ALEJANDRA CAMACHO FLORES**

Director de Tesis

**Dra. Laura Susana Acosta Torres**

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas Y de la Salud

León Gto. 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## Contenido

<i>Agradecimientos</i>	.....	5
<i>Dedicatoria</i>	.....	6
Índice general		
Índice de figuras	.....	7
Índice de tablas	.....	9
Abreviaturas y símbolos	.....	10
Resumen	.....	11
Capítulo I		
Introducción	.....	13
1 Marco teórico	.....	15
1.1 Poli metil metacrilato (PMMA)		
1.1.1 Prótesis totales y estomatitis subprotésica		
1.2 Ecología micótica de la cavidad oral		
1.2.1 <i>Candida albicans</i>		
1.3 Nanopartículas metálicas		
1.3.1 Nanopartículas de plata		
1.3.2 Nanopartículas de dióxido de titanio		
14 Aplicación de nanopartículas metálicas en odontología		
2 Antecedentes	.....	33
Capítulo II		
3 Planteamiento del problema	.....	36
4 Justificación	.....	37
5 Hipótesis	.....	38
6 Pregunta de investigación	.....	39
7 Objetivo general	.....	39



---

7.1	Objetivos específicos	40
Capítulo III		
8	Metodología	43
8.1	Diseño de la investigación	
8.2	Material y Método	
Capítulo IV		
9	Resultados	47
10	Discusión	58
11	Conclusiones	61
12	Agradecimientos	62
	Bibliografía	63
	Anexos	69



## ***Agradecimientos***

### ***A los proyectos:***

Dirección General de Asuntos del Personal Académico (**DGAPA-UNAM**) Programa de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica **PAPIIT TA200414 y PAPIIT IN225516** y Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza **PAPIME PE202214 y PAPIME PE210616** por el financiamiento otorgado al presente proyecto.

A la Dra. Genoveva Hernández Padrón del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Campus Juriquilla de la UNAM; por su apoyo en la realización del análisis de espectroscopía.

A la Mtra. Lourdes Palma Tirado del Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla de la UNAM; por el análisis con microscopía e de transmisión electrónica.

A la Dra. Marina Vega González del Centro de Geociencia; Campus Juriquilla de la UNAM por su apoyo en el manejo de

A la Dra. Rosa Elvira Núñez Anita del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Campus Juriquilla de la UNAM; por su apoyo en los análisis biológicos.

A la Dra. Ma. Concepción Arenas Arrocena de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, UNAM, por el apoyo en la síntesis de nanopartículas de Dióxido de Titanio.

Al Dr. Omar Martínez Álvarez de la Universidad Politécnica de Guanajuato, por su apoyo y colaboración en el análisis y manejo de muestras en Microscopía de Fuerza Atómica.

Al Dr. René García Contreras de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, UNAM, por el conocimiento aportado en los análisis de adhesión a superficie.



---

## **Dedicatorias**

### **A Dios.**

*Por la vida, la salud y la fortaleza de seguir adelante.*

### **A mi amado esposo.**

*Por su apoyo incondicional y por haber creído en mí más que nadie, por su amor, paciencia y compromiso; por ser el contrafuerte de mis sueños y metas; por ponerme sus alas para llegar más alto. Por todo el ímpetu de su amor.*

### **A mi familia.**

*A mis padres ausentes y mis hermanos por todo lo aprendido, porque su valor fue mi fuerza. A Raúl Alejandro por su paciente espera. A la madre de mi esposo quien me apoyo y me acogió como a una hija.*

### **A la Universidad Nacional Autónoma de México.**

*Por abrirle las puertas y apostar a mi interés científico; por brindarme la oportunidad de obtener un grado académico más.*

### **A la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León.**

*Por brindarme el espacio para realizar todas las actividades y acogerme durante este periodo.*

### **A mi tutora Dra. Laura Susana Acosta Torres.**

*Por su voto de confianza, por dejarme formar parte de su proyecto y por todo el interés mostrado en mi desarrollo profesional.*

### **A los profesores docentes.**

*Que con paciencia compartieron su conocimiento científico y experiencia.*

### **A la comunidad científica.**

*Perteneciente a otras instituciones en México y en el extranjero por su aportación al desarrollo de mi formación académica.*

### **A los compañeros**

*Ahora amigos, por brindarme su apoyo y compartir esta experiencia.*

### **A la Dra. E. Luminosa.**

*Por mostrarme el camino y ser una fuente de inspiración.*



*Indudablemente a mi maravilloso esposo  
Vicente René Anzures Castillo, cada palabra  
escrita aquí, no sería posible sin él.*



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Fórmula química estructural del poli (metil metacrilato), PMMA. ....	16
<b>Figura 2.</b> Prótesis total, Pierre Fauchard. ....	17
<b>Figura 3.</b> Estomatitis por infección por especie <i>Candida</i> . ....	20
<b>Figura 4.</b> Etapas de la infección oral por <i>C. albicans</i> . Progresión de infección de células epiteliales orales se caracteriza por tres etapas distintas: Adhesión, invasión y daño. ....	24
<b>Figura 5.</b> Estructura del fureleno. ....	26
<b>Figura 6.</b> Mecanismos de acción de nanopartículas metálicas.....	27
<b>Figura 7.</b> Estructura cristalina de la plata. Cúbica centrada en las caras. ....	28
<b>Figura 8.</b> Estructuras cristalinas de las fases de TiO <sub>2</sub> rutilo y anatasa. ....	30
<b>Figura 9.</b> Espectro de absorción Uv-Vis, AgNPs (izquierda), $\lambda=433\text{nm}$ y TiO <sub>2</sub> NPs (derecha), $\lambda=261\text{nm}$ , se muestran picos característicos de los metales nano estructurados obtenidos. ....	47
<b>Figura 10.</b> Imágenes TEM, AgNPs; a) 200 nm, b)100 nm, c) 50 nm, morfología semiesférica de las nanopartículas de plata en medio de dispersión trietilén-glicol y monoeter. ....	48
<b>Figura 11.</b> Imágenes TEM TiO <sub>2</sub> NPs; a) 200 nm, b) 100 nm, c) 50 nm, se distingue la morfología irregular formando aglomerados de las nanopartículas de dióxido de titanio en medio de dispersión alcohol isopropílico. ....	48
<b>Figura 12.</b> Micrografías obtenidas por HRTEM de la fase cristalina: a) Ag y b) TiO <sub>2</sub> anatasa. Se observan las distancias entre planos cristalográficos y patrón de difracción de su estructura cristalina mediante transformada de Fourier. ....	49
<b>Figura 13.</b> Muestras aisladas de pacientes con resultado positivo a <i>C. albicans</i> . ....	50
<b>Figura 14.</b> Zona de inhibición en cultivos de <i>C. albicans</i> a) AgNPs, b) TiO <sub>2</sub> NPs c) Anfotericina B (control positivo) d) 1 agua destilada, 2 trietilén-glicol (control negativo). ....	50
<b>Figura 15.</b> (%) Porcentaje de viabilidad celular de AgNPs y TiO <sub>2</sub> NPs en diferentes concentraciones (MTT, células NIH-3T3 a 24 h). ....	51





---

**Figura 16.** Análisis FT-IR, PMMA muestra bandas a 1772, 1239, 1189, 1022  $\text{cm}^{-1}$ , control de PMMA en rojo, PMMA experimental en azul. ....52

**Figura 17.** Imagen de microscopía óptica 40X, se observa morfología esférica de PMMA. ....52

**Figura 18.** Imágenes AFM (Fase arriba, altura abajo) de superficie de PMMA a) control, b) AgNPs, c)  $\text{TiO}_2$  se muestra *Ra* de los 3 grupos. ....53

**Figura 19.** Imágenes de altura mediante AFM, se muestra valor *Ra* y *Z* de las superficies de placas de sílice con a) Ag y b)  $\text{TiO}_2$ NPs. ....53

**Figura 20.** Adhesión de *C. albicans* a) 24 h, muestra menor adhesión con la presencia de AgNPs comparado con  $\text{TiO}_2$  y con el control, b) 48 h, se puede ver que el grupo Ag sigue presentando menor adhesión que  $\text{TiO}_2$ NPs aunque los valores se han aproximado. ....54



## Índice de tablas y gráficas

<b>Tabla 1.</b> Características mecánicas del PMMA. ....	16
<b>Tabla 2.</b> Promedio de rugosidad umbral (Ra) de PMMA. ....	18
<b>Tabla 3.</b> Frecuencia de candidosis oral e infección en prótesis dental. ....	22
<b>Tabla 4.</b> Análisis de la rugosidad promedio de superficie de PMMA con antifúngicos nistatina y fluconazol que muestran mayor modificación de la superficie comparado con los grupo control. ....	35
<b>Tabla 5 .</b> Concentración de los patrones multielementales (10%) de Ag y Ti, utilizados como referencia para el análisis del contenido de material inorgánico en medio si mulante de saliva para el análisis mediante ICP-MS.	
<b>Grafica 1.</b> Análisis mediante ICP-MS de saliva artificial que permaneció en diferentes tiempos de exposición discos con recubrimiento de Ag y TiO <sub>2</sub> NPs. Se observa que existe liberación estadísticamente no significativa. ....	56



## Abreviaciones y símbolos

- AFM.- Atomic Force Microscopy/ Microscopía de Fuerza Atómica
- Ag.- Plata
- D.O.- Densidad Óptica
- DMSO.- Dimethyl Sulfoxide / Dimetil Sulfóxido
- h.- Horas
- ICP-MS- inductively coupled plasma mass spectrometry
- IUPAC.- Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
- MPa.- Mega Pascales
- MTT.- 3-2,5-diphenyltetrazolium bromide
- nm.- Nanómetros
- NPs.- Nanopartículas
- PBS.- Tampón Fosfato Salino
- PMMA.- Polimetil metacrilato
- Ra.- Rugosidad umbral
- rpm.- Revoluciones por minuto
- rps.- Revoluciones por segundo
- s.- Segundos
- TEM.- Transmission Electronic Microscopy / Microscopía Electrónica de Transmisión
- TiO<sub>2</sub>.- Dióxido de titanio
- UV-Vis.- Ultra Violet Visible Light, / Luz Ultra Violeta Visible
- $\lambda$ .- Longitud de onda
- $\mu$ .- Micras / Micrones
- $\mu$ L.- Microlitros
- $\mu$ m.- Micrómetros



## Resumen

**Introducción:** Poli (metil metacrilato); (PMMA) se aplica generalmente en la elaboración de bases de dentadura, pero la rugosidad de su superficie es un medio de proliferación ideal para las especies *Candida* y así desarrollar patologías importantes en cavidad oral. El tratamiento superficial de recubrimiento con nanopartículas podría ser un proceso eficaz para evitar infecciones.

**Objetivo:** El propósito del presente estudio fue realizar el recubrimiento superficial de PMMA experimental con nanopartículas (NPs) de plata (Ag) y dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) para disminuir la adhesión de *C. albicans*.

**Metodología:** El tamaño de partícula y morfología de las nanopartículas de Ag y de TiO<sub>2</sub> se evaluaron por microscopía electrónica de transmisión. Los efectos de inhibición de ambos nanopartículas se evaluaron en *C. albicans* mediante prueba de difusión en agar. El efecto de citotoxicidad se llevó a cabo mediante el ensayo de MTT. PMMA fue sintetizado para obtener muestras experimentales, discos de PMMA se recubrieron (V1: 1500 rpm, T1: 15 s; V2: 1200 rpm, T2: 15 s) con cada tipo de nanopartículas. El recubrimiento se evaluó mediante promedio de la rugosidad de superficie y se analizó mediante Microscopía de Fuerza Atómica; el análisis de adhesión de *C. albicans* a la superficie de PMMA se realizó mediante ensayo colorimétrico.

**Resultados:** AgNPs morfología semiesférica con tamaño de partícula promedio de  $41.55 \pm 1.4$  nm y TiO<sub>2</sub>-NPs con morfología irregular de tamaño aproximado 8 nm; la actividad de inhibición obtenido fue AgNPs  $13.70 \pm 0.62$  mm y TiO<sub>2</sub>NPs  $14.85 \pm 0.37$  mm. La viabilidad de las células a diferentes concentraciones evaluadas no muestra citotoxicidad. Discos de PMMA se obtuvieron y se recubrieron con 40  $\mu$ L de cada tipo de nanopartículas. Los valores medios de rugosidad de superficie se AgNPs = 0.137 micras, TiO<sub>2</sub>-NPs = 0.151 micras y grupo de control (no recubierto) = 0.294 micras: Disminución de la demostración de la misma para ambas muestras tratadas con nanopartículas. La prueba de adherencia de *C. albicans* muestra diferencias estadísticas entre los grupos, D.O. a las 24 horas estaban grupo control 0.12, 0.08 y AgNPs TiO<sub>2</sub>NPs 0.09; a las 48 h los valores fueron de 0.15 grupo control, AgNPs 0.09, 0.10 TiO<sub>2</sub>NPs. Se aplicó análisis estadístico ANOVA de Una Vía a los resultados.

**Conclusiones:** La capa obtenida muestra disminución *C. albicans* adhesión y se consideró satisfactoria.



## Abstract

**Introduction:** Poly (methyl methacrylate); (PMMA) is usually applied in the preparation of denture bases, but the surface roughness is an ideal medium for *Candida* species proliferation and develops important pathologies in oral cavity. The surface treatment coating nanoparticles could be an effective process to avoid infections.

**Objective:** The purpose of this study was to conduct the experimental PMMA surface coating with silver nanoparticles (Ag) and titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) to reduce the adhesion of *C. albicans*.

**Methodology:** The particle size and morphology of Ag nanoparticles and TiO<sub>2</sub> were evaluated by transmission electron microscopy. The inhibitory effects of both nanoparticles were evaluated in *C. albicans* by agar diffusion test. The effect of cytotoxicity was performed using the MTT assay. PMMA was synthesized for experimental samples, were coated PMMA discs (V1: 1500 rpm, T1: 15 s; V2: 1200 rpm, T2: 15 s) with each type of nanoparticles. The coating was evaluated by the average surface roughness and analyzed by Atomic Force Microscopy; analysis of *C. albicans* adhesion to PMMA surface was performed by colorimetric assay.

**Results:** AgNPs hemispherical morphology with average particle size of  $41.55 \pm 1.4$  nm and TiO<sub>2</sub>NPs with irregular morphology approximate size 8 nm; inhibition activity AgNPs obtained was  $13.70 \text{ mm} \pm 0.62$  and  $14.85 \pm 0.37$  mm TiO<sub>2</sub>NPs. The viability of cells at different tested concentrations did not exhibit cytotoxicity. PMMA discs were obtained and coated with 40  $\mu\text{L}$  of each type of nanoparticles. The AgNPs is = 0.137 microns, TiO<sub>2</sub>NPs = 0.151 microns and control group mean values of surface roughness (uncoated) = 0.294 microns: showing decrease of the same for both samples treated with nanoparticles. The adhesion test of *C. albicans* shows statistical differences between groups, OD 24 hours monitoring were 0.12, 0.08 and 0.09 AGNPS TiO<sub>2</sub>NPs group; at 48 h values were 0.15 control group, AgNPs 0.09, 0.10 TiO<sub>2</sub>NPs. Statistical analysis One-Way ANOVA was performed on the results.

**Conclusions:** The obtained layer shows decreased *C. albicans* adhesion and was considered a success.



---

## Capítulo I

### INTRODUCCIÓN

La gran diversidad de materiales odontológicos ha sido objeto de estudio desde tiempos antiguos, desde los más simples como la madera, hasta otros más complejos como piedras preciosas y metales empleados en la odontología antigua. Actualmente la búsqueda de nuevos materiales dentales continúa, sin embargo existe un nuevo interés por revelar propiedades de materiales ya conocidos inherentes al tamaño y forma, es decir, existe un enfoque en el análisis y diseño de microestructuras para el control de sus propiedades en un nivel igual o inferior al atómico, por lo que en diversas partes del mundo se realizan estudios a los materiales en diferentes escalas; incluso los análisis se vuelven mayormente específicos cuando tienen potencial para ser utilizados en un sistema biológico.<sup>1,2</sup>

En los últimos años las nanopartículas de una gran variedad de materiales han sido obtenidas y caracterizadas entre ellas las de los metales que han cautivado la atención de la comunidad científica debido a los efectos atribuidos a la interacción con complejos vivos. Una particularidad de estas estructuras es su tamaño inferior a los 100 nm asociado directamente con las interacciones a nivel celular, entre las que se pueden destacar la liberación de iones de superficie que se encuentran relacionados con la replicación de material genético en algunas especies de hongos y bacterias particularmente las causantes de patologías en humanos,<sup>3</sup> lo que sugiere que las nanopartículas metálicas sean consideradas como una alternativa para suplantar, ayudar o combinar la cinética de los fármacos contra una posible infección y contrarrestar el efecto de "resistencia" que a menudo presentan algunos microorganismos después del uso constante de medicamentos.

El dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) y plata (Ag) entre otros han presentado actividad antimicrobiana ya sea en forma aislada o en combinación con otros materiales tales como polímeros e hidrogeles. Algunos microorganismos que se han estudiado con la exposición a nanopartículas metálicas para obtener información sobre sus mecanismos de acción son *Staphylococcus aureus*,<sup>4</sup> *Pseudomonas aeruginosa*,<sup>5</sup> *Escherichia coli*<sup>6</sup> y *Candida albicans*, *glabrata*, *krusei*, entre otros,<sup>7</sup> algunos de estos con relevancia en patologías de cavidad oral.



Algunos de ellos forman parte de manera convencional de la microbiota oral, sin embargo, cuando existe un crecimiento descontrolado del tamaño de población microbiana pueden ser responsables de enfermedades importantes; tal es el caso de las infecciones por especies *C. albicans* asociadas directamente con estomatitis subprotésica.

Los pacientes con prótesis totales suelen ser adultos mayores que en muchos casos tienen deterioros importantes de las condiciones sistémicas.<sup>8</sup> algunas nanopartículas metálicas han sido incorporadas en la matriz polimérica para disminuir la actividad biológica de los microorganismos patógenos de la cavidad oral,<sup>9, 10</sup> sin embargo, sólo la superficie de la base de la prótesis están en estrecho contacto con el epitelio oral por esta razón La hipótesis central de este estudio se basó en el recubrimiento superficial de polimetil-metacrilato (PMMA) con nanopartículas de plata (Ag) y dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) para disminuir la adherencia de *C. albicans* mediante la reducción de la rugosidad superficial y la contribución de las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas.

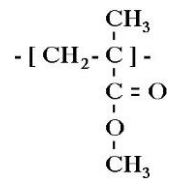
Desde el punto de vista de un científico de materiales, es un deseo de desarrollar superficies de base para dentaduras postizas que proporcionen condiciones desfavorables para la adhesión y proliferación de *C. albicans*.



# 1 Marco Teórico

## 1.1 Polimetil-metacrilato PMMA

Es un polímero vinílico, pertenece a la familia de polímeros llamados acrilatos; formado por polimerización vinílica de radicales libre a partir del monómero metil-metacrilato, Su denominación de la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada): Poly(methyl 2-methylpropenoate) cuya fórmula química es  $(C_5O_2H_8)_n$ :



**Figura 1.** Fórmula química estructural de poli (metil metacrilato); PMMA.

Las propiedades que lo definen han sido la principal característica para el uso de este material en múltiples áreas; entre sus particularidades se destaca su adecuada resistencia mecánica (Tabla 1), su adecuada translucidez de casi el 93% de transparencia y su buena estabilidad dimensional.

**Tabla 1.** Características mecánicas del PMMA.

Resistencia a la Tracción	Módulo de Elasticidad	Resistencia a la Flexión
72 MPa	3000 MPa	116 MPa

*MPa, Mega Pascales; PMMA, Poli (metil metacrilato).*

Además presenta otras propiedades menos comunes como su resistencia a exposición de rayos Uv, y buena respuesta como aislante térmico; es un material higroscópico con una baja densidad de unos  $1190 \text{ kg/m}^3$  ligeramente mayor a la del agua con alto punto de fusión a  $160^\circ\text{C}$  y de ebullición a  $200^\circ\text{C}$ .





El PMMA tiene la peculiaridad de presentar una respuesta inflamatoria mínima y baja toxicidad por lo cual puede permanecer en contacto con un tejidos vivos por periodos más largos comparados con otros por lo que sigue siendo el material actual con el que se elaboran prótesis. Dentro de sus múltiples aplicaciones podemos encontrar su estudio para el suministro de fármacos y en diversas ocasiones ha sido utilizado como matriz para incrustar otros materiales. PMMA se ha utilizado para elaboración de cementos óseos; lentes de contacto e intraoculares; diseño de tornillos de fijación en el hueso, como relleno de cavidades óseas y defectos en cráneo; y la estabilización de vértebras en pacientes con osteoporosis.<sup>11</sup>

El primer uso de PMMA en odontología fue para la fabricación de bases de dentaduras totales como un “dispositivo intraoral”. Desde su primera aparición en 1937 por el Dr. Walter Wrigth y hasta la actualidad el PMMA es utilizado frecuentemente en los tratamientos odontológicos, desde la elaboración de prótesis temporales, parciales y totales hasta en la elaboración de aparatología infantil, resinas y adhesivos; debido principalmente a su facilidad de procesamiento, en forma precisa, la estabilidad en el medio oral y estética superior a la de otros materiales, de tal manera que se ha incorporado en múltiples áreas médicas.<sup>12</sup>

En el diseño de una base de dentadura se utiliza PMMA en un sistema líquido-polvo. Cuando ambas sustancias entran en contacto se produce una reacción química casi inmediata. El proceso consta de 3 fases críticas; inicialmente pequeñas partículas de polvo de PMMA se encuentran en un estado pre-polimerizado, posteriormente forman una matriz polimérica reticulada y por último se comienza a formar una capa entre los gránulos de PMMA y la matriz llamada capa semi -IPN.<sup>13</sup> Inicialmente la polimerización no se logra por completo para ello el monómero debe estar completamente difundido entre las partículas de PMMA para lograr la polimerización profunda y como resultado obtenerse las propiedades adecuadas<sup>14</sup> Es muy común encontrar que se incorpora el uso de energía tanto térmica como de microondas para lograr la polimerización del PMMA este tipo de técnicas fue reportado primero por Nishi, en 1968.

La correcta polimerización del PMMA es crucial para que se obtengan las características ideales del material; principalmente las de superficie, si bien este material posee alta resistencia a la fractura también son susceptibles a la penetración por objetos duros y ácidos que pueden comprometer las condiciones ideales. Estos fenómenos contribuyen a un aumento de la



rugosidad de la superficie y el desgaste del acrílico, dando lugar a un ambiente favorable para la formación de biopelículas.

En 1997 un estudio clínico estableció que la rugosidad umbral ( $R_a$ ) para la retención de placa de materiales intraorales fue de  $02 \mu$ .<sup>15</sup>  $R_a$  es la medida de la altura media aritmética, que se utiliza con frecuencia como un parámetro de rugosidad universal.<sup>16</sup> Las micro grietas creadas por la degradación de la superficie sirven como refugio y un depósito para los microorganismos.<sup>17</sup> La colonización de una superficie rugosa por microorganismos es también un hecho bien documentado,<sup>18</sup> la modificación de la superficie de PMMA está relacionada directamente a la abrasión por el cepillado entre otros factores.

**Tabla 2.** Promedio de rugosidad umbral ( $R_a$ ) de PMMA.

**PMMA Promedio de  $R_a$** <sup>19</sup>

Antes del cepillado	4.45 $\mu\text{m}$ ( $\pm$ 0.92)
Posterior al cepillado	6.73 $\mu\text{m}$ ( $\pm$ 1.73)

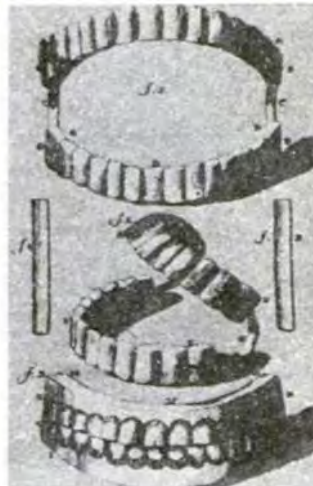
*$R_a$ , Rugosidad aritmética de superficie; PMMA, Polimetil-metacrilato.*

Las modificaciones de la estructura de los polímeros de las resinas para base de dentadura se han experimentado mediante la adición de diversos materiales (partículas de metal, de fibra, o de relleno) o la modificación química de PMMA para mejorar las propiedades mecánicas de la resina base de la prótesis. La Norma No. 12 de ADA menciona las pruebas físicas para las resinas acrílicas para bases de dentaduras.<sup>20</sup>



### 1.1.2 Prótesis totales y estomatitis subprotésica

Desde la creación de la primera dentadura completa por Pierre Fauchard en 1728 hasta la actualidad se han considerado diferentes materiales para su elaboración. Entre el siglo XVIII y el siglo XIX las prótesis totales se realizaban en materiales más complejos como el marfil, algunos metales y la porcelana, sin embargo los avances científicos que se generaron en el siglo XX para los materiales dentales dieron como resultado la introducción del PMMA como material para la elaboración de las prótesis totales.



**Figura 2.** Prótesis total, Pierre Fauchard, 1728 (Osawa Deguchi, 1995 *Prostodoncia Total*, UNAM, pp. 29).

Para Boucher (Zarb G, 1994) las prótesis totales y sus tejidos de soporte van a tener que coexistir por un tiempo razonablemente prolongado. Las bases de las dentaduras totales interactúan directamente con la membrana mucosa, que sirve como una especie de cojín entre las bases y el hueso de soporte. Las dentaduras completas son mantenidas en posición por medio de coordinación muscular y las fuerzas físicas de adhesión, cohesión y tensión superficial interfacial; las cuales, a su vez, dependen de la adaptación de la dentadura a las estructuras de soporte y circundantes de la cavidad bucal edéntula.<sup>21</sup>

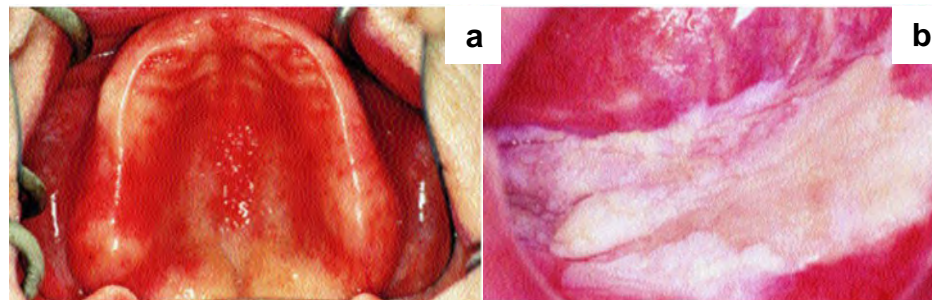
Actualmente cerca del 95% de las prótesis totales dentales que se elaboran son a base de resina acrílica (PMMA) termopolimerizable.<sup>22</sup> El uso de PMMA para la elaboración de bases de dentaduras tiene ciertas limitantes, una de ellas es la presencia de pequeños poros en su



superficie, así como la susceptibilidad a la absorción de agua, debido a que representa un cierto riesgo de contaminación microbiana en la cavidad oral, especialmente producida por hongos. La formación biopelículas fúngicas entre la mucosa de cavidad oral y la superficie de las prótesis pueden contribuir a la aparición de estomatitis subprotésica.<sup>23</sup>

### ***Estomatitis subprotésica***

La estomatitis subprotésica corresponde a un proceso patológico que aparece en sujetos portadores de prótesis removibles. (figura 3) El origen se debe a la influencia de múltiples factores: traumatismos continuos ejercidos por la prótesis (tanto en el periodo de adaptación como en la fase de desadaptación), infecciones por diferentes microorganismos, alergia a los materiales de la prótesis, diabetes mellitus, falta de higiene, etc.



**Figura 3.** Estomatitis por infección por especie *Candida*, se muestran inflamaciones y zonas enrojecidas (a) y zonas de tipo blanquecinas (b) en paladar y piso de la boca respectivamente (Webb, Thomas, & Willcox, 1998 pp.161).

La etiología de la estomatitis subprotésica puede tener más de un factor de origen; la levadura *Candida albicans* se ha identificado como el agente principal causante.<sup>2526</sup> Es el hongo más frecuente en la cavidad oral y se adhiere a tejidos orales y superficies de PMMA con el que se elaboran las prótesis totales, debido a que los pacientes de edad avanzada con frecuencia presentan una inadecuada higiene oral donde los microorganismos encuentran un entorno adecuado para su proliferación.<sup>27</sup> La mala higiene es un factor etiológico importante en la patogénesis de la enfermedad.<sup>28</sup> En algunos países más del 22% de los habitantes mayores de 65 años de edad usan prótesis dentales totales y entre 11% y 70% sufren de estomatitis subprotésica.<sup>23</sup>



La candidosis está asociada como el segundo factor etimológico de estomatitis subprotésica. Para Holmstrup y Axell la candidosis oral se clasifica en:

- a) Formas agudas: Pseudomembranosa, eritematosa.
- b) Formas crónicas: Pseudomembranosa, eritematosa, hiperplásica y nodular.
- c) Lesiones asociadas a *Candida*: queilitis angular, estomatitis protésica y glositis romboidal media.<sup>29</sup>

La estomatitis subprotésica incluye todas las manifestaciones clínicas derivadas del uso de la prótesis, en la que se puede incluir la candidosis oral asociada. Se caracteriza por enrojecimiento persistente y edema en el área de soporte de la prótesis e incluye la clasificación de Newton:

1. Eritematosa puntiforme
2. Eritematosa uniforme
3. Hiperplásica<sup>30</sup>

La mayoría de los portadores de prótesis son de edad avanzada lo que puede llevar a una reducción de su estado general de salud por tanto tienen un mayor riesgo del desarrollo de estomatitis subprotésica. La condición nutricional es otro factor importante para que se establezca una infección por especies *Candida*, la malnutrición, como dietas altas en carbohidratos, deficiencia de hierro, ácido fólico o vitamina B12, se considera de alto riesgo, así como las terapias médicas que generan inmunosupresión sistémica como quimioterapia, radioterapia o el uso de cortico-esteroides, que pueden agravar la condición.<sup>23</sup>

El hipotiroidismo, enfermedad de Addison que provoca insuficiencia adrenocortical, diabetes mellitus, leucemia aguda, agranulocitosis, infección por VIH, aplasia tímica y xerostomía natural o causada por tratamiento farmacológico, uso y terapia de drogas y el síndrome de *Sjogren* (un grupo de síntomas que incluyen la ampliación de la glándula parótida) son factores menos comunes pero que participan directamente en candidosis oral.<sup>31, 32</sup> Diversos estudios muestran que una de las asociaciones más importantes de infecciones de *Candida albicans* y estomatitis subprotésica encuentra su origen en el material con el que se elaboran las prótesis, se ha sugerido que las características físicas del PMMA como la energía libre de la superficie total, así como el grado de hidrofiliidad contribuyen a la adhesión y la proliferación de *C. albicans*



(Tabla 3) debido a que las hifas presentan preferencia para adherirse a sustratos hidrófobos en lugar de hidrófilos; las propiedades de la superficie puede desencadenar una respuesta genética que activa el cambio morfológico entre blastospora e hifa, esta transformación morfológica coincide con un aumento de patogenicidad y virulencia los pacientes con estomatitis protésica asociada a *C. albicans* tienen niveles más altos de hifas en saliva y paladar que los pacientes sanos.<sup>33</sup>

**Tabla 3.** Asociación mediante frecuencia de candidosis oral e infección en prótesis dentales <sup>34</sup>

Frecuencia de candidiasis oral e infección en prótesis dentales					
	No. de pacientes	%	Aislamiento	No.	%
Pacientes incluidos	100	-	-	-	-
Candidosis oral	20	20	<i>C. albicans</i>	18	90
			<i>C. tropicalis</i>	2	10
Pacientes con candidosis oral y prótesis infectadas	11	55	<i>C. albicans</i>	11	100
Prótesis infectadas	43	43	<i>C. albicans</i>	42	97.6
			<i>C. tropicalis</i>	1	2.4

En la tabla anterior podemos observar como hay una mayor identificación de *C. albicans* en pacientes diagnosticados con candidosis oral, en portadores de prótesis en la superficie de la prótesis.

La prótesis dental puede ser un factor predisponente para desarrollar candidosis oral, sobre todo cuando se encuentra desajustada, prevalencia de mala higiene o simplemente por actuar como reservorio de microorganismos y permanecer en contacto directo con la mucosa; otro factor importante suelen ser aquellas circunstancias que alteran la integridad del epitelio oral mediante traumatismos, maceración y excesivas fuerzas de oclusión que favorecen la adhesión de hongos y propician la invasión de mucosas. La especie *Candida* tiene la capacidad de expresar un receptor CR2 que se adhiere al fibrinógeno, láminas y superficies plásticas, colonizando el material acrílico y la resina.<sup>34</sup>



Como ya se ha mencionado el factor de hidrofiliidad del PMMA contribuye en gran medida a la formación del biofilm oral y es una de las propiedades que se ha buscado contrarrestar mediante la aplicación de diversos materiales tanto para la modificación de la superficie como su incorporación a la matriz polimérica; uno de los más estudiados en los últimos años son las nanopartículas de metales como oro, plata, cobre y titanio entre otros como principal.<sup>7</sup>

## **1.2 Ecología nicótica de la cavidad oral**

### **1.2.1 *Candida albicans***

Se ha considerado que el total de especies eucariotas en la Tierra es cercano a los 8.7 millones, aproximadamente el 7% (611.000 especies) lo constituyen los hongos y alrededor de 600 especies son patógenas para los humanos. Algunos de ellos son los responsables de infecciones consideradas leves en piel (por ejemplo, los dermatofitos y especies de *Malassezia*), otros que causan infecciones cutáneas graves (por ejemplo, *Sporotrix schenckii*) y otros son potencialmente mortales como los que generan infecciones sistémicas. (por ejemplo, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* y *Candida albicans*).<sup>35</sup>

*C. albicans* puede causar dos tipos principales de infecciones en los seres humanos: las infecciones sistémicas que amenaza la vida y las infecciones superficiales, como la candidiasis oral o vaginal. *C. albicans* y otras especies en menor medida están presentes en la cavidad oral hasta en un 75% de la población sana, donde esta colonización habitualmente permanece benigna. Sin embargo, individuos inmunocomprometidos pueden sufrir con frecuencia infecciones recalcitrantes de la cavidad oral. Estas infecciones orales con especies de *Candida* se denominan "candidiasis oral" y son en su mayoría causadas por *C. albicans* que puede afectar orofaringe y / o esófago de personas con disfunciones del sistema inmune adaptativo como VIH+ ; son más comunes en los extremos de la vida, principalmente en adultos mayores debido al uso de prótesis dentales, otros factores pueden ser la diabetes mellitus, uso de antibióticos, anticonceptivos orales, el embarazo y terapia con hormonas.<sup>36</sup>

Las defensas del huésped incluyen barreras físicas contra la penetración de hongos tales como las superficies epiteliales, factores antimicrobianos solubles en saliva, y los mecanismos de inmunidad celular innata y adaptativa. Ligeras alteraciones en el estado fisiológico del huésped pueden convertir esta levadura comensal normalmente inofensiva en un patógeno peligroso



capaz de propiciar una enfermedad. El potencial de virulencia de *C. albicans* aumenta considerablemente cuando se presentan alteraciones en el huésped. Las células epiteliales de las superficies mucosas se encuentran en posición de contacto constante con *C. albicans*, por lo tanto constituyen la primera línea de defensa contra el hongo, las infracciones de la barrera de la mucosa son muy importantes debido a que las infecciones sistémicas potencialmente mortales pueden surgir ya que encuentran una vía de penetración al torrente sanguíneo y otros tejidos disponible. Falta referencia

Un factor esencial es una apreciación de cómo las células epiteliales reconocen la presencia de *C. albicans* ya sea "comensal" o en etapa 'patógena' que conduce a la interacción ya sea pasiva o activa y produce una respuesta inmune. Principalmente se produce el reconocimiento e la etapa de adhesión del hongo a los tejidos epiteliales, esta es la etapa fundamental para la reproducción del microorganismo, posteriormente si encuentra las condiciones favorables en la etapa de la invasión se producen 2 subetapas, la primera es la invasión activa seguida de una inducción a la endocitosis; una vez logrado este objetivo se produce como última etapa el daño celular. Falta referencia



**Figura 4.** Etapas de la infección oral por *C. albicans*. Progresión de infección de células epiteliales orales se caracteriza por tres etapas distintas: Adhesión, invasión y daño.





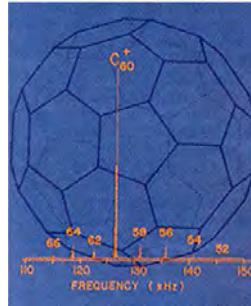
### **1.3 Nanopartículas metálicas**

Las nanoestructuras no surgieron recientemente por el contrario desde tiempos muy antiguos se encuentran descripciones sobre sus aplicaciones, sin embargo lo que es reciente es su estudio a un nivel atómico, es decir se analiza desde su síntesis y sus características individuales hasta sus posibles aplicaciones.<sup>37</sup>

"Nano" es una palabra griega que significa sinónimo de empequeñecer extremadamente pequeño,<sup>38</sup> se utiliza para indicar una mil millonésima parte de un metro o  $10^{-9}$  El término nanotecnología fue acuñado por el profesor Norio Taniguchi, de la Universidad de Ciencias de Tokio en el año 1974 para describir la precisión de fabricación de materiales a nivel nanométrico.<sup>39</sup>

El concepto de nanotecnología fue dada en 1559 por el profesor y físico Richard P. Feynman en su conferencia *"There's plenty of room at the Bottom"* / *"Hay un montón de espacio en la parte inferior"* *"En el interior hay espacio de sobra"* (Feynman and Leighton 2005) y poco después, en forma independiente, fue utilizado por el científico estadounidense Kim Eric Drexler en su libro *"Engines of creation: the coming era of nanotechnology"* / *"Motores de creación: la próxima era de la nanotecnología"* de 1986.<sup>41</sup> Por esos años, con el descubrimiento y síntesis del Fullerenos (esferoide formado por 60 átomos de carbono) Figura 3, por los científicos estadounidenses Robert Curl, Richard Smalley y el británico Harry Kroto,<sup>42</sup> y con la descripción de los nanotubos de carbono por el científico japonés Sumio Iijima en 1991<sup>43,44</sup> la nanociencia y la nanotecnología arrancaron formalmente.

El objetivo de la nanociencia y la nanotecnología es el estudio y manipulación de la materia dentro del rango de 1 a 100 nm ( $10^{-9}$  m) por lo menos en una de las dimensiones. El avance en estas áreas ha permitido el desarrollo de nanoestructuras de dimensión 0 (nanopartículas), 1 D, (nanotubos, nano-alambres), 2 D (planos, como el grafeno), y 3 D (una combinación de las anteriores)<sup>45</sup> con aplicaciones en áreas como la física, química, ciencia de materiales, medicina, y prácticamente en todos los campos de la ingeniería.



**Figura 5.** Estructura del fureleno (Baum, 1997).

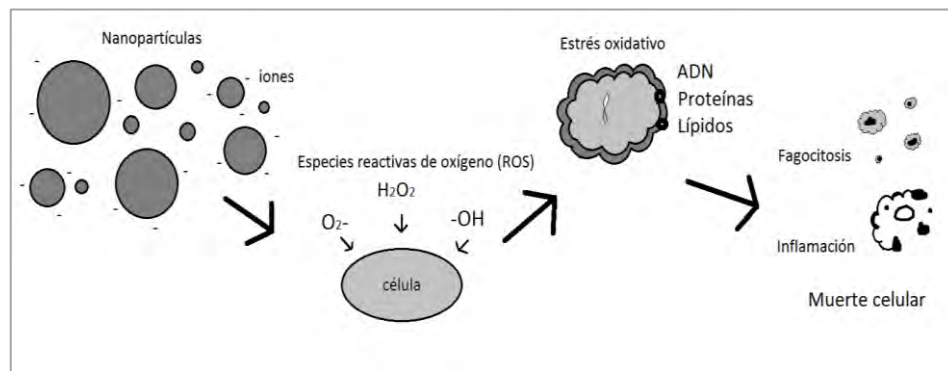
El uso de nanopartículas está ganando impulso en el presente siglo, ya que poseen diferentes propiedades químicas, ópticas y mecánicas. Las nanopartículas metálicas muestran buenas propiedades antibacterianas debido a su gran área de superficie en relación al volumen, debido a ello son del interés actual de los investigadores dada la creciente resistencia microbiana contra los antibióticos.<sup>46</sup> La nanotecnología ha emergido como la integración entre la biotecnología y la nanotecnología para el desarrollo de biosíntesis (tecnología respetuosa del medio ambiente) para el diseño de nanomateriales.<sup>47</sup> Dentro de las nanopartículas metálicas las propiedades más destacadas se encuentran las ópticas que son el resultado de las oscilaciones colectivas de electrones superficiales excitados por la luz incidente que generalmente se conoce como resonancia de plasmones superficiales (SPR) altamente sensibles a las características morfológicas de las nanopartículas, así como su composición y estructura. La mayoría de sus aplicaciones depende en gran medida de la capacidad de adaptación de la respuesta óptica y / o morfología de las nanoestructuras aunque la plata (Ag) es el metal que presenta la mejor respuesta plasmónica, su estabilidad química y estructural es limitada.<sup>48</sup>

Las propiedades mecánicas, eléctricas y magnéticas también varían de acuerdo al material, tamaño y forma de las nanopartículas; entre otras propiedades que poseen se destaca la actividad biológica de algunas de ellas, es decir su capacidad para interactuar con sistemas vivos como con bacterias y hongos entre otras especies lo que ha permitido su incorporación en campos biomédicos.<sup>49</sup>

La introducción de nanopartículas en medicina, biomedicina, odontología y otras áreas relacionadas con la salud ha resultado dificultosa debido a que requiere de diversos estudios previos principalmente para confirmar que su efecto no sea tóxico para células humanas por ejemplo. Una de las propiedades mayor estudiadas para descartar afecciones en un sistema



biológico es la capacidad de reacción relacionada con el área de superficie en relación al volumen que las contiene; se ha descrito que entre mayor es el área de superficie mayor es la interacción con el sistema que las contiene, esta propiedad es justo la razón por la cual se consideran para interactuar con microorganismos patógenos, ya que se incrementa la reactividad química y por tanto se produce un aumento de la producción de oxígeno reactivo (ROS) que pueden generar estrés oxidativo, inflamación y consiguientes daños a las proteínas, membrana celular y ADN.<sup>50,51</sup>



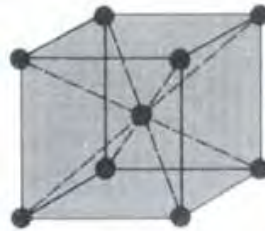
**Figura 6.** Mecanismos de acción de nanopartículas metálicas. Grupos reactivos de oxígeno estimulados por la presencia de nanopartículas metálicas que generan estrés oxidativo y finalmente la muerte celular ya sea por inducción de la fagocitosis o proceso inflamatorio.

El potencial antimicrobiano de las nanopartículas y la explotación de las propiedades tóxicas en bacterias, hongos y virus de nanopartículas en particular metálicas y de óxidos metálicos se ha aplicado en el control de infecciones orales y su estudio para la incorporación en materiales poliméricos de uso clínico ha aumentado notablemente durante la última década. El potencial de las nanopartículas para el control de la formación de biofilms dentro de la cavidad oral, así como su función biocida y las capacidades de anti-adhesivas que aportan a los materiales son actualmente objeto de estudio. Los últimos conocimientos sobre la aplicación de nanopartículas dentro de este campo, incluyen además su uso en la terapia fotodinámica y la biocompatibilidad así como la capacidad para ser alteradas y lograr la función deseada.<sup>52</sup>



### 1.3.1 Nanopartículas de plata (AgNPs)

Plata (Ag del latín *Argentum*) de número atómico 47, situado en la tabla periódica de los elementos en el grupo I-B cuyas principales características son su maleabilidad, ductibilidad, alta conductividad térmica y eléctrica, considerado un metal noble de color blanco brillante con conocidas propiedades bactericidas, principalmente como un elemento oligodinámico es decir que tiene interacción con la inactivación de enzimas metabólicas mediante su unión con grupos sulfidrilo (-SH) que participan en la cadena de transporte de electrones principalmente en bacterias.<sup>53</sup>



**Figura 7.** Estructura cristalina de la plata. Cúbica centrada en las caras.<sup>54</sup>

#### ***Falta hacer mención de la presencia de las figuras dentro del texto, en esta y otras....***

En medicina ha tenido múltiples aplicaciones en forma de plata metálica, nitrato de plata, sulfadiazina de plata etc. tanto para el tratamiento de quemaduras, heridas así como en el tratamiento de infecciones bacterianas; sin embargo, debido a la aparición de varios antibióticos el uso de estos compuestos de plata se ha disminuyó notablemente. Las sales de Ag y las suspensiones coloidales fueron utilizadas para combatir infecciones antes del desarrollo de los modernos antibióticos. Con la resistencia a los antibióticos que ahora muestran las bacterias, el interés ha resurgido. La plata coloidal generalmente consiste de partículas de tamaño que oscila entre los 250-300 nm, pero que están conformados de partículas más pequeñas (<100 nm).<sup>55</sup> La biodisponibilidad de la plata coloidal se ha estimado en un 10 %, con retención de <2-3% en los tejidos del cuerpo. La eliminación de la mayoría del material es por defecación<sup>56,57</sup> La plata metálica en forma de nanopartículas ha destacado como un agente antimicrobiano potencial, por lo tanto, las nanopartículas de plata han surgido con diversas aplicaciones médicas que van desde los apósitos con plata, diseño de dispositivos medicinales recubierto de plata, como nanogeles, etc.<sup>47</sup>



Se han estudiado los posibles mecanismos de toxicidad de las nanopartículas de plata, para Wong y Liu las nanopartículas proporcionan una gran área superficial para el contacto con bacterias, lo que permite que se unan a las bacterias y penetrar su membrana celular. Proponen que las nanopartículas o iones de plata interfieren con la actividad de las mitocondrias e interrumpir la cadena respiratoria conduciendo a la muerte celular de los microorganismos. Otras investigaciones sugirieron que principalmente los iones de plata reaccionan con los grupos tiol de las proteínas; los iones de plata deterioran la replicación del ADN debido al desacoplamiento del transporte de electrones de la fosforilación oxidativa, que inhibe las enzimas de la cadena respiratoria y/o interfiere con la permeabilidad de la membrana. Sukdeb Pal, describe como una exposición pequeña de células de *E. coli* a las nanopartículas de plata altera la expresión de un panel de proteínas de la envoltura y produce un choque térmico.<sup>58</sup> Una pérdida masiva de potasio intracelular y una disminución en los niveles de ATP, que culmina en una pérdida de la viabilidad celular. Lok et al hace una diferenciación de la capacidad antibacteriana entre las nanopartículas de plata y los iones de plata centradas en su tipo de concentraciones nanomolares en el caso de las nanopartículas y los rangos micromolares en el caso de los iones de Ag.<sup>59</sup>

Marambio-Jones y Hoek proponen tres posibles mecanismos de las actividades antibacterianas de las nanopartículas de plata:

1. La captación de iones de plata libre, seguido de la interrupción de la producción de ATP y la replicación del ADN
2. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por los iones de las nanopartículas de plata
3. Daño directo a la membrana celular por nanopartículas de plata.



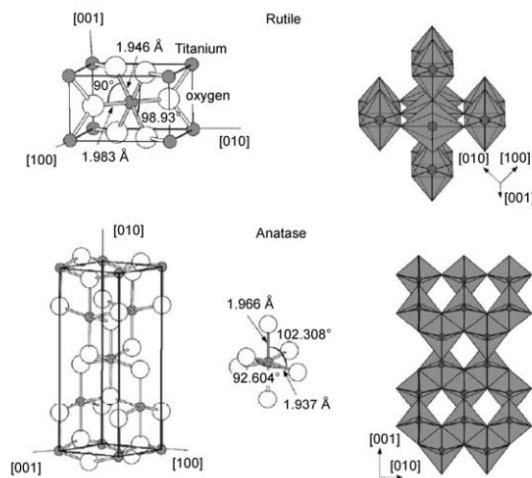
### 1.3.2 Nanopartículas de dióxido de titanio ( $TiO_2$ NPs)

El titanio es el elemento químico de número atómico 22, masa atómica 47,90 y símbolo  $Ti$ ; es un metal del grupo de los elementos de transición, de color blanco plateado, muy ligero y resistente presenta alta reacción con el oxígeno formando óxidos.

El dióxido de titanio pertenece a la familia de los óxidos de metales de transición. Se conocen 4 formas en las que se puede encontrar en la naturaleza el  $TiO_2$ :

1. anatasa (tetragonal),
2. brookita (ortorrómbica),
3. rutilo (tetragonal) y
4. simple (monoclínico).

Las fases con mayor aplicación para el diseño de nanopartículas suelen ser rutilo y anatasa, debido a su alta estabilidad a cambios térmicos que favorece la termodinámica.



**Figura 8.** Estructuras cristalinas de las fases de  $TiO_2$  rutilo y anatasa.<sup>60</sup>

Diversas investigaciones han establecido que  $TiO_2$  es mucho más eficaz como un fotocatalizador en la forma de nanopartículas que en volúmenes mayores o macroestructuras. Nanopartículas de óxido de titanio ( $TiO_2$ ) son componentes de pigmentos en cosméticos, protectores solares, pinturas, plásticos y colorantes de alimentos.<sup>61</sup> Recientemente,  $TiO_2$  se ha preparado en forma de polvos, cristales, películas delgadas,



---

nanopartículas, nanotubos y nanobastones el procesamiento en colides. Uno de los métodos más convenientes y comúnmente utilizados en la síntesis química. Este método proporciona las ventajas de controlar la estequiometría, la obtención de productos homogéneos y permiten la formación de formas complejas y preparación de materiales compuestos. Existen algunas desventajas en el método de síntesis incluyendo precursores caros, largos tiempos de procesamiento, y la presencia de carbono como una impureza.<sup>62</sup>



#### **1.4 Materiales odontológicos con propiedades antifúngicas**

La ciencia de los materiales enfrenta un reto que se renueva constantemente, la práctica odontológica exige el diseño de materiales que cumplan con las especificaciones tanto en calidad como en funcionalidad, debido a esta complejidad los esfuerzos de la comunidad científica orientada a la investigación de nuevos materiales de uso odontológico, se multiplican rápidamente a lo largo del mundo. Una de las principales áreas con grandes avances tecnológicos está enfocada en el desarrollo de materiales que además de su uso clínico aporten nuevas propiedades que reduzcan más de una problemática en salud bucal.<sup>63,64</sup>

La incorporación de propiedades antifúngicas en materiales odontológicos es un claro ejemplo de las necesidades actuales de la población, se han registrado avances importantes en este campo con el desarrollo de materiales compuestos, más resistentes y de efecto antifúngico que aportan beneficios en la calidad de vida de sus usuarios, materiales de tipo experimental con reforzamiento de nanopartículas principalmente de óxido de sílice y plata con actividad antifúngica que reporta una reducción de la actividad microbiana.<sup>65</sup>

A medida que la ciencia aporta importantes recursos para el desarrollo de nuevas tecnologías se encuentra con significativas limitaciones como las condiciones tan variadas de la cavidad oral, como cambios de temperatura y pH entre otros, por lo que resulta difícil la obtención de materiales absolutamente satisfactorios.<sup>66</sup> es por esto que el desarrollo de materiales con propiedades antifúngicas se ha vuelto un reto para las ciencias básicas y la industria.

El PMMA (polimetil metacrilato) es comúnmente utilizado en odontología para elaboración de bases de dentaduras y prótesis; en medicina se utiliza la resina de PMMA para la fabricación de prótesis óseas y como aditivo en polvo en la formulación de pastillas de administración vía oral. Éste también ha sido uno de los materiales que han tenido importantes modificaciones estructurales favoreciendo sus características, se le han conferido propiedades antimicrobianas y antifúngicas a través de la incorporación de otros materiales como plata a su matriz polimérica. La proliferación descontrolada de la flora microbiana, produce un incremento en el índice de patologías bucales.<sup>67,68</sup>





## 2 Antecedentes

*Candida albicans* es la especie con mayor adhesión en superficies de prótesis de PMMA<sup>69</sup> hasta un 65% de los portadores registran presencia de este microorganismo que muestra un aumento en la adhesión a materiales sintéticos comparados con otros tejidos de cavidad oral<sup>70</sup> por lo cual diversas modificaciones tanto a la estructura como a las superficies del PMMA han sido evaluadas en los últimos años.

Lee y Nam evaluaron PMMA de aplicación odontológica impregnado con Ag (nitrato de plata y nanopartículas de plata) para inhibir el crecimiento de *Candida albicans*. Analizaron 2 medios de inserción de las partículas de plata obteniendo 2 grupos de estudio: Ag-polímero y Ag-monómero; encontrando reducción en la formación de colonias en ambos casos la concentración 0,05 M obtuvo entre 72,8 y 80,9% de efecto inhibitorio; sin embargo la estabilidad del color del PMMA no fue satisfactoria por lo cual no se obtuvo la calidad necesaria para su aplicación clínica.<sup>71</sup>

Monteiro (2011), informó actividad biológica de las muestras de resinas acrílicas que incluían AgNPs obteniendo un total de 23% menos de la biomasa formada en 24h y 47.2% a las 48 h en la inhibición de *C. albicans*.<sup>72</sup> En 2014 describe la presencia de actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata y titanio entre otras, destacando su actividad contra la formación del biofilm de cavidad oral mediante el desarrollo de la propiedad anti adherente en materiales dentales.<sup>52</sup>

Una de las nanopartículas empleadas son las de óxidos metálicos como el óxido de Titanio. Se han incorporado nanopartículas de óxido de Titanio in situ en matriz de PMMA para la reducción de adhesión de *C. albicans*, particularmente TiO<sub>2</sub> en fase cristalina anatasa he demostrado tener mayor efecto antimicrobiano comparada con otras fases que puede presentar.<sup>73</sup> Qingqing Wang, 2011 aplica un recubrimiento superficial con nanopartículas de TiO<sub>2</sub> para utilizar su actividad fotocatalítica; nanopartículas de TiO<sub>2</sub> en sus fases cristalinas anatasa y rutilo fueron utilizadas como depósitos sobre PMMA, logrando una buena distribución y disposición en la superficie.<sup>74</sup>

Ciao y Liu (2010) informaron significativo efecto antimicrobiano en experimentos con nanopartículas de plata y TiO<sub>2</sub> en células procariotas (*S. aureus* y *E. coli*), obtuvieron buen



efecto inhibitorio y no mostraron citotoxicidad en células osteoblastos MG63<sup>75</sup> por lo cual se han propuesto para ser probadas en células eucariotas.

Se han incorporado diversas nano-estructuras en resinas tanto acrílicas como composites dentales para combatir infecciones por especies *Candida* logrando que las propiedades mecánicas de las mismas no se afecten, por lo cual se considera viable la incorporación de nanopartículas para el control de infecciones orales Lino et al. Realiza una propuesta sobre resinas dentales con actividad biológica mediante la inmovilización de partículas de sílice funcionalizadas como agente antimicrobiano a la resinas para promover el contacto de las nanopartículas y los microorganismos y con una perdurabilidad del efecto mayor a 1 mes.<sup>65</sup>

Ziad N. en 2012 tuvo como objetivo investigar las propiedades de superficie (principalmente posibles modificaciones en el promedio de rugosidad y en formación del ángulo de contacto) de PMMA antes y después de la exposición a los agentes antifúngicos nistatina y fuconazol y su relación con la adherencia in vitro de *Candida albicans*, obteniendo que existe un aumento del promedio de rugosidad y ángulo de contacto en los especímenes en contacto con nistatina en comparación con los otros grupos,<sup>69</sup> lo cual de acuerdo con la literatura podría favorecer la adhesión de microorganismos además de que el uso de antifúngicos y la resistencia a fármacos sigue siendo un punto desfavorable.



**Tabla 4.** Análisis de la rugosidad promedio de superficie de PMMA con antifúngicos nistatina y fluconazol que muestran mayor modificación de la superficie comparado con los grupo control.

69

Grupo	Promedio de rugosidad de superficie ( $R_a$ )
Grupo 1 (nistatina)	$0.44 \pm 0.16$
Grupo 2 (fluconazol)	$0.36 \pm 0.09$
Grupo 3 (agua destilada)	$0.36 \pm 0.08$
Grupo 4 (no expuesto)	$0.34 \pm 0.10$

*$R_a$  rugosidad promedio;  $\pm$  Desviación Estándar*

Semaltianos en 2007 propone el método de revestimiento de PMMA por centrifugación (técnica Spin coating) mediante soluciones acuosas o coloides y que posterior a la formación de la película reciben un tratamiento térmico para la eliminación mediante evaporación de residuos acuosos con temperaturas cercanas a los 170 °C en bajo vacío; este método se usa comúnmente como un método fácil, rápido y controlable para la formación de sustratos de alta calidad sobre PMMA debido a que las películas presentan espesores uniformes, es decir generando películas ultra finas inferiores a 100 nm. A fin de obtener información sobre las fuerzas adhesivas de las películas de PMMA mediante revestimiento por centrifugación se analizaron grupos con las condiciones de velocidad y tiempo entre 5 krpm y 8 krpm durante periodos que variaron entre 2 y 60 min. con temperatura de incubación de 200 °C; las películas se midieron mediante el uso de la AFM obteniendo una película más delgada en velocidades de centrifugado más altas y a partir de soluciones con concentraciones más bajas éstas son superiores en términos de su morfología de la superficie que las películas formadas a velocidades más bajas y con concentraciones más altas.<sup>76</sup>



---

## Capítulo II

### 3 Planteamiento del problema

La presencia de estomatitis subprotésica y/o lesiones en epitelio de cavidad oral sigue siendo un problema común entre individuos portadores de prótesis totales o parciales elaboradas con Polimetil-metacrilato (PMMA), cuyas rugosidades superficiales promueven el reservorio de diversos microorganismos, propiciando su adhesión y proliferación, generando así procesos infecciosos por especies de tipo *Candida*, principalmente *C. albicans*, entre otras.

Actualmente no existe un material para la elaboración de dichas prótesis que presente actividad en contra de microorganismos patógenos fúngicos, por lo que las condiciones de salud bucal pueden encontrarse afectadas. La salud oral puede presentar alteraciones importantes debido a diversos factores como la alimentación y la higiene, sin embargo en pacientes portadores de prótesis totales éstas pueden ser aún mayores, debido a que, por lo general presentan edades avanzadas y las condiciones sistémicas generales se encuentran disminuidas, además del uso de medicamentos, y una disminución natural de producción de saliva. Aun cuando especies del tipo *Candida* se encuentran dentro de la microbiota común de cavidad oral, su crecimiento descontrolado produce importantes alteraciones a las condiciones normales de salud del epitelio bucal, de aquí la importancia de desarrollar materiales que posean cierta actividad biológica capaz de controlar y contrarrestar las infecciones de este tipo.



---

## 4 Justificación

El PMMA usado en odontología para la elaboración de bases de dentaduras, no tiene ninguna actividad antimicrobiana por tanto resulta necesaria la obtención de un material que evite esta condición, y que al mismo tiempo presente las propiedades físicas adecuadas con base en parámetros internacionales, la optimización de las superficies protésicas puede contribuir a contrarrestar diversas patologías de cavidad oral. La nanotecnología proporciona una manera eficaz y rentable, de aplicar un tratamiento con nanopartículas de metales utilizados como una sustancia antifúngica y reductora de la rugosidad superficial. Un tratamiento de nanopartículas, puede reducir la adherencia de microorganismos patógenos a la superficie de los dispositivos intraorales.



---

## 5 Hipótesis

El recubrimiento de la superficie de PMMA con nanopartículas de plata y dióxido de titanio dará como resultado la formación de un material compuesto con reducción de adherencia de *Candida albicans*.



## 6 Pregunta de investigación

¿El recubrimiento de PMMA de uso odontológico con nanopartículas de plata (Ag) y dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>-anatasa) disminuye la adhesión de *C. albicans*?

## 7 Objetivo general

Evaluar adhesión a superficie de *C. albicans* en PMMA de uso odontológico con recubrimiento de nanopartículas metálicas de plata y dióxido de titanio.

### **Objetivos específicos**

1. Obtener nanopartículas de plata (AgNPs) y dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>-anatasa).
2. Obtener de muestras experimentales de PMMA.
3. Realizar el recubrimiento de la superficie de PMMA con nanopartículas mediante técnica "Spin coating".
4. Evaluar adhesión a superficie con recubrimiento de los 2 tipos de nanopartículas en cultivos de especie *C. albicans*.

### **Tipo de estudio**

Experimental, observacional y descriptivo



## Variables

### Independientes

	Tamaño de partícula TEM	Morfología TEM	Longitud de onda UV-Vis	Estructura Cristalina HR-TEM
Definición de variable	Magnitud media, o equivalente. Determinada por valor medio de tres dimensiones: longitud, anchura y espesor. <sup>(32)</sup>	Evaluación conjunta de varios parámetros para determinar lo que una partícula se aleja de una esfera: pèlipsis, rectang, modelx, elongación, relación de aspecto y circuncidad. <sup>(33)</sup>	Distancia que recorre la onda durante un ciclo o período, producto de la velocidad de propagación en al espacio, expresada en bandas. <sup>(34-36)</sup>	Repetición de unidades estructurales idénticas en el espacio, que puede comprender uno o más átomos o moléculas, ligados a un punto en una red que se repite en el espacio. <sup>(37)</sup>
Definición operacional	Magnitud media determinada por valor de longitud y anchura de las nanopartículas.	Determinación de diferentes diámetros de una partícula, girando en todas sus coordenadas.	Determinación de absorbancia en el rango de 380 nm a 780 nm.	Forma alotrópica del TiO <sub>2</sub> donde los electrones de Ti están rodeados por iones O, <sup>(38)</sup> determinada por la prevalencia de bandas características de nanopartículas de Óxido de Titanio con fase cristalina anatasa. <sup>(41)</sup>
PMMA NPs	10- 50 micrómetros	esférica	-	-
Ag NPs	10-59 nanómetros	esférica	400-410 nanómetros	-
TiO <sub>2</sub> NPs	8 - 35 nanómetros	indefinida	350-360 nanómetros	anatasa





## Dependientes

Experimentales de PMMA con recubrimiento superficial	Definición de variable	<p>Adhesión</p>	<p>Morfología de superficie, Rugosidad AFM</p>
	Definición operacional	<p>Unión entre una capa y el sustrato; fuerzas de enlace entre los átomos del sustrato y los del material que forma la capa. La adherencia de un sistema capa-sustrato será la resultante de la suma de todas las fuerzas de enlace involucradas.<sup>44</sup></p>	<p>Variabilidad de poros, elevaciones, pendientes, orientación, convexidad y relieve en términos de rugosidad de una superficie.<sup>39</sup></p>
		<p>Cuantificación de células formadoras de colonias de especies de <i>Candida</i> presentes en la superficie de PMMA con recubrimiento de nanopartículas.</p>	<p>Cuantificación de la variabilidad de rugosidad o porosidad de la superficie del PMMA con recubrimiento superficial de nanopartículas.</p>



## Criterios de selección de sujetos de estudio

### Inclusión

- PMMA con recubrimiento de AgNPs
- PMMA con recubrimiento de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> NPs.anatasa
- Cultivos de especies de *Candida albicans*

### Exclusión

- PMMA con recubrimiento que presenten irregularidades evidentes en la superficie.
- Tamaño de las partículas menor a los 8 nm y mayor a los 60 nm

### Eliminación

- Cultivos contaminados
- Muestras de PMMA que se dañen durante los procedimientos



## Capítulo III

### 8 Metodología

#### ***Obtención de nanopartículas (Ag y TiO<sub>2</sub> anatasa NPs)***

Las nanopartículas de plata (AgNPs) fueron utilizadas en dispersión de trietilén-glicol / monoéter (Sigma-Aldrich, St Louis, MO. EE.UU.) con una concentración de 0.1622 moles.

Las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-anatasa fueron sintetizados mediante cavitación ultrasónica (145 W, 40kHz ±6%) utilizando 4 mL de isopropóxido de titanio IV (Sigma-Aldrich, 97%) como agente precursor; .090 mL de Ácido Nítrico (1 Molar, Golden Bell) como agente reductor; 5.4 mL de Isopropanol (J.T. Baker, 99.9%) como agente estabilizador en ambiente ácido-base con una concentración de 0.522 moles.

#### ***Caracterización de nanopartículas***

El desarrollo de nuevos materiales requiere de la aplicación de técnicas de preparación y caracterización muy específicas para obtener información relevante sobre sus propiedades y sus posibles aplicaciones; estos datos son producidos mediante la emisión de un estímulo para producir una señal, la cual puede hacer referencia a la estructura, morfología o composición del material entre otras características.

- ***Morfología y tamaño de partícula***

El análisis de tamaño de partícula y morfología se realizó mediante Microscopia de Transmisión Electrónica TEM (JEOL mod JEM-1010, cámara digital Orius, software GATAN) 10 µL de cada tipo de nanopartículas fueron colocadas sobre una membrana de cobre para la obtención de imágenes.

- ***Distancia interplanar***

La determinación de las distancias entre planos cristalográficos de las NPs se realizó mediante Microscopia de Transmisión Electrónica de Alta Resolución HR-TEM (JEOL-JEM2010 LaB 6, DESA) y analizadas mediante el software GATAN.



### ○ **Espectro UV-Vis**

Espectro de absorción se analizó mediante Ultra Violeta Visible UV-Vis (Multiskan GO, Thermo Scientific 200-1100 nm) en un rango de 250 a 500 nm en celdas de cuarzo.

### **Inhibición**

Se analizó la formación de zonas de inhibición mediante la técnica de difusión en disco; se utilizó solución de microorganismo *C. albicans* - (ATCC 90026) en una concentración de 0.5 D.O. a 600 nm ( $1 \times 10^8$ ); se utilizaron discos absorbentes  $\varnothing = 1$  cm (Sigma-Aldrich) mediante inmersión en 1 ml de NPs coloidales durante 60 segundos.

Se utilizó para su cultivo agar Mueller Hinton, las muestras fueron sometidas a incubación durante 48 h a 37 °C (n=12), posteriormente se analizó zona de inhibición de un extremo a otro atravesando por el diámetro del disco; se utilizó agua doblemente destilada y trietilenglicol como control negativo; Anfotericina B como control positivo.

### **Viabilidad celular**

Se determinó proliferación de células NIH-3T3 (ATCC, CRL-1658) previamente cultivadas en Medio Esencial Modificado Dulbecos, DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, se utilizó 1% de penicilina / estreptomina, se utilizaron 20  $\mu$ L de MTT al 0.2%, 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazol; (Sigma-Aldrich) en solución tampón de fosfato salino o PBS, por ml de medio que contenían las células; se adicionaron 10 ml de nanopartículas - (Ag / TiO<sub>2</sub>) en diferentes concentraciones: AgNPs= 7,7 y 3,1  $\mu$ M y TiO<sub>2</sub> = 5, 1  $\mu$ L.; la evaluación de la viabilidad se realizó a 24 h mediante lectura de D.O. en espectrofotómetro de microplaca a  $\lambda = 655$  nm (Bio-Rad, Mod. 680 Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.).

### **Síntesis de PMMA**

PMMA fue sintetizado utilizando 100 g de metacrilato de metilo MMA (Sigma-Aldrich) como precursor, 0,30 g de peróxido de benzoilo (Sigma-Aldrich) como agente iniciador de la reacción; 2.5 g de grenetina natural (Ker®), 8.1 g de hidróxido de sodio (J.T. Baker). Utilizados



como pigmento 0.018 g de óxido de fierro, 0.03 g de benzofenona y 0.015 g de dióxido de titanio (Sigma-Aldrich) mediante precipitación en atmosfera nitrógeno a 70 °C.

Posteriormente se realizaron lavados con agua des-ionizada, se deshidrató en horno de secado en condiciones de vacío bajo 0.09 MPa (Vacuum Horno DZF-6020, 50-250 °C) durante 24 h a 60 °C; el material obtenido fue tamizado en malla > 105 micras durante 40 min. para obtener partículas de tamaño menor.

### **Recubrimiento de superficie de PMMA**

Se obtuvieron muestras de PMMA en forma de disco ( $\varnothing = 1$  cm) y se recubrieron con 40  $\mu$ L de cada tipo de solución coloidal de NPs mediante la técnica “spin-coating” (modelo Holmarc N° HO-TH-05, India), con las siguientes condiciones: V1: 1.500 rpm, t1: 15 s; V2: 1.200 rpm, t2: 15 s, posteriormente al recubrimiento se realizó tratamiento térmico a 60 °C en bajo vacío (0,09 MPa). Análisis de rugosidad de la superficie se realizó mediante microscopía de fuerza atómica (AFM Nanosurf Flex Liestal, Suiza) se llevó a cabo en las regiones de 40x40  $\mu$ m a 10 X amplificados. Para la determinación del espesor de la película se recubrieron placas de silicio 1cm de diámetro con 40  $\mu$ L de cada tipo de nanopartículas y se sometieron en las mismas condiciones de temperatura y atmósfera; la interface se observaron por SEM (TM1000 Hitachi) a 15 kV con radio dispersos de electrones detector.

### **Identificación de especie *Candida* predominante**

Muestras de microbiota oral fueron obtenidas de 33 pacientes portadores de prótesis total con lesiones blancas o rojas en el epitelio que acudieron a las clínicas de la ENES León, UNAM en el periodo marzo 2015- febrero 2016, los cuales fueron informados del estudio mediante un formato de consentimiento informado y siguiendo los pasos del protocolo para la recolección de muestras (anexos). Se utilizó medio de transporte solución Stuart y realizando Inoculación utilizando CHROMagar™Candida que identifica *C. tropicalis* (azul), *C. krusei* (rosa) y *C. albicans* (verde-turquesa). Para la determinación de la formación de colonias los cultivos se incubaron a 37°C y posteriormente se analizaron a 36 h. Colocar la edad de los pacientes, si presentaban enfermedades sistémicas y si tomaban algún medicamento?



### **Adhesión de *C. albicans* a superficies de PMMA**

Muestras de PMMA recubiertas se mantuvieron en contacto con cultivos de *C. albicans* (ATCC 90026 con una concentración de  $10^6$  células/ D.O. 0.12 – 0.15) con 24h de crecimiento durante 24 y 48 h a 36.7 °C en agitación continua. Se colocaron 50  $\mu$ l del inóculo (0,12 - 0,15 D.O.) / 1 ml de medio de cultivo trópticasa de soya se utilizaron por cada disco de PMMA. Las muestras se retiraron del medio y se realizaron 3 lavados con PBS, posteriormente se aplicaron 100  $\mu$ L de MTT (Sigma-Aldrich) al 0,2% en PBS en cada disco, se incubaron durante 90 min al 36.7 °C. las muestras se lavaron con solución de DMSO dimetil-sulfóxido (Sigma-Aldrich) para obtener actividad mitocondrial, análisis fotométrico mediante UV-Vis a 590 nm.

### **Análisis de migración de Ag / TiO<sub>2</sub>**

Muestras circulares de 1cm de diámetro de PMMA recubiertas se mantuvieron en inmersión en medio acusoso simulante de saliva a una temperatura constante de 37 °C. el contenido fue filtrado y analizado en diferentes tiempos, 24 h 4, 8 y 15 días, en ICP-MS (Agilent 7500) equipado con un nebulizador Babington y cámara de pulverización de doble pase. Se utilizó la modalidad TRA (Time Result Analysis) para el análisis del espectro, para obtener la cantidad de iones contenida en el medio. Se determinó la concentración en ppb (partes por billón) comparado con un patrón multielemental al 10% en saliva artificial para cada elemento (Ag Merck, Ti Scharlau).  $R^2= 0.97666$ .

### **Análisis estadístico**

La estática descriptiva fue considerada en media, desviación estándar, y porcentaje. Datos de los ensayos de inhibición y viabilidad fueron analizados por Kolmogorov-Smirnov con ajuste Lilliefors; Kruskal Wallis y test T-Man Whitney. Ensayo de control, simple ciego. Para la prueba de adhesión se aplicaron ANOVA de Una Vía y Tukey pos hoc.

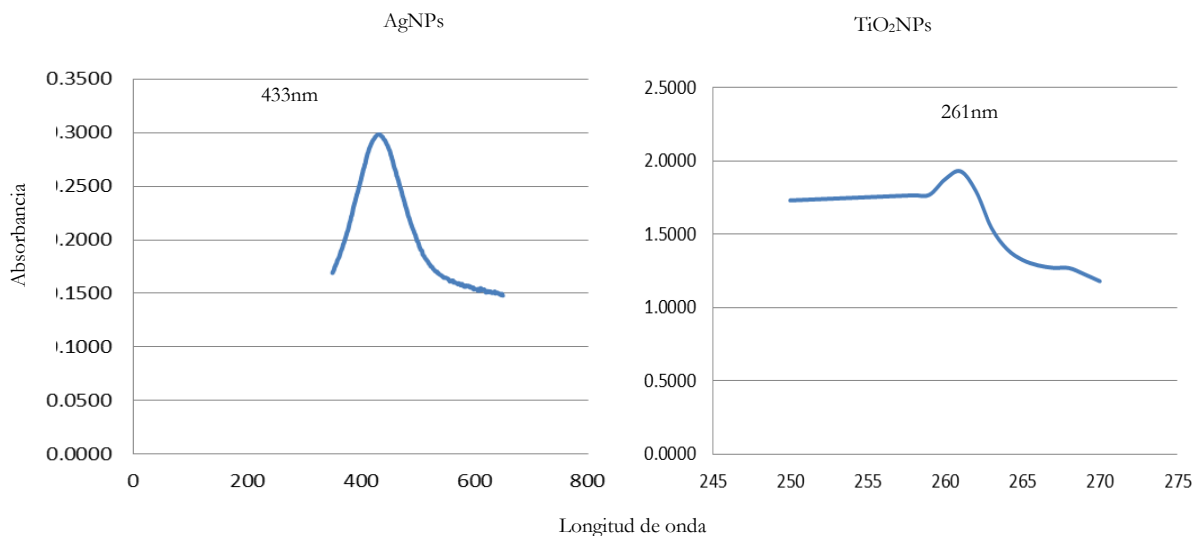


## 9 Resultados

### **Obtención de Ag y TiO<sub>2</sub>NPs (UV-Vis)**

La espectroscopía de luz Ultravioleta Visible (UV-Vis) se basa en la emisión de fotones y cuantificando la radiación electromagnética en las regiones de ultravioleta cercana del espectro electromagnético que comprende el rango de longitud de onda ( $\lambda$ ) de 190 a 800 nm. Esta técnica de análisis nos permite determinar si el proceso de síntesis de nanopartículas en este caso Ag y TiO<sub>2</sub> se han llevado a cabo correctamente. Las nanopartículas de plata presentan un máximo de absorción cercanos a los 400 nm cuando su morfología es esférica o semiesférica y tu tamaño es menor a los 60nm de diámetro; En el caso particular de las nanopartículas de Dióxido de Titanio el máximo de absorción se registra en valores cercanos a 230 nm.

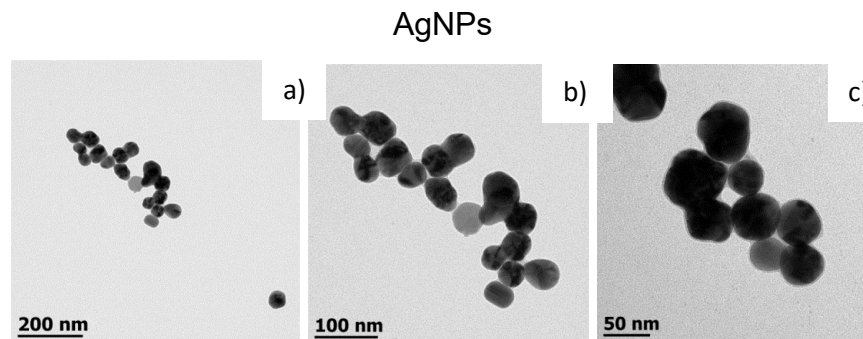
Mediante análisis UV-Vis el valor máximo de absorbancia para las nanopartículas de plata se obtuvo a una longitud de onda de 433 nm El valor máximo de absorbancia para las nanopartículas de Dióxido de Titanio se obtuvo a una longitud de onda de 261 nm (Figura 9) por lo que en ambos casos se corroboró la obtención de las mismas.



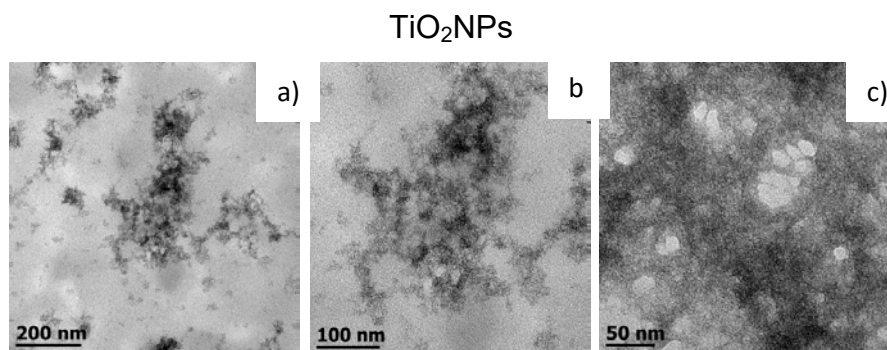
**Figura 9.** Espectro de absorción Uv-Vis, AgNPs (izquierda),  $\lambda=433\text{nm}$  y TiO<sub>2</sub>NPs (derecha),  $\lambda=261\text{nm}$ , se muestran picos característicos de los metales nano estructurados obtenidos.

## Morfología y tamaño de NPs (TEM)

El análisis mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) encuentra sus bases en la transmisión y difracción de electrones y es un método empleado para proporcionar imágenes que ayuden a determinar morfología y tamaño de nanopartículas hasta de 0.2 nm de diámetro. Los resultados obtenidos corroboran lo anteriormente obtenido mediante análisis UV-Vis. Para nanopartículas de plata se observó morfología semiesférica con un diámetro de  $41.55 \pm 1.4$  nm, mientras que para las nanopartículas de dióxido de titanio la morfología se mostró irregular y con un diámetro estimado de 8 nm formando aglomerados.



**Figura 10.** Imágenes TEM, AgNPs; a) 200 nm, b) 100 nm, c) 50 nm, se distingue la morfología semiesférica de las nanopartículas de plata en medio de dispersión de trietilenglicol y monoeter.



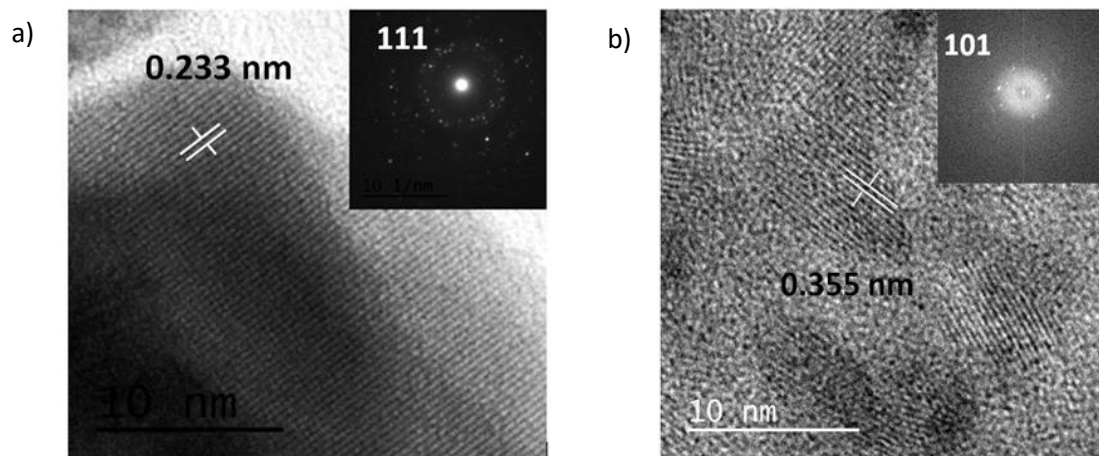
**Figura 11.** Imágenes TEM TiO<sub>2</sub>NPs; a) 200 nm, b) 100 nm, c) 50 nm, se distingue la morfología irregular formando aglomerados de las nanopartículas de dióxido de titanio en medio de dispersión de alcohol isopropílico.





### **Fase cristalina (HR-TEM)**

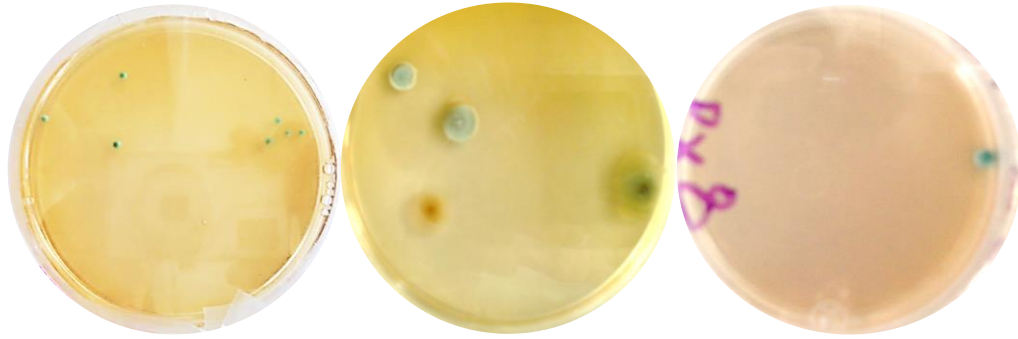
El análisis mediante Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM) permite obtener imágenes de la estructura atómica de nanopartículas de materiales cristalinos, se pueden observar los átomos que los componen de manera individual. Debido a que todas las estructuras cristalinas presentan 3 dimensiones se pueden obtener imágenes diferentes dependiendo el ángulo de orientación, de estas imágenes podemos determinar si existe la presencia de algún defecto cristalino y mediante la obtención de una imagen de transformada de Fourier se determina la distancia entre los átomos que conforman planos distintos



**Figura 12.** Micrograffías obtenidas por HRTEM de la fase cristalina a) Ag plano 1,1,1 = 0.233 nm y b) TiO<sub>2</sub> (anatasa) plano 1,0,1 = 0.355 nm. Se observan las distancias entre planos cristalográficos y el patrón de difracción de su estructura cristalina mediante Transformada de Fourier.

### **Identificación de especie Candida predominante**

Se obtuvieron un total de 33 muestras de microbiota oral de pacientes portadores de prótesis totales dentales con presencia de lesiones en epitelio, de los cuales 21 pacientes (63.3%) cumplieron con los criterios de morfología y color considerados como positivo a *C. albicans*, obteniendo un promedio de 4 unidades formadoras de colonias. ( $\bar{X} \text{ UFC} = 4$ ). Por lo cual se concluye que *C. albicans* es la especie que predomina en estos casos.

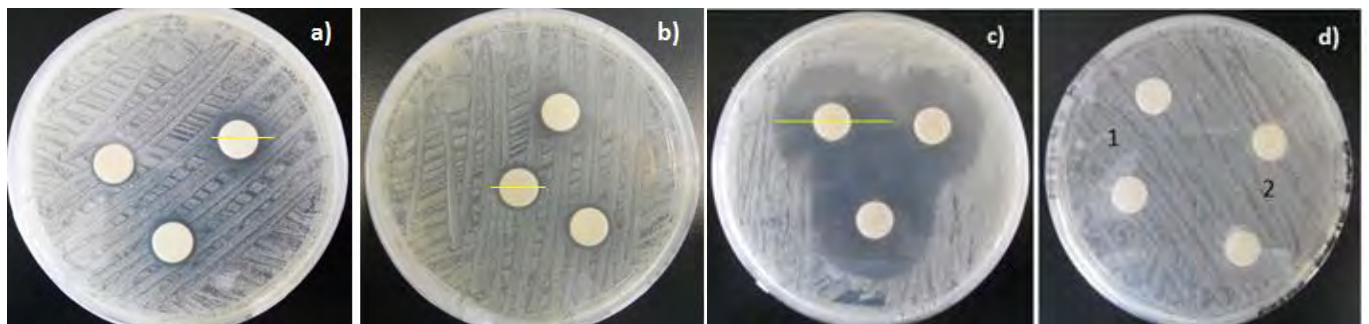


**Figura 13.** Ejemplos de muestras aisladas de pacientes con resultado positivo a *C. albicans*.

### **Zona de inhibición (difusión en disco)**

Se analizó zona de inhibición de la especie *C. albicans*, mediante técnica de difusión en disco con un número de muestras o valor  $n = 12$  para cada grupo. Los datos no mostraron una distribución normal según la prueba de Kolmogorov-Smirnov; Los análisis estadísticos Kruskal Wallis y U-Man Whitney fueron aplicados a los resultados.

Para AgNPs se obtuvo una zona de inhibición promedio de  $13.70 \pm 0.62$  mm, mientras que las  $TiO_2$ NPs mostraron una zona promedio  $14.85 \pm 0.37$  mm en ambos casos se muestran valores significativos  $P = 0,0001$ . Se utilizó como control positivo Anfotericina B con valores promedio de 33.3 mm; agua destilada y trietilenglicol como controles negativos con valores en ambos casos igual a cero.

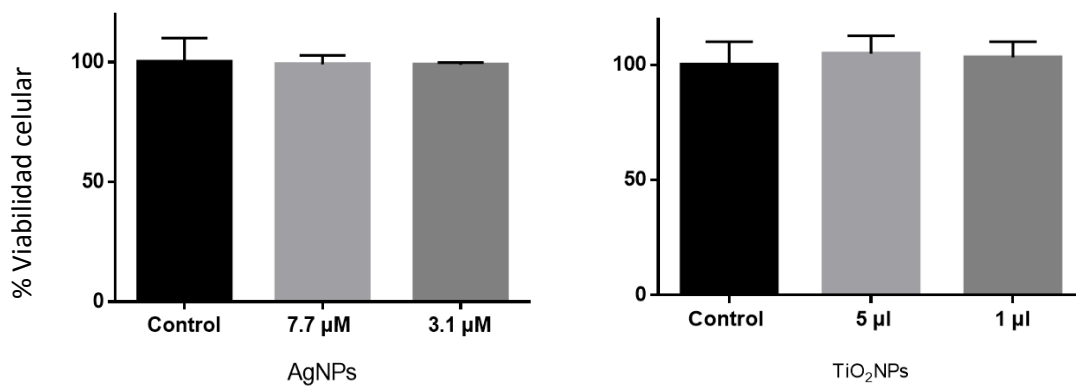


**Figura 14.** Zona de inhibición en cultivos de *C. albicans* a) AgNPs, b)  $TiO_2$ NPs c) Anfotericina B (control positivo) d) 1 agua destilada, 2 trietilén glicol (control negativo).



## **Viabilidad celular**

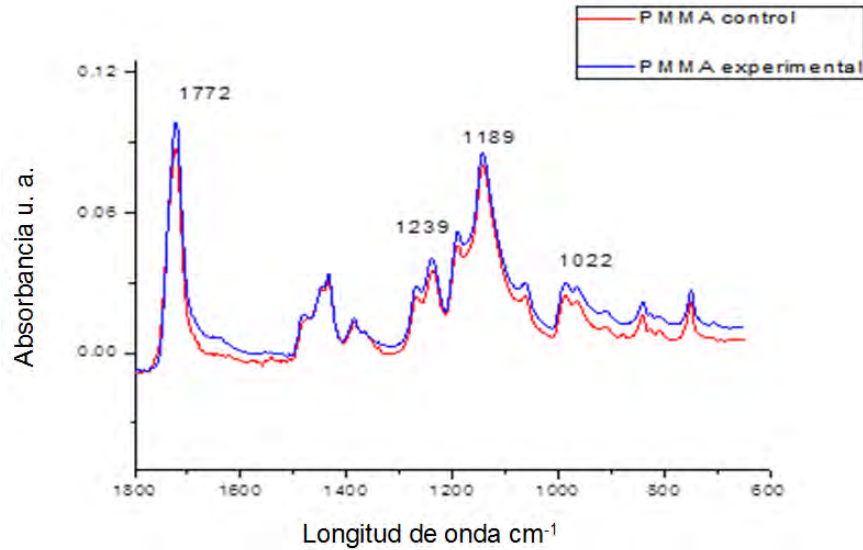
AgNPs, TiO<sub>2</sub>NPs y el grupo de control (% crecimiento de las células en condiciones óptimas) se evaluaron a 24 h utilizando diferentes concentraciones mediante MTT. El análisis estadístico indica que no hay diferencias significativas entre los grupos. se consideró el porcentaje del grupo control como el total de la viabilidad mostrada. Para las concentraciones 7.7 y 3.1  $\mu$ M de las AgNPs mostraron valores cercanos al 100% de viabilidad celular en ambos casos. Las TiO<sub>2</sub>NPs en concentración 5 y 1  $\mu$ L muestran valores superiores al grupo control, lo que supone el favorecimiento de la proliferación celular, (Figura 15 No se obtuvo diferencia estadística significativa entre los grupos evaluados. Se considera que los dos tipos de nanopartículas analizadas no son citotóxicas en células NIH-3T3.



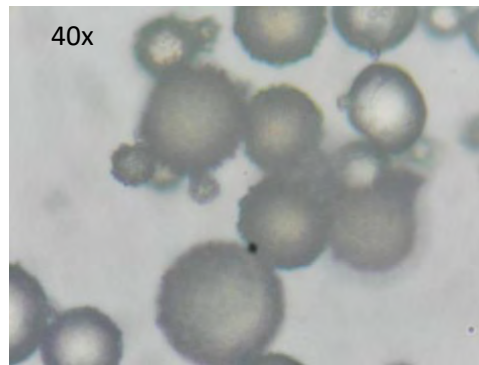
**Figura 15.** (%) Porcentaje de viabilidad celular de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en diferentes concentraciones (MTT, células NIH-3T3 a 24 h).

## **Obtención de PMMA**

El espectro de FT-IR de PMMA experimental presenta bandas características 1772, 1239, 1189, 1022  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los enlaces C=O/-HOO, C-O, -O-C, -C-H respectivamente, mismas que bandas que se obtienen en el grupo control, (Figura 13) la obtención de PMMA se confirmó; se obtuvo partícula esférica de tamaño >.005 micras (Figura 16).



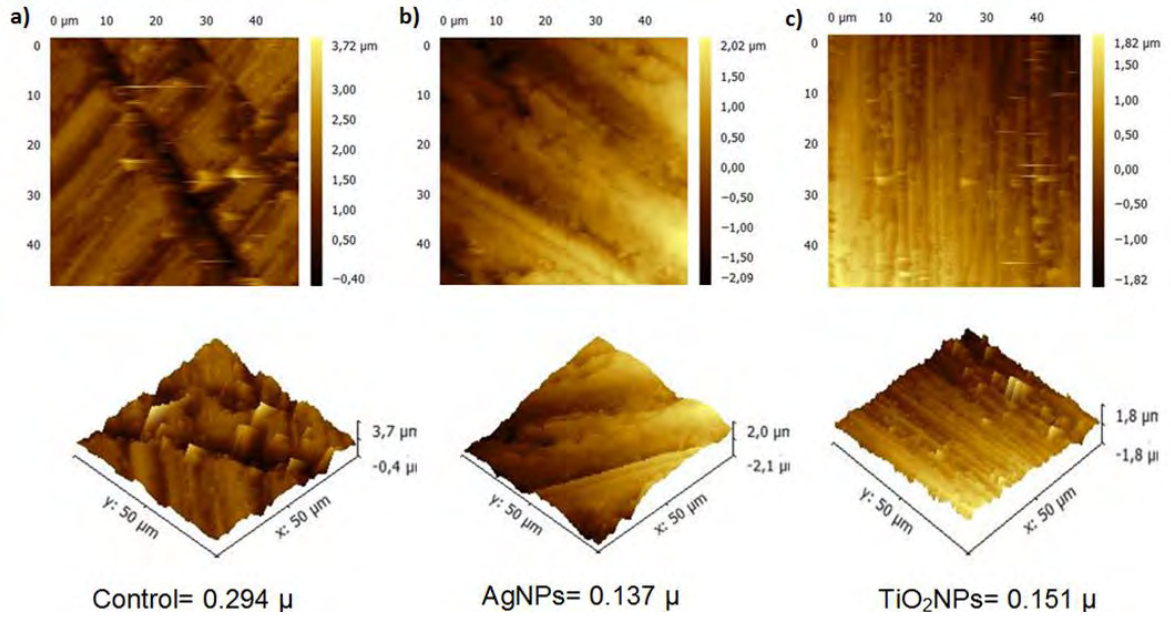
**Figura 16.** Análisis FT-IR, PMMA muestra bandas a 1772, 1239, 1189, 1022  $\text{cm}^{-1}$ , control de PMMA en rojo, PMMA experimental en azul.



**Figura 15.** Imagen de microscopía óptica 40X, se observa morfología esférica de PMMA.

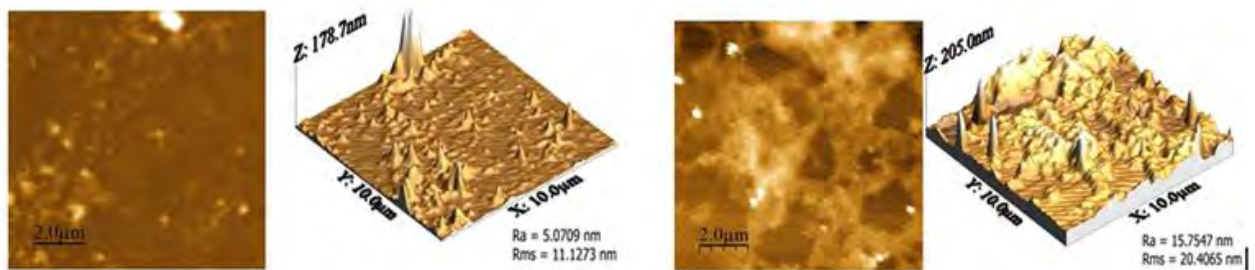
### ***Recubrimiento de superficie (Spin coating)***

Muestras de PMMA se recubrieron con Ag y  $\text{TiO}_2\text{NPs}$  y se analizaron por AFM. Los valores promedio de rugosidad superficial obtenidos se expresan como *Ra* (*Rugosidad aritmética de superficie*) obteniendo valores mayores en el grupo control ( $0.294 \mu$ ) comparado con las superficies tratadas lo que indica una mejoría de las condiciones superficiales del PMMA ( $n=9$ ). Entre los recubrimientos con NPs el que mostró un valor disminuido de *Ra* fue la superficie con AgNPs ( $0.137 \mu$ ) comparado con  $\text{TiO}_2\text{NPs}$  ( $0.151 \mu$ ).



**Figura 18.** Imágenes AFM (Fase arriba, altura abajo) de superficie de PMMA a) control, b) AgNPs, c) TiO<sub>2</sub> se muestra *Ra* de los 3 grupos.

Para la determinación de espesor de película fue necesario realizar los recubrimientos sobre placas de sílice de 1 cm<sup>2</sup>, con la finalidad de obtener una clara diferencia entre los materiales, debido a lo complicado de su análisis sobre placas de PMMA debido a la naturaleza del material. Se obtuvo valor Z (promedio de altura entre picos) donde se muestra valores de 178.7 nm (AgNPs) y 205.0 nm (TiO<sub>2</sub>NPs).

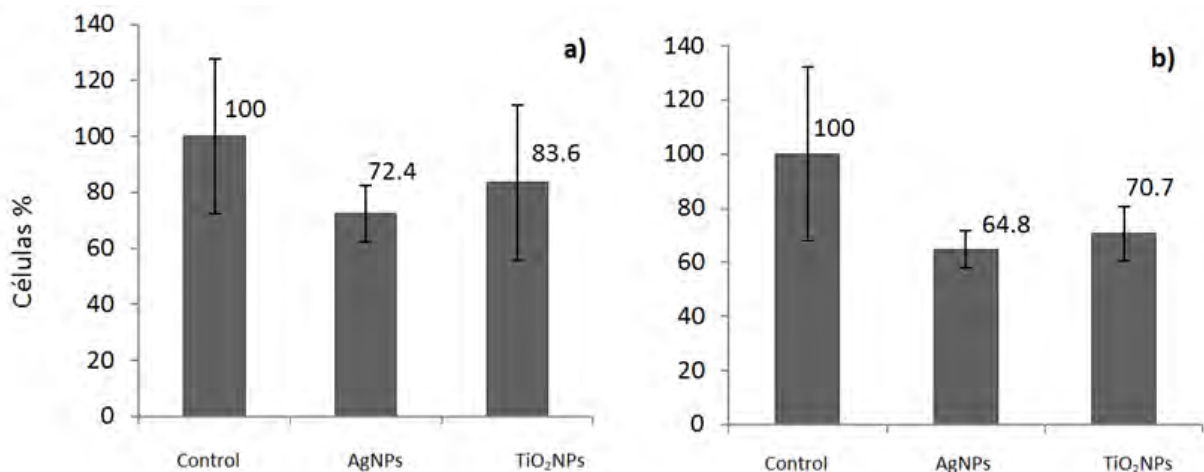


**Figura 19.** Imágenes mediante AFM se muestra valor *Ra* y *Z* de las superficies de placas de sílice con a) AgNPs y b) TiO<sub>2</sub>NPs. Espesor de película aproximado menor a 205 nm.



### Adhesión de *C. albicans*

Se determinó la adhesión mediante análisis fotométrico, a 590 nm y se expresa en porcentaje de células. La D.O. a 24 h de cada grupo las fue: grupo control (0,12); AgNPs (0,08) y TiO<sub>2</sub>NPs (0,09); mientras que la D.O. a las 48 h fue: grupo control (0,15); AgNPs (0,09) y TiO<sub>2</sub>NPs (0,10). ANOVA de Una Vía y prueba Tukey post hoc se aplicaron a los resultados y muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control con AgNPs y TiO<sub>2</sub> (P <0,001) en ambos casos, pero no hay diferencias existen entre AgNPs y grupos de TiO<sub>2</sub>NPs (P= 0.870 / 24h, P= 0.96 / 48h) se aplicó a los resultados (n= 180).



**Figura 20.** Adhesión de *C. albicans* a) 24 h, muestra menor adhesión con la presencia de AgNPs comparado con TiO<sub>2</sub> y con el control, b) 48 h, se puede ver que el grupo Ag sigue presentando menor adhesión que TiO<sub>2</sub>NPs aunque los valores se han aproximado.



## Liberación de Ag / TiO<sub>2</sub> NPs

Se determinó la concentración en ppb mediante Inducción por Pasma Acoplado (ICP) de cada patrón multielemental, se determinó el contenido real en ng/g (ICP solución patrón multielementos IV(23 elementos en ácido nítrico diluido) Certipur® y ICP solución patrón de calibración multielemento, 26 elementos Sharlau®.en dilución 1 a 10 de saliva artificial para realizar el análisis mediante la comparación entre los contenidos de material inorgánico de las muestras. Para Ag y TiO<sub>2</sub> NPs se utilizó la masa sugerida 107 y 49 respectivamente.

<b>Recta Ag (Merck) desde 1000 ppm</b>			
ppb	Inicial	Final	[real] ng/g
Concentración del patrón multielemental			1000000
10000	0.1147	10.0194	11447.7913
1000	1.0053	10.0342	1146.9240
500	5.0185	10.0132	574.8250
100	1.0171	10.004	116.6070
50	0.5142	10.0233	58.8377
10	0.1017	10.0302	11.6291
5	1.0054	10.0185	5.9046
1	0.2223	10.044	1.3022

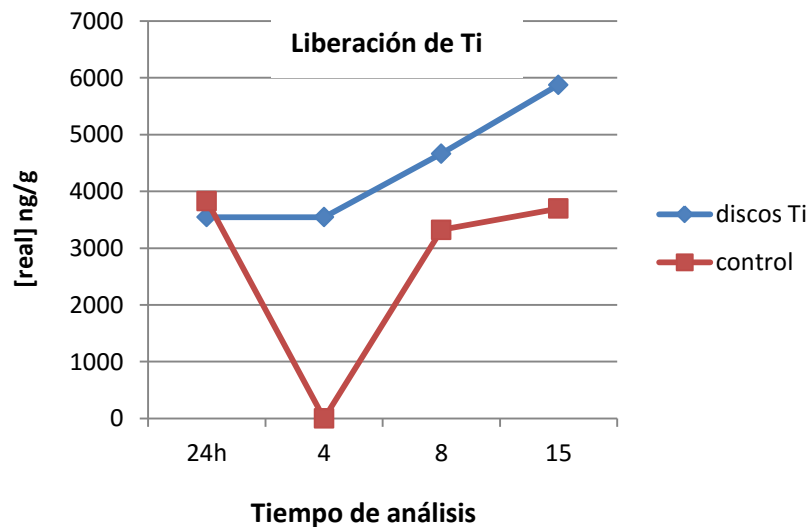
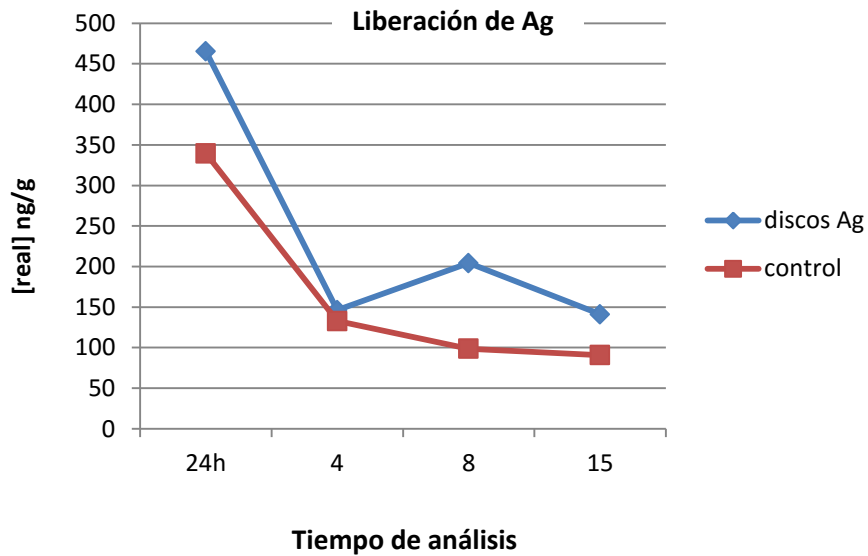
  

<b>Recta Ti (Scharlau) desde 100 ppm</b>			
ppb	Inicial	Final	[real] ng/g
Concentración del patrón multielemental			100000
1000	0.1005	10.029	1002.0939
500	5.0025	10.0068	500.9568
100	1.0009	10.0089	100.2104
50	0.5196	10.0204	51.9628
10	0.1145	10.0109	11.4615
5	1.0134	10.0051	5.2632
1	0.2041	10.0227	1.0582

**Tabla 5 .** Concentración de los patrones multielementales (10%) de Ag y Ti, utilizados como referencia para el análisis del contenido de material inorgánico en medio simulante de saliva para el análisis mediante ICP-MS.



Se analizó muestra de saliva que contenía los discos con recubrimiento en diferentes tiempos; 24 horas: 4,8 y 15 días de exposición, las muestras fueron almacenadas en oscuridad a 37° C previamente al análisis. Muestra de saliva con discos sin recubrimiento fueron considerados como control. Todas las muestras fueron analizadas al 10%.  $R^2=0.977$ .



**Grafica 1** . Análisis mediante ICP-MS de saliva artificial que permaneció en diferentes tiempos de exposición discos con recubrimiento de Ag y TiO<sub>2</sub> NPs. Se observa que existe liberación estadísticamente no significativa.





## Discusión

En los últimos años, la nanotecnología se ha aplicado a la ciencia médica con el fin de desarrollar nuevos materiales que mejoren las condiciones de la utilización de prótesis y su respuesta a las características del cuerpo humano, principalmente, se propone prevenir o reducir las infecciones por bacterias, virus y hongos. Algunos metales se han estudiado en sus versiones a nano escala como la plata y otros, tales como dióxido de titanio, que ha mostrado una actividad biológica en diversos microorganismos. Cio y Liu<sup>75</sup> informaron efecto antimicrobiano significativo en experimentos con nanopartículas de plata en células procariotas, sin embargo, hay pocos estudios que informan sobre su comportamiento en células eucariotas, incluso cuando éstas pueden dar origen a diversas patologías; un ejemplo son las infecciones por diferentes especies *Candida*, entre las más frecuentes en cavidad oral se encuentra *C. albicans que está* directamente asociada a estomatitis subprotésica.

Allaker y Memarzadeh en 2014<sup>52,10</sup> describen actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata en estado coloidal así como Monteiro en 2011<sup>52</sup> informó actividad biológica de resinas acrílicas que contenían nanopartículas de plata en su matriz obteniendo una disminución del 23% de la biomasa formada de *C. albicans* en 24 h y 47,2% a las 48 h. En el presente estudio, los AgNPs también mostraron actividad biológica cuando se utilizaron como recubrimiento sobre PMMA experimental.

La incorporación de TiO<sub>2</sub>NPs en matrices poliméricas se ha estudiado en diversos países; Sodagar Ahmad<sup>77</sup> muestra que la incorporación de estas nanopartículas en una matriz de polimetacrilato de metilo (PMMA) mejora significativamente sus propiedades mecánicas. Zielińska-Jurek<sup>78</sup> propone el uso de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> como material de revestimiento para la superficie debido a sus propiedades fotocatalíticas y su interacción con diferentes microorganismos lo cual se retoma en el presente estudio corroborando su actividad antimicrobiana en especies *Candida*.

La conjunción de ambos metales en la formación de nanopartículas bimetálicas son una opción para estos materiales Liu en 2012<sup>s79</sup> realiza un estudio usando Ag/ TiO<sub>2</sub> sobre PMMA mediante técnica “pellicle-sticking” o formación de película adherente en contra de la proliferación de



especies *Saccharomyces albicans* encontrando que se inhibió hasta un 91.2% con una concentración de Ag-TiO<sub>2</sub> de 2.5% se observa de manera efectiva la inhibición del microorganismo con el agente antibacteriano Ag-TiO<sub>2</sub>, para este estudio se realizaron pruebas individuales en especie *C. albicans* de actividad antimicrobiana de PMMA que contenía una película delgada en su superficie mediante “Spin coating”, obteniendo resultados favorables para ambos casos.

Lazarina Azevedo (2013) lleva a cabo un estudio con diferentes tipos de resinas acrílicas para base de la prótesis y propone revestimientos experimentales: metacrilato de 2-hidroxietilo; 3-hidroxipropil metacrilato y 2-trimetilamonio sulfobetaina metacrilato de cloruro de metacrilato de etilo para contrarrestar la adhesión obtenida para *C. albicans* y el cambio en la adhesión debido a la rugosidad de la superficie, concluyen que la composición química de la superficie de esta resina de tipo es crucial para miembros de la familia de unión de *Candida* y una modificación en la interacción química de la superficie y los microorganismos son cruciales en la determinación de adherencia<sup>15</sup>, por lo que en este estudio se proponen revestimientos AgNPs y TiO<sub>2</sub> para ser considerado como una alternativa para la disminución de rugosidad de la superficie y de ese modo reducir la infección por la especie; con los resultados presentados muestran por análisis de AFM aparente disminución de la rugosidad de la superficie de PMMA cuando se recubrió con nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y de Ag, en comparación con PMMA sin recubrimiento, lo que conduciría a tener una adhesión microbiana inferior, lo que combinado con el efecto antimicrobiano que contribuye a estas nanopartículas tienen el potencial de reducir el riesgo en pacientes que presentan la estomatitis por *C. albicans*.

Jin et al. en 2011<sup>80</sup> realizó un estudio utilizando células HaCaT (queratocitos humanos) y ha sugerido que la fase anatasa de las TiO<sub>2</sub> NPs presenta una mayor toxicidad con respecto a sus otras fases cristalinas, sin embargo la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasifica este material como 2B, es decir, baja probabilidad cancerígena lo cual concuerda con los datos obtenidos para este estudio en el tamaño aproximado de 8 nm de TiO<sub>2</sub> NPs que no muestra toxicidad para células 3T3, no obstante no se descarta la posibilidad de que en otros tamaños presenten algún efecto adverso.



---

Las Ag NPs analizadas en este estudio se encuentran en un promedio de tamaño de 40 nm, en 2011 Margriet et, al. realiza un estudio para determinar la relación entre el tamaño de nanopartícula y su efecto citotóxico con AgNPs esféricas de diámetros entre 20 y 100 nm adjudicando mayor toxicidad en los diámetros inferiores, en este estudio se aporta que el diámetro utilizado no mostro actividad toxica para el tipo celular utilizado.



## Conclusiones

Se aceptó y se consideró satisfactoria la hipótesis de este estudio.

Se obtuvieron AGNPS y nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ , con actividad biológica en la inhibición de *C. albicans*. Ambos tipos de nanopartículas ensayadas no mostraron citotoxicidad que podría ser considerada para su incorporación en los materiales dentales. La rugosidad de la superficie de los AgNPs de PMMA recubiertos y  $\text{TiO}_2$  se comparó inferior con el grupo sin revestir, además, acrílico revestido mostró menor adhesión de los microorganismos, principalmente el grupo con recubrimiento de AgNPs. Al análisis de liberación de NPs no se encontraron diferencias significativas para ambos casos, se recomienda un estudio que supere los 30 días de análisis.

El compuesto obtenido en este trabajo es experimental y tiene excelentes resultados en línea con la meta; se sugiere que los estudios anteriores de su posible aplicación clínica.

La Nanociencia y la Nanotecnología son campos fascinantes que están impactando en forma notable la vida diaria. Conocer con relativa profundidad sobre nanoestructuras que interactúan con nosotros en productos como, protectores solares, plásticos, talcos, y alimentos, es imperativo conocer su nivel de toxicidad. Particularmente en la ingesta de nanoestructuras, aún falta que se realice más investigación en las estructuras que se han estudiado hasta el momento y es necesario incluir algunas otras con potencialidad de ser absorbidas y acumuladas en el organismo. Asimismo, es importante que se realice una mayor divulgación científica sobre los resultados que se han obtenido: solo así, se tendrá la confianza suficiente en los productos comerciales que actualmente utilizan la nanotecnología.

## Limitaciones y proyecto a futuro

Los estudios Es importante destacar que este estudio tiene algunas limitaciones que pueden ser importantes, centra principalmente que existe variabilidad en el medio de dispersión de nanopartículas, un entorno diferente al que se utiliza en este estudio podría proporcionar información útil, se recomienda en otros medios de comunicación también llevar a cabo estudios *in vivo* para reforzar los resultados obtenidos. Llevar a cabo estudios para determinar la durabilidad del efecto de la capa de PMMA con nanopartículas de plata y el dióxido de titanio en



una segunda etapa de esta investigación y que, debido a su análisis está sujeto a la disponibilidad de tiempo requiere un estudio período más largo.



## 6 References

1. Melo, M. A. S., Guedes, S. F. F., Xu, H. H. K. & Rodrigues, L. K. A. Nanotechnology-based restorative materials for dental caries management. *Trends in Biotechnology* **31**, 459–467 (2013).
2. Sakaguchi, R. L. & Powers, J. M. *Craig's Restorative Dental Materials. Craig's restorative dental materials* (2012). doi:10.1038/sj.bdj.2012.659
3. Gasparyan, V. Preparation and application of various nanoparticles in biology and medicine. *Nanotechnol. Dev.* **3**, 2 (2013).
4. Nanda, A. & Saravanan, M. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **5**, 452–456 (2009).
5. Ramalingam, V. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles from deep sea bacterium *Pseudomonas aeruginosa* JQ989348 for antimicrobial, antibiofilm, and cytotoxic activity. *J. Basic Microbiol.* **54**, 928–936 (2014).
6. Lee, C. *et al.* Bactericidal effect of zero-valent iron nanoparticles on *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 4927–4933 (2008).
7. Wady, A. F. *et al.* Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. *J. Appl. Microbiol.* **112**, 1163–1172 (2012).
8. Tavares, M., Lindefjeld Calabi, K. A. & San Martin, L. Systemic diseases and oral health. *Dental Clinics of North America* **58**, 797–814 (2014).
9. Gou, J., Zhuge, J. & Liang, F. in *Manufacturing Techniques for Polymer Matrix Composites (PMCs)* 95–119 (2012). doi:10.1533/9780857096258.1.95
10. Allaker, R. P. The Use of Nanoparticles to Control Oral Biofilm Formation. *J. Dent. Res.* **89**, 1175–1186 (2010).
11. Frazer, R. Q., Byron, R. T., Osborne, P. B. & West, K. P. PMMA: an essential material in medicine and dentistry. *J. Long. Term. Eff. Med. Implants* **15**, 629–639 (2005).
12. Jaikumar, R. A. *et al.* Comparison of flexural strength in three types of denture base resins: An in vitro study. *J Pharm Bioallied Sci* **7**, S461-4 (2015).



13. Vallittu, P. K. Interpenetrating Polymer Networks (IPNs) in Dental Polymers and Composites. *J. Adhes. Sci. Technol.* **23**, 961–972 (2009).
14. Kawaguchi, T., Lassila, L. V. J., Sasaki, H., Takahashi, Y. & Vallittu, P. K. Effect of heat treatment of polymethyl methacrylate powder on mechanical properties of denture base resin. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **39**, 73–78 (2014).
15. Bollenl, C. M. L., Lambrechts, P. & Quirynen, M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature. *Dent. Mater.* **13**, 258–269 (1997).
16. Gadelmawla, E. S., Koura, M. M., Maksoud, T. M. A., Elewa, I. M. & Soliman, H. H. Roughness parameters. *J. Mater. Process. Technol.* **123**, 133–145 (2002).
17. Yamauchi, M., Yamamoto, K., Wakabayashi, M. & Kawano, J. In vitro adherence of microorganisms to denture base resin with different surface texture. *Dent. Mater. J.* **9**, 19–24 (1990).
18. Pereira, T., Del Bel Cury, A. A., Cenci, M. S. & Rodrigues-Garcia, R. C. M. In vitro Candida colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int. J. Prosthodont.* **20**, 308–10 (2007).
19. Santos, M., Soo, S. & Petridis, H. The effect of Parylene coating on the surface roughness of PMMA after brushing. *J. Dent.* **41**, 802–808 (2013).
20. Arenas, M. C., Fuente-hernández, J. De, Cajero-juárez, M. & Castaño, V. M. Nanopigmented Acrylic Resin Cured Indistinctively by Water Bath or Microwave Energy for Dentures. **2014**, (2014).
21. Rosaura, M. & Romer, R. Los fundamentos anatómicos básicos para el éxito del tratamiento en prótesis totales. *ODOUS Cient.* **VIII**, 45–56 (2007).
22. Actico, S. *et al.* Content obtained by microemulsion polymerization using different surfactants. (2011).
23. Susewind, S., Lang, R. & Hahnel, S. Biofilm formation and Candida albicans morphology on the surface of denture base materials. *Mycoses* **58**, 719–727 (2015).
24. Webb, B. C., Thomas, C. J. & Willcox, M. D. P. C a n d i d a - a s s o c i a t e d denture stoma t i t i s . Aetiology and m a n a g e m e n t : A r e v i e w . P a r t 2 . Oral diseases



- caused by candida species. (1998).
25. Salerno, C. *et al.* Candida-associated denture stomatitis. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **16**, (2011).
  26. Budtz-Jørgensen, E. Ecology of Candida-associated Denture Stomatitis. *Microb. Ecol. Health Dis.* **12**, 170–185 (2000).
  27. Thein, Z. M., Samaranayake, Y. H. & Samaranayake, L. P. Characteristics of dual species Candida biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch. Oral Biol.* **52**, 1200–8 (2007).
  28. Morishita, S. *et al.* Factors associated with older adults' need for oral hygiene management by dental professionals. *Geriatr. Gerontol. Int.* n/a-n/a (2015). doi:10.1111/ggi.12585
  29. Holmstrup, P. & Axéll, T. Classification and clinical manifestations of oral yeast infections. *Acta Odontol. Scand.* **48**, 57–59 (1990).
  30. Manuel Aguirre Urizar, J. Candidiasis orales Factores etiopatogénicos. *Rev Iberoam Micol* **19**, 17–21 (2002).
  31. Williams, D. & Lewis, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *Journal of Oral Microbiology* **3**, (2011).
  32. Schliemann-Willers, S., Wigger-Alberti, W., Wollina, U. & Elsner, P. [Mucocutaneous candidosis in a patient with Sjögren syndrome]. *Z. Rheumatol.* **59**, 108–11 (2000).
  33. Webb, B. C., Thomas, C. J., Willcox, M. D., Harty, D. W. & Knox, K. W. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of Candida species in the oral cavity. *Aust. Dent. J.* **43**, 45–50 (1998).
  34. Llamas, V. C. *et al.* Frecuencia de candidosis oral en portadores de prótesis dental. Aspectos clínicos y epidemiológicos. **3**, 87–91 (2005).
  35. Mayer, F. L., Wilson, D. & Hube, B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence* **4**, 119–28 (2013).
  36. Naglik, J. R., Moyes, D. L., Wächtler, B. & Hube, B. Candida albicans interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and Infection* **13**, 963–976 (2011).
  37. Indira, T. Magnetic Nanoparticles: A Review. *Int. J. Pharm.* **3**, 1035–1042 (2010).





38. Kreuter, J. Nanoparticles-a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics* **331**, 1–10 (2007).
39. Taniguchi, N. & Others. On the basic concept of nanotechnology. *Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, Japan Soc. Precis. Eng.* 18–23 (1974). doi:10.1063/1.2836271
40. Feynman, R. & Leighton..., R. The Feynman Lectures on Physics including Feynman's Tips on Physics: The Definitive and Extended Edition. *citeulike.org* (2005). doi:citeulike-article-id:2796235
41. Drexler, K. E. *Engines of creation 2.0." The Coming Era of Nanotechnology. Anchor Books- Doubleday* (2006). doi:EB I DREX
42. Kroto, H. W., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F. & Smalley, R. E. © 1985 Nature Publishing Group. *Nature* **318**, 162–163 (1985).
43. Iijima, S. © 1991 Nature Publishing Group. *Nature* **354**, 56–58 (1991).
44. Burstein, E. A major milestone in nanoscale material science: The 2002 Benjamin Franklin Medal in Physics presented to Sumio Iijima. *Journal of the Franklin Institute* **340**, 221–242 (2003).
45. Terrones, M. *et al.* Graphene and graphite nanoribbons: Morphology, properties, synthesis, defects and applications. *Nano Today* **5**, 351–372 (2010).
46. Gong, P. *et al.* Preparation and antibacterial activity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Ag nanoparticles. *Nanotechnology* **18**, 285604 (2007).
47. Rai, M., Yadav, A. & Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* **27**, 76–83 (2009).
48. Peláez, R. J., Rodríguez, C. E. & Afonso, C. N. Expanding the plasmonic response of bimetallic nanoparticles by laser seeding. *Nanotechnology* **27**, 105301 (2016).
49. Pacheco-Blandino, I., Vanner, R. & Buzea, C. in *Toxicity of Building Materials* 427–475 (2012). doi:10.1016/B978-0-85709-122-2.50015-2
50. Shinde, S. K. *et al.* Toxicity induced by nanoparticles. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* **2**, 331–334 (2012).
51. Fard, J. K., Jafari, S. & Eghbal, M. A. A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. *Tabriz Univ. Med. Sci.* **5**, 447–454 (2015).



52. Allaker, R. P. & Memarzadeh, K. Nanoparticles and the control of oral infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* **43**, 95–104 (2014).
53. Collart, D., Kepner, B., Mehrabi, S., Robinson, L. & Mintz, E. A. Efficacy of oligodynamic metals in the control of bacteria growth in humidifier water tanks and mist droplets. *J. Water Health* **4**, 149–156 (2006).
54. Curtarolo, S., Morgan, D. & Ceder, G. Accuracy of ab initio methods in predicting the crystal structures of metals: A review of 80 binary alloys. *Calphad: Computer Coupling of Phase Diagrams and Thermochemistry* **29**, 163–211 (2005).
55. Sanford, J. & Venkatapathy, R. State of the Science Literature Review : Everything Nanosilver. *U.s.enviromental Prot. Agency* (2010).
56. Armitage, S. A., White, M. A. & Wilson, H. K. The determination of silver in whole blood and its application to biological monitoring of occupationally exposed groups. *Ann. Occup. Hyg.* **40**, 331–338 (1996).
57. Drake, P. L. & Hazelwood, K. J. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: A review. *Annals of Occupational Hygiene* **49**, 575–585 (2005).
58. Pal, S., Tak, Y. K. & Song, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **290**, 1712–1720 (2015).
59. Lok, C.-N. *et al.* Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J. Biol. Inorg. Chem.* **12**, 527–534 (2007).
60. Gupta, S. M. & Tripathi, M. A review of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Chinese Science Bulletin* **56**, 1639–1657 (2011).
61. Trouiller, B., Reliene, R., Westbrook, A., Solaimani, P. & Schiestl, R. H. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res.* **69**, 8784–8789 (2009).
62. Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K. & von Goetz, N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 2242–50 (2012).
63. Estvez, M. *et al.* Novel wear resistant and low toxicity dental obturation materials.



- Mater. Lett.* **61**, 3025–3029 (2007).
64. Welch, K., Cai, Y., Engqvist, H. & Strömme, M. Dental adhesives with bioactive and on-demand bactericidal properties. *Dent. Mater.* **26**, 491–499 (2010).
  65. Lino, M. M., Paulo, C. S. O., Vale, A. C., Vaz, M. F. & Ferreira, L. S. Antifungal activity of dental resins containing amphotericin B-conjugated nanoparticles. *Dent. Mater.* **29**, (2013).
  66. Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. & Dewhirst, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5721–5732 (2005).
  67. Rudney, J. D. *et al.* A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 1540–1553 (2012).
  68. Wang, Z., Shen, Y. & Haapasalo, M. Dental materials with antibiofilm properties. *Dental Materials* **30**, (2014).
  69. AL-Dwairi, Z. N., AL-Quran, F. A. & AL-Omari, O. Y. The effect of antifungal agents on surface properties of poly(methyl methacrylate) and its relation to adherence of *Candida albicans*. *J. Prosthodont. Res.* **56**, 272–280 (2012).
  70. Hahnel, S. *et al.* Influence of saliva substitute films on the initial adhesion of *Candida albicans* to dental substrata prior to and after artificial ageing. *Arch. Oral Biol.* **55**, 391–396 (2010).
  71. Lee, C. J., Lee, M. S. & Nam, K. Y. Inhibitory effect of PMMA denture acrylic impregnated by silver nitrate and silver nano-particles for *Candida albicans*. *J. Korean Chem. Soc.* **52**, 380–386 (2008).
  72. Monteiro, D. R. *et al.* Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling* **27**, 711–719 (2011).
  73. Teresa, G. Nanopartículas con efecto antifúngico en prótesis dentales. **7**, 1101–1112 (2012).
  74. Wang, Q., Wang, X., Li, X., Cai, Y. & Wei, Q. Surface modification of PMMA/O-MMT composite microfibers by TiO<sub>2</sub> coating. *Appl. Surf. Sci.* **258**, 98–102 (2011).
  75. Cao, H., Liu, X., Meng, F. & Chu, P. K. Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects. *Biomaterials* **32**, 693–705 (2011).



76. Semaltianos, N. G. Spin-coated PMMA films. *Microelectronics J.* **38**, 754–761 (2007).
77. Sodagar, A., Bahador, A., Khalil, S., Shahroudi, A. S. & Kassaei, M. Z. The effect of TiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> nanoparticles on flexural strength of poly (methyl methacrylate) acrylic resins. *J. Prosthodont. Res.* **57**, 15–9 (2013).
78. Zielinska-Jurek, A. Progress, challenge, and perspective of bimetallic TiO<sub>2</sub>-based photocatalysts. *J. Nanomater.* **2014**, (2014).
79. Liu, J., Ge, Y. & Xu, L. [Study of antibacterial effect of polymethyl methacrylate resin base containing Ag-TiO<sub>2</sub> against *Streptococcus mutans* and *Saccharomyces albicans* in vitro]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **30**, 201–5 (2012).
80. Jin, C. *et al.* Cellular toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in anatase and rutile crystal phase. *Biol. Trace Elem. Res.* **141**, 3–15 (2011).



## Anexox

CLÍNICA DE PROSTODONCIA

16 de febrero de 2015



### **ENSAYO PARA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN PACIENTES PORTADORES DE PRÓTESIS DENTALES CON POTENCIALES ASOCIACIONES A ESTOMATITIS SUBPRÓTESICA Y CANDIDIASIS ORAL.**

Con el propósito de identificar los microorganismos presentes en pacientes portadores de prótesis dentales con posibles asociaciones a estomatitis subprotésica y candidiasis oral se estableció el siguiente ensayo.

Previamente a la toma de muestra se debe contar con el siguiente material estéril:

- Kit de transporte o solución Stuart
- Rejilla para tubos
- Caja de unicef para transporte de muestra
- Bolsas de con gel frío para el mantenimiento de la muestra

#### Procedimiento

- Se realizará la entrega del consentimiento informado por escrito a los pacientes antes de iniciar la toma de muestra.
- La toma de muestra deberá realizarse bajo condiciones de asepsia posibles, para ello el material requerido se debe colocar a una altura similar al paciente en una mesa de apoyo o base pasando antes una gasa humedecida en alcohol y lo más cerca posible al paciente.
- Se utilizarán guantes estériles y gafas de protección en todo momento durante la toma de la muestra.
- Se tomará la muestra de la mucosa oral con presencia de lesiones rojizas o blancas del paciente principalmente zonas con estrecho contacto con la prótesis dental con ayuda de kit Stuart (véase figura 1), evitando que el hisopo tenga contacto en otra zona de la cavidad bucal.
- El tubo deberá rotularse adecuadamente\* y sellarse con parafilm para su transporte inmediato al laboratorio, mantener la muestra en caja de unicef.
- Se procederá a realizar el cultivo de las muestras obtenidas en un plazo no mayor a las 3 horas después de haber obtenido la muestra.
- Se analizarán los resultados.



Nota (\*): Se deberán colocar los siguientes datos en el tubo.

Nombre de paciente, No. De identificación del paciente, fecha, hora de recolección de muestra.

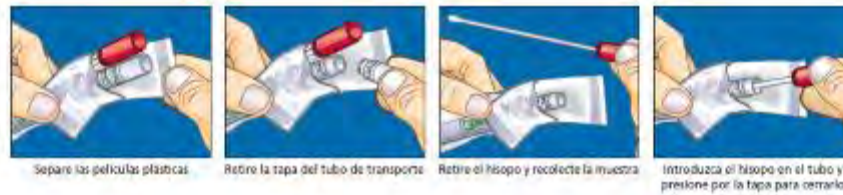


Figura 1. Procedimiento para toma de muestra con kit de solución Stuart.



### Protocolo para la elaboración de saliva artificial

#### Procedimiento

1. Para la obtención de 1 L de saliva artificial utilizar las siguientes cantidades<sup>1</sup>:

Cloruro de magnesio $MgCl_2$	0.17 g
Cloruro de calcio $CaCl_2$	0.15 g
Cloruro de sodio $NaCl$	0.33 g
Cloruro de potasio $KCl$	0.75 g
Fosfato de Potasio $K_3PO_4$	0.75 g
Carbonato de Potasio $K_2CO_3$	0.53 g

2. Disolver en 900 mL de agua destilada las cantidades de reactivos iniciando con las sales de magnesio y calcio. Posteriormente el resto de los cloruros y al final Fosfato de Potasio y Carbonato de Potasio.
3. Medir el valor de pH. (en este punto es cercano a 10.5 pH)
4. Ajustar a 6.8- 7 pH utilizando Ácido Clorhídrico 1 M.
5. Agregar los 100 mL restantes y almacenar en frascos de cristal por máximo de 2 semanas a 8°C evitando la luz directa. No utilizar después de este periodo.

#### Bibliografía

1. Simoneau, C., Hannaert, P. & En, E. U. R. *Effect of the nature and concentration of phthalates on their migration from PVC materials under dynamic simulated conditions of mouthing.*