



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES

UNIDAD LEÓN

Título:

**Propiedades antifúngicas de un acondicionador de tejidos
enriquecido con nanopartículas**

Forma de titulación:

Tesis

Que para obtener el título de:

Licenciado en Odontología

P r e s e n t a:

ROSA GUADALUPE TORRES ROSALES



Tutora: Dra. Ma Concepción Arenas Arrocena

Asesora: Mtra. Edna Pamela Vilchis Valadez

Asesora: Mtra. Paloma Serrano Díaz

LEÓN GUANAJUATO, 2023



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de pertenecer y crecer en la máxima casa de estudios.

A la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León por permitirme crecer y convertirse en mi segundo hogar, cada minuto dentro de este maravilloso lugar valió la pena.

A la Dra. Ma. Concepción Arenas por ser mi tutora y por brindarme de su tiempo y apoyo.

A la Mtra. Paloma Serrano Díaz por ayudarme y ser mi luz cuando creí que no se podía más.

A la Mtra. Edna Pamela Vilchis Valadez, por ser mi asesora y ser parte fundamental de este proyecto.

A todos los que forman parte del laboratorio de Biomateriales por estar siempre disponible a brindarme su apoyo.

A mis profesores que fueron parte fundamental para llegar hasta aquí por sus enseñanzas y su paciencia.

A la Dra. Lourdes Palma Tirado del INB-UNAM por las mediciones de TEM, Dra. Marina Vega González del CGeo-UNAM por las mediciones en SEM.

Al proyecto PAPIIT-DGAPA IN112921 por el financiamiento para la realización de este proyecto de tesis.

Dedicatorias

-A Dios por darme la oportunidad de estar aquí cumpliendo un sueño más en mi corta vida

-Al universo por ponerme justo en el lugar y en el momento que debo estar

-A mis padres Ma· Saby y Fernando Esteban por ser mi pilar, por no dejarme sola en ningún momento, pero sobre todo por demostrarme que son el claro ejemplo de que todo es posible y por ser mi inspiración día con día para poder ser mejor persona·

-A mis hermanos Fernando, Josseline e Isaac por ser mis compañeros de vida y alentarme cada día para llegar a ser un poquito de lo fregones que son cada uno en lo que hacen·

-A ti mi Oscar, mi corazón, gracias por confiar en mí y en mis capacidades, por estar justo cuando te necesito, en este camino y por ser mi motivación día con día para poder estar juntos en muchos logros más·

-A mis amigos de la universidad que se convirtieron en mi familia por elección y quienes día a días nos acompañamos, en la buenas y en las no tan buenas·

RESUMEN

Introducción: El uso de prótesis totales y de acondicionadores de tejidos se han convertido en parte importante para sobrellevar la calidad de vida de los pacientes de edad avanzada.

Objetivo: Evaluar el efecto antifúngico de un acondicionador de tejidos (Softy) adicionado con nanopartículas de sulfuro de plata (Ag_2S) sobre *Candida albicans*.

Materiales y métodos: Las nanopartículas de Ag_2S fueron obtenidas por una síntesis química asistida con ultrasonido y fueron adicionadas al acondicionador de tejidos a diferentes concentraciones (0%, 1%, 2%, 4%). Posteriormente, se obtuvieron muestras en disco con un diámetro de 5.5 mm y 1 mm de espesor. Se realizó un ensayo de difusión en agar en donde se sembró *Candida albicans* y se agregaron las muestras en disco, considerando como control negativo el disco al 0% de Ag_2S y como control positivo discos de Anfotericina B. También se realizó un ensayo de microdilución en donde se agregaron los discos a diferentes concentraciones de Ag_2S en cada pocillo de la microplaca y como control negativo se utilizó únicamente el medio RPMI. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía con un valor $p < 0.05$ y se aplicó la prueba Post-Hoc Tukey test.

Resultados: El ensayo de difusión en agar no muestra diámetros de inhibición, pero tampoco se visualiza un crecimiento debajo y encima de los discos de acondicionador de tejidos adicionados con nanopartículas de Ag_2S , es decir, solo existe un efecto fungistático, mientras que los resultados del ensayo de microdilución se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control negativo y los grupos al 1%, 2% 4% de Ag_2S .

Conclusión: Nanopartículas de Ag_2S fueron sintetizadas exitosamente por síntesis química asistida con ultrasonido y fueron mezcladas con un acondicionador de tejidos Softy. Las muestras presentan un efecto antifúngico contra *candida albicans*, indicativo de que el sulfuro de plata puede ser un buen candidato para tratamientos antifúngicos para la candidiasis oral.

Palabras Clave: *Candida albicans*, acondicionador de tejidos, nanopartículas, Ag₂S, difusión en Agar, microdilución.

ABSTRACT

Introduction: The use of total dentures and the tissue conditioners have become an important part of coping with the quality of life of elderly patients.

Objective: To evaluate the antifungal effect of a soft liner (Softy) added with nanoparticles of silver sulfide (Ag₂S) on *Candida albicans*.

Materials and methods: Ag₂S nanoparticles were obtained by ultrasound-assisted chemical synthesis, and they were added into a soft liner at different concentrations (0%, 1%, 2%, 4%). Subsequently, disk samples with a diameter of 5.5 mm and 1 mm thickness were obtained. A diffusion assay was performed in agar where *Candida albicans* was sown and the samples were added to the disk, considering the 0% Ag₂S disk as a control (-) and Amphotericin B discs as a control (+). A microdilution assay was also performed with the discs at different concentrations of Ag₂S in each well of the microplate and only the RPMI medium was improved as a negative control. The results were statistically analyzed by using one-way ANOVA with a $p < 0.05$ value and the Post-Hoc Tukey test was applied.

Results: The agar diffusion assay does not show inhibition diameters, but growth under and above the tissue conditioner discs added with Ag₂S nanoparticles was not observed either, that is, there is only a fungistatic effect, while the results of the microdilution assay, statistically significant differences were found between the negative control and the 1%, 2%, and 4% Ag₂S groups.

Conclusion: Ag₂S nanoparticles were successfully synthesized by ultrasound-assisted chemical synthesis and mixed with Softy tissue conditioner. The samples show an antifungal effect against *candida albicans*, indicating that silver sulfide may be a good candidate for antifungal treatments.

Keywords: *Candida albicans*, soft liner, nanoparticles, Ag₂S, diffusion in agar, microdilution.

Índice

Agradecimientos.....	- 2 -
Dedicatorias.....	- 3 -
Resumen.....	-4-
Introducción.....	-8-
1.Marco teórico.....	- 10 -
1.1Nanotecnología, nanomateriales y nanopartículas	- 10 -
1.2 Sulfuro de plata.....	- 11-
1.3 Nanopartículas de sulfuro de plata.....	- 12 -
1.4 <i>Candida albicans</i>	- 13 -
1.5 Candidiasis oral.....	- 14 -
1.6 Estomatitis protésica.....	- 15 -
1.7 Acondicionadores de tejido.....	- 16 -
1.8 Ensayos de susceptibilidad antifúngica.....	- 18 -
1.9 Técnicas de caracterización de nanomateriales.....	- 20 -
2. Antecedentes.....	- 26 -
3. Materiales y métodos.....	- 30-
3.1 Planteamiento del problema.....	- 30 -

3.2. Justificación.....	- 31 -
3.3. Hipótesis.....	- 31 -
3.4. Objetivo general.....	- 32 -
3.5 Diseño de la investigación.....	- 32 -
4. Metodología experimental.....	-35-
5. Resultado.....	- 50-
6. Discusión.....	- 61 -
7. Conclusión.....	- 65 -
8. Referencias.....	- 66-
Anexos.....	- 75 -

INTRODUCCIÓN

Con el envejecimiento de las personas de edad avanzada, comienzan ciertos cambios en su cuerpo, como la falta de audición, la disminución de la vista, la pérdida de piezas dentales, entre otros. Las prótesis totales acrílicas han sido el punto clave para reponer los dientes perdidos (Deng et. Al 2021) y los materiales, como los acondicionadores de tejidos, ayudan a mejorar el uso de prótesis totales. Los acondicionadores de tejidos son revestimientos blandos de corta duración, que sirven como base temporal, para distribuir las fuerzas mecánicas durante la presencia de estomatitis protésica, evitando la irritación de los tejidos (Velazco, et. al 2009). Una de las desventajas del uso de acondicionadores de tejidos es que promueve la proliferación de bacterias y hongos como la *Candida albicans*, que forma parte de la microbiota humana, la cual coloniza de manera asintomática en el cuerpo, como el tracto gastrointestinal, el tracto reproductivo femenino, la cavidad oral y la piel que puede generar desde infecciones leves hasta infecciones severas (Gulati, et. al 2016). Una de las infecciones causadas es la Candidiasis oral, que es una enfermedad fúngica común causada por un crecimiento excesivo de *Candida albicans* en la boca (Millsop & Fazel, 2016). La Candidiasis oral se divide clínicamente en 3 tipos: formas agudas, formas crónicas y lesiones asociadas a *Candida* (Yamamoto, 2010). Hoy en día existen diversos tratamientos para evitar la proliferación de *Candida albicans*, y se ha puesto a prueba diferentes nanomateriales que ayuden a la inhibición de la misma, uno de ellos son las nanopartículas de sulfuro de plata de estructura cristalina monoclinica que han sido utilizadas en la nanoelectrónica, optoelectrónica, biofísica y en la medicina como puntos biométricos y foto luminiscentes utilizados para la visualización de por vida de órganos y tejidos o para retener fármacos en las células (Plastun, et. al, 2020). En este trabajo de titulación nanopartículas de Ag_2S serán incorporadas en un acondicionador de tejidos para conocer las propiedades antifúngicas ante *Candida albicans*.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 NANOTECNOLOGÍA: NANOMATERIALES Y NANOPARTÍCULAS

La nanotecnología es la “tecnología a escala” y tiene la capacidad de trabajar átomo por átomo para crear estructuras con organización molecular. Incluye el diseño, la caracterización, la producción y la aplicación de materiales, dispositivos y sistemas a un tamaño a nanoescala en un rango de 1 a 100 nm (Figura 1), (Ramsden, 2016).

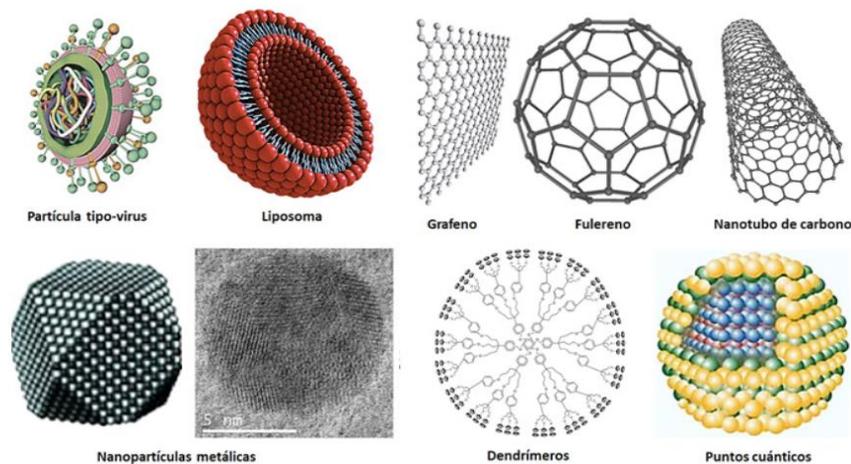


Figura 1: Representación esquemática de diferentes estructuras a nivel nanométrico. Fuente: (Muñoz, 2018)

Los nanomateriales tienen una base heterogénea de materiales, incluyendo los de base metálica, óxidos metálicos, con base de carbón, los puntos cuánticos (QDs, por sus siglas en inglés) y dendrímeros. Las propiedades de los nanomateriales son determinadas por la composición química y por propiedades morfológicas como tamaño, forma y superficie, estos parámetros pueden afectar las propiedades químicas, como reactividad, actividad fotocatalítica y propiedades energéticas. Estas propiedades hacen único a cada nanomaterial y pueden afectar su

comportamiento y llevar a diferencias en el modo de penetración celular, en el modo de acción y el nivel de toxicidad (Schwirn et. al, 2014).

Las nanopartículas se definen como un pequeño objeto que se comporta como una unidad completa con un tamaño de 1 a 100 nm y son definidas como partículas ultrafinas (Ruzer, 2017).

Las nanopartículas pueden obtenerse naturalmente (a través de fenómenos naturales como erupciones volcánicas, polvos cósmicos, entre otras) o sintéticamente. En la era moderna las nanopartículas se usan en la electrónica, en la ciencia, en la medicina para detectar y tratar enfermedades, entre otros ámbitos (Sheposh, 2021).

1.2 SULFURO DE PLATA

El sulfuro de plata (Ag_2S) es el semiconductor más utilizado además de los de los sulfuros de plomo, zinc, cadmio y cobre. Este semiconductor tiene estabilidad química y buenas propiedades ópticas, por lo que se usa ampliamente en varios campos, como agente antibacteriano, en sensores de amoníaco (NH_3) y en sensores de temperatura (Gunawan, et. al, 2022).

El Ag_2S es un calcogenuro metálico semiconductor con tres acomodos cristalográficos: monoclinico, cúbico en el cuerpo y cúbico centrado en la cara (Sadovnikoy, et. al, 2018).

El Ag_2S (Figura 2) cuenta con propiedades físicas y químicas específicas atractivas para aplicaciones fotocalíticas (Alikarami, et. al, 2022).

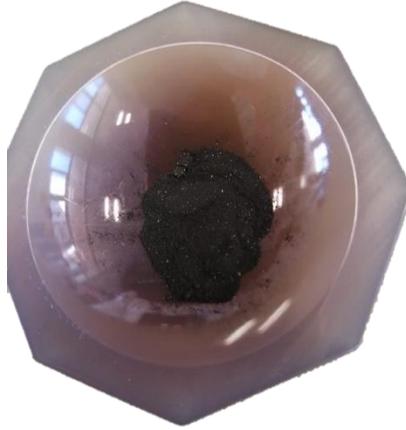


Figura 2: Polvo de sulfuro de plata (Ag_2S) en mortero de ágata. Fuente: Propia

1.3 NANOPARTÍCULAS DE SULFURO DE PLATA

Las nanopartículas de sulfuro de plata (Nps de Ag_2S) (Figura 3) con estructura monoclinica, han sido utilizadas como material funcional en varios campos como la nanoeléctrica, optoeleéctrica, sensores, fotoconductores, detectores de infrarrojos, en biofísica y en medicina, también como puntos biométricos y fotoluminiscentes utilizados para la visualización de órganos y tejidos y como medio para retener fármacos en las células (Plastun, et. al, 2020).

El Ag_2S puede ser utilizado en biomedicina debido a sus propiedades antimicrobianas contra una amplia gama de microorganismos Gram positivos y Gram negativos, así como por su baja citotoxicidad con diversas células, tales como, HCL A549 (células de cáncer de pulmón), HEP G2 (línea celular del cáncer de hígado de humano), HCT 116 (línea celular del cáncer de colon humano), entre otras (Mendoza, et. al, 2021).

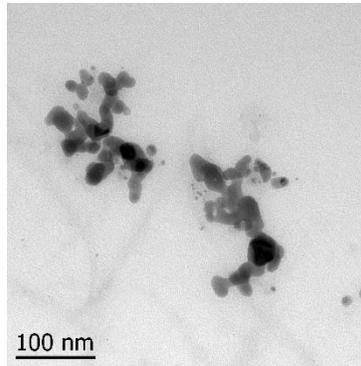


Figura 3: Imagen TEM de nanopartículas de Ag₂S. Fuente: Propia

1.4 CANDIDA ALBICANS

Candida albicans (*C. albicans*) es un hongo patógeno comensal que comúnmente coloniza la piel, el tracto gastrointestinal, la mucosa oral y la vagina (Wang, et. al, 2021).

Este hongo puede causar enfermedades que van desde infecciones superficiales de la mucosa hasta trastornos sistémicos (Wang, 2015). Se ha demostrado que las infecciones sistémicas ocasionadas por *Candida albicans* pueden conducir una tasa de mortalidad del 40% (Dadar et. al 2018).

La *C. albicans* es un miembro de la microflora humana, que se encuentra regularmente en los tractos gastrointestinales, respiratorios y genitourinarios humanos. Generalmente es un hongo comensal inofensivo que puede convertirse en un organismo oportunista en personas inmunocomprometidos o inmunodeficientes (Dadar et. al 2018).

La *C. albicans* es metabólicamente flexible y polimórfica (Figura 4) cambiando *in vivo* a formas alternativas de crecimiento vegetativo en respuesta a condiciones ambientales, disponibilidad de nutrientes, temperatura, pH, CO₂ y la presencia de suero (Gow & Yadav, 2017).

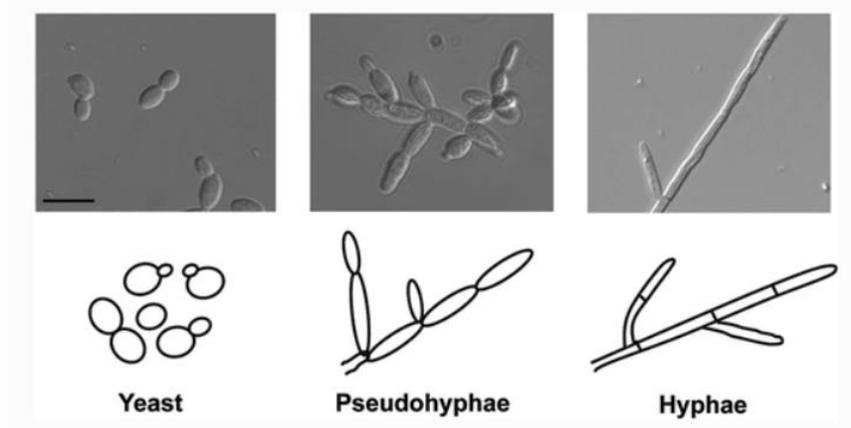


Figura 4: Levadura y morfologías filamentosas de *Candida albicans* tal como se visualizan mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC).

Fuente: (Thompson et. al, 2011)

1.5 CANDIDIASIS ORAL

Es la infección micótica más común y regularmente se observa como una infección oportunista local. Esta se divide clínicamente en 3 tipos: formas agudas, formas crónicas y lesiones asociadas a *Candida*. La multiplicación y la adhesión de la *Candida* pueden regularse por diferentes factores locales y sistémicos. Dentro de los factores locales podemos encontrar el deterioro de la integridad de la mucosa oral que generalmente se ve afectada por hiposalivación, medicamentos, radiación, prótesis totales, disminución de la población bacteriana oral y mala higiene bucal. (Yamamoto, 2010) Mientras que los factores sistémicos incluyen pacientes en quimioterapia, radioterapia (Kinkela, et. al, 2021).

La Candidiasis oral es causada por la *Candida albicans* y suele tener síntomas como inflamación de la mucosa oral, se presenta como una sensación de malestar, dolor,

eritema, erosión, alteraciones del gusto e hiperplasia de la mucosa oral (Figura 5) (Yamamoto, 2010).



Figura 5: a) Candidiasis eritematosa aguda que se presenta como un área atrófica roja en el dorso de la lengua. b) Candidiasis eritematosa crónica que se presenta como áreas rojas de la mucosa palatina. Fuente: (Lewis & Williams, 2017)

1.6 ESTOMATITIS PROTÉSICA

La estomatitis protésica es una inflamación y un proceso de cambios patológicos inflamatorios (Figura 6) de origen multifactorial en la mucosa oral y se encuentra asociada a la presencia de *Candida* y su interacción con otros factores. Los cambios clínicos que se presentan en este proceso son áreas eritematosas que se encuentran de manera característica en las zonas de soporte de una dentadura o una prótesis removible, uno de los lugares más comunes donde se puede encontrar es en la mucosa del maxilar superior (Barata et. al, 2003).



Figura 6: Representación de estomatitis protésica. Fuente: (Bengel & Bornstein, 2011)

1.7 ACONDICIONADORES DE TEJIDO

Los acondicionadores de tejido son revestimientos blandos de corta duración formados a partir de realizar una mezcla de un polímero en polvo y un plastificante líquido estos se pueden utilizar para mejorar el ajuste y la función de las prótesis totales acrílicas mal ajustada como recursos temporales; también ayuda a prevenir la irritación mecánica de la prótesis total (Dorocka-Bobkowska et. al 2017).

Esta base de prótesis total puede reducir el daño de las estructuras de soporte y mejora la estabilidad y retención de esta, puede realizarse en la misma consulta ya que la técnica es muy sencilla. La colocación de los acondicionadores de tejido funciona como un cojín para la amortiguación y la distribución de las fuerzas, se realiza con frecuencia para evitar traumatismos (Panda et. al, 2021).

El polvo del polímero utilizado en los acondicionadores de tejidos está compuesto por metacrilato de polietilo (PEMA) y el plastificante líquido es a base de un éster en etilo, es decir, es una solución de alcohol etílico sin monómero acrílico; la mezcla de ambos da como resultado una cadena de polímero y la formación de un gel caracterizado por un comportamiento viscoelástico que es aprobado para su uso clínico. También puede actuar de manera terapéutica mediante la incorporación de agentes antifúngicos y antibacterianos. Para mejorar la adhesión del acondicionador

de tejidos se recomienda que la prótesis dental tenga un grosor adecuado; también es importante mencionar que si el material es usado de manera prolongada puede conducir a la deformación y fractura de la base dental (Dorocka-Bobkowska, et. al, 2017).

Una oclusión de la prótesis bien equilibrada está destinada a minimizar los efectos adversos de los movimientos funcionales y parafuncionales mediante la amplia distribución de estas fuerzas a las áreas de soporte de la prótesis total. Los materiales blandos para revestir las prótesis totales acrílicas no solo pueden facilitar su uso, sino también eliminar por completo las sensaciones de dolor. Además, los estudios clínicos confirman que el revestimiento suave mejora significativamente la calidad de vida de los pacientes (Białożył-Bujak, et. al, 2021).

El material de revestimiento ya sea duro o blando, no debe utilizarse para compensar una prótesis mal hecha y ajustada, debe utilizarse como una herramienta sencilla para mejorar una prótesis clínicamente aceptable (García & Jones, 2004).



Figuras 7: Acondicionador de tejidos Softy. Fuente: propia

1.8 ENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA

Existen diferentes métodos para evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de un extracto o de un compuesto puro; los más comunes y básicos son la difusión en disco y dilución en caldo o agar.

1.8.1 DIFUSIÓN EN AGAR

El método de difusión en agar es el método oficial de muchos laboratorios de microbiología clínica para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos de rutina, en este método las placas de agar se inoculan con un inóculo estandarizado del microorganismo de prueba, en seguida se colocan sobre la superficie del agar discos de papel de filtro, que contiene el compuesto del ensayo con la concentración deseada y las cajas Petri se incuban en condiciones adecuadas (Balouiri et. al, 2016).

Generalmente, el agente microbiano se difunde en el agar e inhibe la germinación y el crecimiento del microorganismo de prueba, después se miden los diámetros de las zonas de inhibición (Figura 8). Este método proporciona resultados cualitativos al clasificar a las bacterias como susceptibles, intermedias o resistentes, así que es una herramienta de tipificación basada en el fenotipo de la resistencia de la cepa microbiana probada. Este método ofrece muchas ventajas, entre ellas: simplicidad, bajo costo y la cantidad a probar de una gran cantidad de microorganismos y agentes microbianos, así como la facilidad para interpretar los resultados proporcionados. La inhibición del crecimiento bacteriana (actividad bacteriostática) a través de este método no significa la muerte de una bacteria (actividad bactericida), es decir, no se puede distinguir la actividad bactericida de la actividad bacteriostática (Balouiri et. al, 2016).

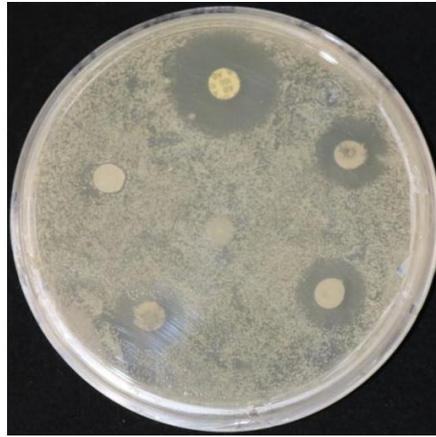


Figura 8: Zonas de inhibición de un ensayo de difusión en agar Dextrosa Sabouraud (ADS). Fuente directa

1.8.2 MÉTODOS DE DILUCIÓN

Son los más adecuados para la determinación de los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI). La micro o macrodilución en caldo es uno de los métodos de prueba de susceptibilidad antimicrobiana más básicos. El procedimiento implica preparar diluciones dobles del agente antimicrobiano. La metodología experimental para llevar a cabo con un medio de crecimiento líquido dispensado en tubos que contienen un volumen mínimo de 2 ml (macrodilución) o con volúmenes utilizando una placa de microtitulación de 96 pocillos (microdilución) (Balouiri et .al, 2016).

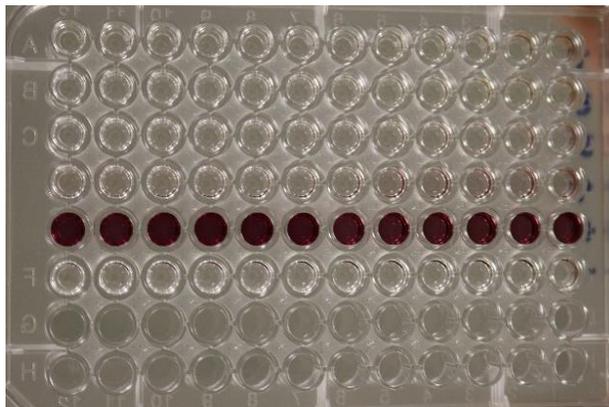


Figura 9: Placa de 96 pozos para ensayo de microdilución. Fuente: Directa

1.9 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOMATERIALES

Los nanomateriales se han utilizado en diversos tipos de industrias debido a su tamaño nanométrico, muestran diferentes características y para comprender sus propiedades se requiere el uso de varios métodos y técnicas de caracterización (Ramchander & Ragini, 2021).

El análisis de los nanomateriales se puede clasificar en métodos que abordan sus propiedades físicas, como el tamaño, forma, área superficial, carga superficial, cristalinidad, entre otras, también se pueden clasificar por su composición química y concentración que van a influir en su funcionalidad (Kranz & Mizaikoff, 2019).

Tabla 1: Tabla de técnicas de caracterización. Fuente: (Kranz & Mizaikoff, 2019)

TÉCNICA	NANOMATERIALES	INFORMACIÓN OBTENIDA
<i>Ondas electromagnéticas</i>		
Dispersión de Luz Dinámica (DLS)	Todo tipo de nanopartículas (metal, inorgánicas)	Tamaño de partícula (radio hidrodinámico).
Espectroscopia UV-Vis (UV-VIS)	Nanomateriales a base de carbono, Nanopartículas metálicas, Nanopartículas modificadas con proteínas de calcogenuro metálico	Tamaño, forma, concentración.
Transformada de Fourier IR (FTIR)	Nanoliposomas, Nanomateriales modificados, Nanopartículas de óxidos	Caracterización molecular específica de superficies.
Espectroscopia Raman	Nanomateriales a base de carbono, Nanomateriales de calcogenuro metálico, Nanomateriales de cerámica	Caracterización molecular específica de superficies.
<i>Espectroscopia basada en rayos X</i>		
XPS	Cualquier tipo de Nanomateriales y Nanomateriales modificados	Composición elemental, estado de oxidación, estructura electrónica, composición de modificación superficial.

TÉCNICA	NANOMATERIALES	INFORMACIÓN OBTENIDA
DRX	Películas finas, Nanomateriales cristalinos	Estructura cristalina, composición, tamaño de grano cristalino.
XAS	Nanopartículas de metal/óxido de metal, películas delgadas	Configuración electrónica, información sobre la estructura de corto alcance.
<i>Técnicas basadas en haces</i>		
HR-SEM	0-D, 1-D, 2-D, 3-D, estable en el vacío	Tamaño, forma, dispersión.
HR-TEM, VÁSTAGO	0-D, 1-D, 2-D, Nanomateriales 3-D adelgazados, estables en el vacío	Tamaño, forma, dispersión, composición.
<i>Microscopía de sonda de barrido</i>		
Microscopía de túnel de barrido (STM)	Nanomateriales conductores y semiconductores	Información tridimensional, densidad local de estados electrónicos.
Microscopía de fuerza atómica (AFM)	Cualquier tipo de Nanomateriales	Información tridimensional sobre tamaño, forma, morfología de la superficie, propiedades nanomecánicas.
Microscopía electroquímica de barrido (SECM)	Cualquier tipo de Nanomateriales, restricciones de tamaño dependiendo de la sonda SECM	Propiedades (electro)químicas, actividad catalítica, forma y morfología.
Microscopía óptica de barrido de campo cercano (NSOM)	Nanomateriales plasmónicos, Nanomateriales fluorescentes	Propiedades ópticas, tamaño, forma.
<i>Técnicas híbridas</i>		
TERS/Nano-FTIR	Cualquier tipo de Nanomateriales	Información molecular específica de alta resolución.
AFM-SECM, SICM-SECM, SECCM	Nanopartículas, Nanomateriales bidimensionales estructurados, Nanomateriales basados en carbono	Información topográfica electroquímica correlacionada en 3D.
<i>Espectrometría de masas</i>		
ICP-MS	Cualquier tipo de Nanomateriales	Composición elemental.

TÉCNICA	NANOMATERIALES	INFORMACIÓN OBTENIDA
SIMS, TOF-MS, MALDI, ESI	Nanomateriales orgánicos e inorgánicos	Estructura de la información química (sensible a la superficie) y estado químico.

1.9.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés), utiliza electrones en lugar de luz para formar una imagen de la superficie de la muestra. El haz incidente se proyecta sobre la superficie de la muestra para producir una imagen. La alta resolución espacial hace posible la caracterización del material de nanómetro a micrómetro. Los electrones acelerados en un microscopio electrónico de barrido (SEM) transportan cantidades significativas de energía cinética y esta energía se disipa como una variedad de señales producidas por las interacciones de los electrones de la muestra cuando los electrones incidentes se desaceleran en la muestra sólida. (Chaudhary et. al, 2016).

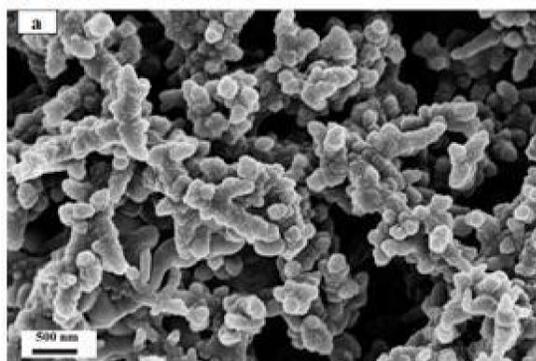


Figura 10: Imagen SEM de un polímero semiconductor nanoestructurado. Fuente: (Chaudhary, 2016).

1.9.2 MICROSCOPIA DE TRANSMISION ELECTRONICA

En la microscopía de transmisión electrónica (TEM por sus siglas en inglés), se utiliza un haz de electrones que se transmite a través de una muestra ultrafina, a medida que pasa a través de la interacción se forma una imagen y se detectan los electrones que viajan a través de la muestra. Los electrones tienen una longitud de onda más corta que los fotones y, por lo tanto, pueden proporcionar una resolución más alta que los microscopios ópticos convencionales. Estos electrones se enfocan en un haz muy delgado que se transmite a través de la muestra y finalmente se proyecta una pantalla fluorescente dando una “imagen de sombra” de la muestra. El contraste de la imagen depende de la densidad del material. La técnica de TEM puede proporcionar dos tipos de información sobre una muestra: una imagen ampliada y un patrón de difracción (Chaudhary et. al, 2016).

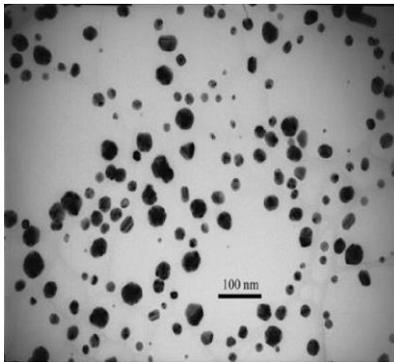


Figura 11: Micrografía TEM de nanopartículas de plata. Fuente (Hongjin, 2006)

1.9.3 ESPECTROSCOPIA DE UV VIS

La espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis), permite la evaluación de las características optoelectrónicas de los nanomateriales, como el tamaño, el estado de agregación y el índice de refracción mediante la medición de absorción. Esta es una técnica ampliamente utilizada que proporciona una evaluación no invasiva y rápida en tiempo real, además de que es un proceso simple y económico ya que

con una preparación mínima de la muestra se puede llevar a cabo lo que permite que se utilice en numerosos laboratorios dentro de muchas disciplinas. La espectroscopia UV-Vis funciona utilizando la radiación electromagnética de una longitud de onda entre 180 nm - 1100 nm que pasa a través de una muestra para medir su transmitancia o absorbancia óptica. Los rangos espectrales cubren el rango de longitud de onda para el ultravioleta (170 nm a 380 nm), visible (380 a 780 nm) e infrarrojo cercano (780 nm a 3300 nm). La absorción óptica de una muestra es característica de cada material y se mide utilizando una celda de cuarzo (Quevedo et. al 2021).

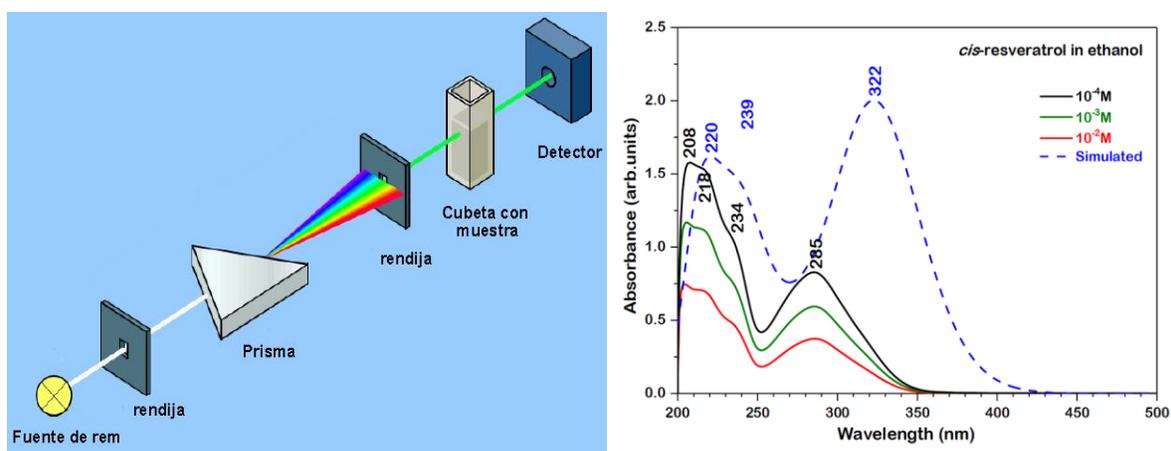


Figura 12: a) Representación del principio físico de espectroscopia UV-Vis y b) espectro de absorción óptica de una muestra líquida de *cis*-resveratrol en etanol.

Fuente: (Fernández, 2010)

CAPÍTULO II

2. ANTECEDENTES

Anteriormente los investigadores buscaban la manera de inhibir *Candida albicans* con diferentes técnicas, materiales y medicamentos, sin embargo, en el transcurso de la búsqueda llegaron a realizar estudios con elementos naturales como lo son el aceite de coco, aceite de esencia de limón, aceite de orégano, aceite de té de árbol, entre otros (Vilchis, 2022) Baygar et al., 2018) (Neppelenbroek et al., 2018) (Muttagi & Subramanya, 2017).

Un estudio realizado en 2015 donde se utilizaron nanopartículas de Clorhexidina (CHX-NP) en una reacción acuosa incorporadas a recubrimientos dentales comerciales por inmersión, se caracterizó el ángulo de contacto (hidrofilicidad) y absorción de agua mediante cambio de masa (Garner et. al, 2015). Se concluyó que las CHX-NP proporcionaron una dosis controlada y localizada de CHX soluble en la superficie de las siliconas dentales sin afectar negativamente la hidrofilia o la absorción de agua, además de que proporcionaron un control antifúngico eficaz en un ensayo de proliferación celular, e indicaron que recubrir los materiales con este tipo de nanopartículas podría ser una forma eficaz de administrar concentraciones bajas, pero clínicamente relevantes de Clorhexidina en el entorno bucal (Garner et. al, 2015).

En 2018 se realizó un estudio en el cual se agregaron nanopartículas de quitosano donde se utilizaron diferentes microorganismos bacterianos como *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) como representante de bacterias grampositivas y no esporógenas; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) como representante de bacterias gramnegativas; y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) como representante de bacterias grampositivas y resistentes. Además, *Candida albicans* (ATCC 10231) se utilizó como hongo patógeno disponible en la boca, la tasa de crecimiento de los microorganismos se midió en el medio de cultivo utilizando un espectrofotómetro de UV-Visible y finalmente se concluyó que las diferentes concentraciones de nanopartículas de quitosano condujeron a la

inhibición del crecimiento de hongos y bacterias en 24 y 48 horas (Mousavi *et. al*, 2018).

En el año 2021, se realizó un estudio por Jie Deng y colaboradores en cual mediante el método *in-situ* se sintetizaron nanopartículas de plata (NPs de Ag) en un revestimiento acrílico suave para obtener efectos antifúngicos. Se preparó el revestimiento con varios porcentajes, se almacenaron en 3, 7 y 14 días, se midió la tasa antifúngica (AFR por sus siglas en inglés) de los ensayos antifúngicos de contacto directo donde se observó que el AFR aumentó a medida que aumentó la concentración de plata, mientras que disminuyó con el tiempo de almacenamiento. Se pudo concluir que dentro de la vida útil del revestimiento blando que tenía Ag NPs sintetizadas de manera *in-situ* tuvo un control efectivo de *Candida albicans* a través del contacto directo (Deng *et. al*, 2021).

En el grupo de trabajo de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León (ENES León) se ha evaluado de manera *in vitro* a las Nps de Ag₂S con dos fitopatógenos como: *Aspergillus sp* en el ajo, así como la *Colletotricum gloeosporioides* causante de la antracnosis en aguacate logrando inhibir su desarrollo en una concentración de 7.5 mg/ml. Así como también se realizó el ensayo del efecto de las Nps de Ag₂S en cultivo con *Candida albicans* y su citotoxicidad en Fibroblastos Gingivales Humanos (FGH) (Xoca, *et. al*, 2019).

Un estudio en 2021 realizado en la ENES León se evaluó la respuesta antifúngica del Ag₂S en *Candida albicans* y se evaluó la citotoxicidad en células orales como Fibroblastos Gingivales Humanos para la aplicación de acondicionador de tejidos. Se realizó la síntesis asistida por ultrasonido de Nps de Ag₂S experimentales, Nps Ag₂S con Polietilenglicol (PEG) y Nps de Ag₂S comerciales de la marca Sigma Aldrich. Como resultados se obtuvieron nanopartículas semiesféricas con un tamaño entre 5-10 nm con un aspecto aglomerado, además de que la concentración mínima inhibitoria fue de 3.75 mg/ml, tanto para Nps de Ag₂S experimentales, como las que contienen PEG y para las comerciales. También se realizaron ensayos de difusión en donde las Nps de Ag₂S obtuvieron zona de inhibición de hasta 14 ml y

las nanopartículas comerciales no obtuvieron zonas de inhibición, se pudo concluir que la síntesis asistida por ultrasonido fue efectiva para obtener Nps de Ag_2S mostrando una efectividad contra *Candida albicans* (Vilchis, 2022).

CAPÍTULO III

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La estomatitis protésica representa un problema en los pacientes portadores de prótesis totales, ya que es un proceso patológico inflamatorio de origen multifactorial en la mucosa oral, la prevalencia de esta oscila entre el 15% y 70 % de los usuarios y es mayor en personas de edad avanzada y en mujeres (Gendreau & Loewy, 2011). Los factores etiológicos incluyen la mala higiene de las prótesis, uso continuo y nocturno, acumulación de biopelícula dental y contaminación bacteriana y por levaduras. La estomatitis se encuentra asociada a la presencia de infecciones micóticas donde estos factores parecen aumentar su capacidad para colonizar tanto la prótesis total como la superficie de la mucosa oral donde la *Candida albicans* actúa como patógeno oportunista (Gendreau & Loewy, 2011). Los cambios clínicos que se presentan en este proceso son áreas eritematosas que se encuentran de manera característica en las zonas de soporte una prótesis removible, uno de los lugares más comunes donde se puede encontrar es la mucosa del maxilar superior (Barata et. al, 2003).

Estudios han demostrado que en el 78% de los pacientes portadores de prótesis totales existe una colonización de *Candida albicans*. (Elteen AK & Elteen RM, 1998). *Candida albicans* es un patobionte fúngico que se aísla con frecuencia de las superficies mucosas con una tasa de portadores asintomáticos de un 60% aproximadamente en la población humana, esta puede generar desde infecciones moderadas a graves (Richardson, Moyes & Naglik, 2019).

Las infecciones por hongos son un factor importante que contribuyen a enfermedades infecciosas graves, las especies de *Candida* se encuentran entre las causas más comunes de enfermedad micótica invasiva y *Candida albicans* como la principal, en la actualidad solo existen tres clases de medicamentos aprobados para el tratamiento de micosis y la eficacia de estos se ve comprometida por el desarrollo de resistencia a los medicamentos (Lee, et. al, 2021).

3.1 JUSTIFICACIÓN

Las nuevas tecnologías nos han fomentado la necesidad de investigar métodos alternativos que se puedan utilizar para la solución de los problemas dentales. El uso de la nanotecnología ayuda a prevenir procesos infecciosos, es por eso por lo que se considera importante evaluar el efecto antifúngico de las Nps de Ag₂S mediante la realización de estudios *in vitro* que permitan encontrar resultados que sean favorables en la eliminación de agentes patógenos bucales.

Los materiales de revestimiento como los acondicionadores de tejido son utilizados para mejorar el ajuste y la función de una prótesis total acrílica mal ajustadas y también ayuda a prevenir la irritación mecánica de la misma (Dorocka-Bobkowska et. al/2017).

El sulfuro de plata se caracteriza por ser un material que tiene excelentes propiedades antibacterianas y fungicidas (Sadovnikoy, et. al, 2018)

Esta investigación impulsará que las nuevas tecnologías sean implementadas en materiales dentales con el uso de nanopartículas para inhibir procesos infecciosos, que en un futuro mejore la calidad de materiales y que impacte en la calidad de vida de los pacientes.

3.2 HIPÓTESIS

- Las nanopartículas de Ag₂S agregadas al acondicionador de tejidos Softy inhiben el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans* ATCC 90028.

3.3 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las propiedades antifúngicas del acondicionador de tejidos Softy modificado con nanopartículas de Ag₂S a través de un ensayo antifúngico *in vitro*.

3.3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener nanopartículas de Ag₂S con Polietilenglicol (PEG) través de una síntesis química asistida por ultrasonido.
- Obtener discos de acondicionador de tejidos adicionado con nanopartículas de Ag₂S con PEG mediante mezcla física.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria del sulfuro de plata en el acondicionador de tejidos por microdilución.
- Determinar el efecto antifúngico de las nanopartículas de sulfuro de plata en el acondicionador de tejidos por el método de difusión en agar.

3.4 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Población de estudio: Acondicionador de tejidos Softy

Tipo de Estudio: Experimental *in vitro*

Diseño de estudio: Puro, Prospectivo, Comparativo

3.4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

Microorganismo: *Candida albicans*

Discos calibrados y con superficies planas con base a la norma ISO 10139-2:2016(E)

Nanopartículas semiesféricas de sulfuro de plata

3.4.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

Especies diferentes a *Candida albicans*

Cajas de agar rasgadas

Muestras con distintas formas o tamaños establecidos por la norma ISO 10139-2:2016(E)

3.4.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

Cultivos contaminados.

Cajas Petri con superficies irregulares o áreas no sembradas en el agar.

Muestras con superficies rugosas y contaminadas.

3.4.4 VARIABLES

VARIABLE	FUNCIÓN DENTRO DE LA INVESTIGACIÓN	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO Y ESCALA DE VARIABLE
Concentración de Nps de Ag₂S	Independiente	Cantidad de soluto contenida en determinado monto de solvente o solución. (Barbisan, 2021).	Las Ag ₂ S con PEG fueron incorporadas a un acondicionador de tejidos Softy en diferentes concentraciones: 0%, 1%, 2% y 4%.	Cuantitativa discreta y de razón
Actividad antifúngica	Dependiente	Cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped (Gregori, 2005).	Se realizó ensayo de <u>microdilución</u> para determinar la concentración mínima inhibitoria y un ensayo de <u>difusión en agar</u> para determinar el efecto antifúngico de las nanopartículas de Ag ₂ S con PEG en un acondicionador de tejidos.	Cuantitativa continua de intervalo

CAPITULO IV

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

Para la obtención de nanopartículas de Ag_2S con PEG se realizó una síntesis química asistida con ultrasonido, donde se prepararon las siguientes soluciones volumétricas, utilizando agua destilada como disolvente en las siguientes concentraciones:

- Citrato de sodio (Karal, S.A de C.V): 0.129 g / 50 ml
- Nitrato de plata (J.T. Baker): 0.424 g / 50 ml
- PEG (Sigma-Aldrich) 100 μL
- Sulfuro de sodio (Fermont): 0.195 g / 100 ml
- Sulfuro de sodio excedente (Fermont): 0.0004 g / 25 ml

En un matraz Erlen Meyer se adicionaron las soluciones en el orden que están descritas arriba; el matraz fue cubierto completamente de aluminio y fue sellado con un tapón de algodón y gasas. Posteriormente se llevó al ultrasonido por 2 h, una vez sonicada la solución se observó un cambio en la coloración de la solución se tornó color negro debido a la presencia de un precipitado. Posteriormente, se realizó un prelavado del producto, donde se colocó la solución en tubos de 15 ml, los cuales se centrifugaron a 5000 rpm en un equipo (Cole Parmer) por 10 min. El excedente se colocó en un vaso de precipitado y se repitió este proceso hasta concluir con el crudo de reacción. Para lavarlo se vertió agua destilada a los tubos para centrífuga y se llevaron a 5000 rpm x 10 min. Finalmente, se pudo observar en los tubos un precipitado negro correspondiente a las Nps de Ag_2S con PEG para evitar que las

nanopartículas quedaran precipitadas en la parte inferior del tubo se agitaron con un equipo vortex unos cuantos segundos.

Para el secado del producto de Ag_2S se colocó en una caja Petri de vidrio y se posicionó en una parrilla a una temperatura de 60°C aproximadamente 20 minutos y hasta que el agua se evaporó por completo. Las nanopartículas se trituraron en un mortero de ágata y se colectaron obteniendo 2.0 g de Nps de Ag_2S . (Figura 13).

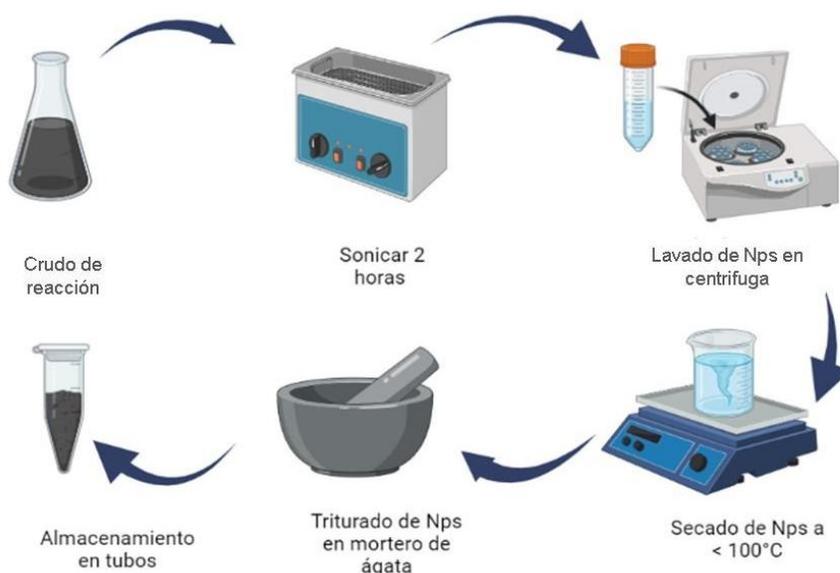


Figura 13: Proceso de síntesis química asistida con ultrasonido de nanopartículas de plata en medio acuoso. Fuente propia.

Para la esterilización de las nanopartículas de Ag_2S con PEG, el producto se colocó en tubos eppendorf abiertos en un tubo falcon de 50 ml cubierto de aluminio, el tubo falcón no se cierra completamente y se sostiene sobre un vaso de precipitado para evitar que se derramen las nanopartículas y se introdujeron a la autoclave marca Tuttnaver 2340 M, por 20 min.

4.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE ACONDICIONADOR DE TEJIDOS

Para la obtención de los discos de acondicionador de tejidos se realizaron moldes de silicona por condensación (marca Optosil) con un tamaño de 5 cm x 3 cm y 1 mm de profundidad. Se siguieron las instrucciones del fabricante que indicaban las proporciones de la mezcla de masilla pesada y de catalizador a utilizar; se mezcló hasta que no hubo betas entre ambos y se obtuvieron moldes de silicona de color amarillos de 1.4 cm³. Por otro lado, se mezclaron 2 g de polímero y 2 ml de monómero con ayuda de un vibrador marca Sunburst; se colocó el acondicionador de tejidos en el molde y este a su vez fue puesto entre 2 losetas para retirar excedentes (Figura 14).

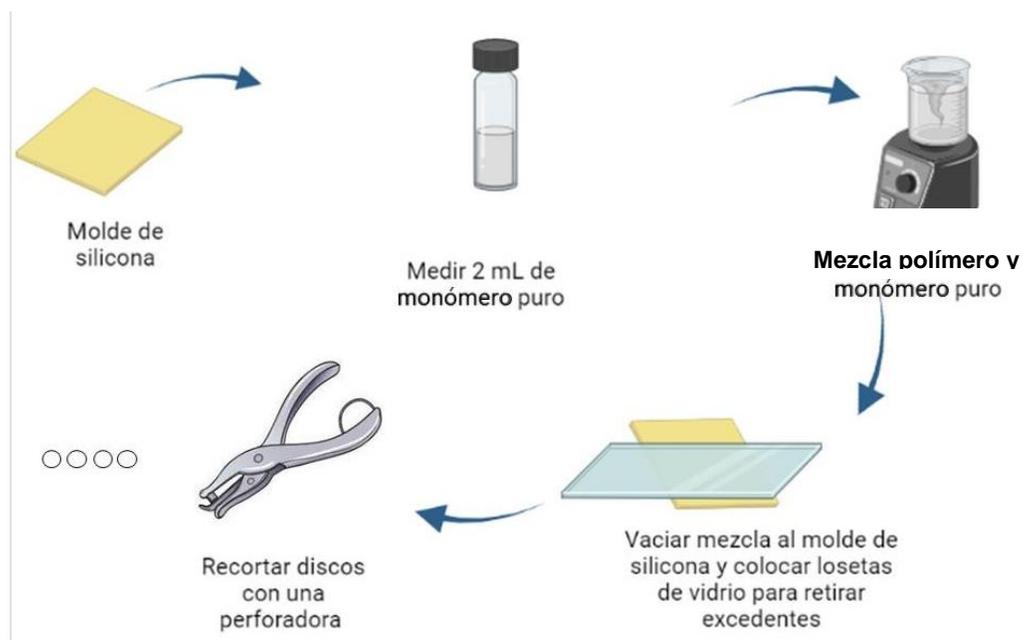


Figura 14: Proceso de preparación de disco de acondicionador de tejidos. Fuente propia.

4.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS CON ACONDICIONADOR DE TEJIDOS ENRIQUECIDO CON AG₂S CON PEG

Para la obtención de los discos de acondicionador de tejidos se realizaron moldes de silicona por condensación (OPTOSIL) con un tamaño de 5 cm x 3 cm y 1 mm de profundidad. Se siguieron las instrucciones del fabricante que indicaban la mezcla de masilla pesada y un catalizador, se mezclaron hasta que no hubiera betas entre ambos (Figura 15).



Figura 15: Molde de silicona 5 cm x 3 cm y 1 mm. Fuente propia.

Para la obtención de las diferentes concentraciones de nanopartículas de Ag₂S, se preparó una solución inicial donde se diluyeron 2 g de nanopartículas de Ag₂S y 10 ml de monómero del acondicionador de tejidos y se colocó en baño ultrasónico durante 1 h.



Figura 16: Solución inicial al 4% (2 g de Ag₂S en 10 ml monómero). Fuente propia

Posteriormente, se mezclaron la solución inicial y el polvo del acondicionador de tejidos en las siguientes proporciones (Tabla 2) para obtener las siguientes concentraciones 4%, 2%, 1 % y 0%.

Tabla 2. Concentración de nanopartículas de sulfuro de plata en el acondicionador de tejidos.

Concentración (%)	Cantidad de acondicionador (g)	Cantidad de solución madre	Volumen de monómero (ml)	Imagen de la solución
4%	2 g de polvo	2 ml	0	
2%	2 g de polvo	1 ml	1 ml	
1%	2g de polvo	0.5 ml	1.5 ml	
0%	2 g de polvo	0 ml	2 ml	

Cada una de las muestras a diferentes concentraciones se sonicaron durante 15 minutos y se mezclaron las cantidades de monómero y polímero establecidas en la Tabla 2, con ayuda de un vibrador (Sunsburst). Se colocaron en los moldes con ayuda de dos losetas para retirar los excedentes. Se dejaron polimerizar por 23 min a temperatura ambiente, posteriormente se recortaron los discos con la perforadora para obtener discos de un diámetro de 5.5 mm y 1 mm de espesor (Figuras 17 y 18).

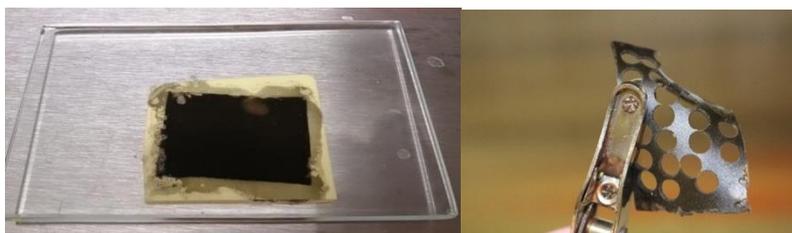


Figura 17: A) Preparación de los discos, B) perforación de Discos. Fuente propia.

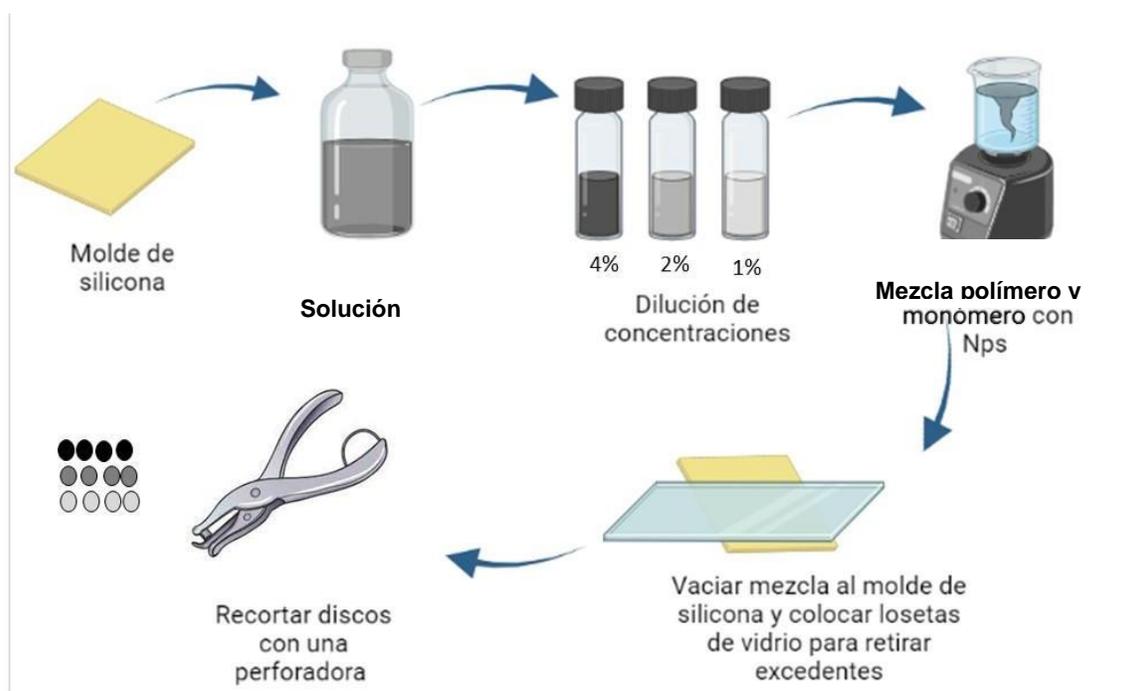


Figura 18: Proceso de fabricación de discos con Nps de Ag_2S . Fuente propia

4.4 ESTERILIZACIÓN DE MUESTRAS

Los discos de acondicionador de tejidos modificados con y sin nanopartículas de Ag_2S se colocaron en un tubo de cristal con 8 ml de agua bidestilada y fueron cubiertos de aluminio, finalmente se esterilizaron durante 20 min y se dejaron en agua durante 24 h para la liberación del monómero residual (Figuras 19 y 20).

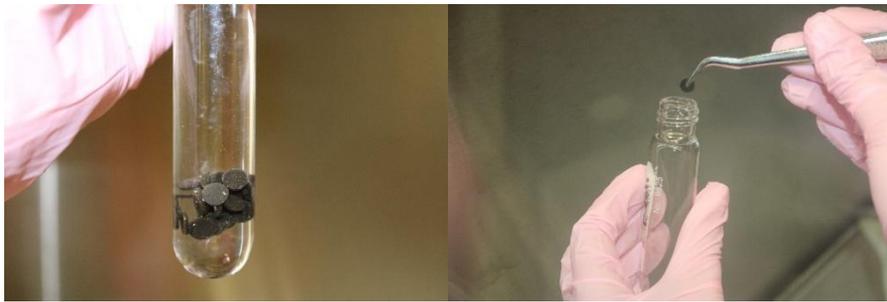


Figura 19: Inmersión de discos en agua bidestilada durante 24 horas. Fuente propia.



Figura 20: Proceso de esterilización de discos. Fuente propia.

4.5 ENSAYO DE DIFUSIÓN EN AGAR DE DISCOS DE ACONDICIONADOR DE TEJIDOS ADICIONADO CON AG₂S

4.5.1 PREPARACIÓN DE AGAR DEXTROSA SABOURAUD

Se pesaron 13 g de agar Dextrosa Sabouraud en una balanza (marca Ohaus) calibrada, se diluyó el agar en 200 ml de agua destilada en una parrilla con agitación y temperatura, una vez que la solución está en su punto de ebullición, se retiró de la parrilla y se metió a la autoclave durante 20 min a 120°C. Posteriormente, se vertieron 20 ml de agar en cajas petri de 10 ml, se sellaron, se etiquetaron para su mejor identificación y se almacenaron en un refrigerador a 4°C. Para comprobar la esterilidad de las placas preparadas, se colocaron en una incubadora durante 24 h y de no haber algún crecimiento en la superficie de las placas con agar, fue indicativo de su esterilidad.

4.5.2 PREPARACIÓN DEL CULTIVO JOVEN

Para realizar el cultivo joven se tomó la *Candida albicans* que está situada en refrigeración y etiquetada con cepa 90028 y se llevó a temperatura ambiente, se preparó la campana dejándose esterilizar durante 10 min con luz UV, se colocó el asa estéril en el mechero hasta que se tornara al rojo vivo, se dejó enfriar y se tomó una muestra de *Candida albicans* y se cultivó en una caja de agar, la cual se colocó en una incubadora durante 24 h a 37°C.

4.5.3 PREPARACIÓN DE INÓCULO

En un cultivo joven de máximo 24 h de haberse sembrado, se tomaron de 3 a 5 colonias de 1 mm y se colocaron en cloruro de sodio agitándose en el Vortex durante 15 segundos y con ayuda de un densitómetro a una escala estándar de McFarland se ajustó la densidad celular a 0.5 (Figura 21).



Figura 21: Solución de cloruro de sodio y *Candida albicans* ajustada a escala McFarland. Fuente propia.

Una vez lista la solución microbiana, se colocaron 150 μ l y con ayuda de un hisopo estéril, se frotó uniformemente en las cajas Petri sin ser despegado para homogenizar el sembrado.

4.5.4 APLICACIÓN DE DISCOS ANTIFÚNGICOS Y NANOMATERIALES

Los discos del acondicionador de tejidos adicionado con Ag_2S al 1%, 2% y 4% fueron colocados con pinzas estériles sobre la superficie del agar haciendo una ligera presión para que estén en contacto los discos y el agar. Los discos se colocaron uniformemente de modo que no estén a menos de 24 mm de centro a centro. Es importante mencionar que para una placa de 100 mm no deben colocarse más de 5 discos. Los discos que utilizamos como control (+) fueron discos de papel impregnados de Anfotericina B y como control (–) fueron discos de acondicionador de tejidos sin concentración de Ag_2S . Una vez colocados los discos se sellaron y se dejaron en incubadora durante 24 horas a 37 °C.

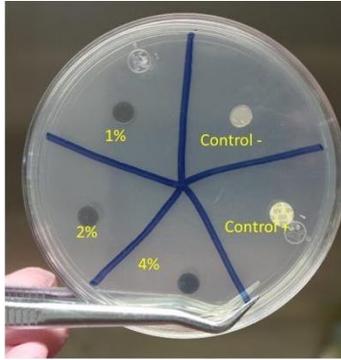


Figura 22: Ensayo de difusión en agar de discos con acondicionador de tejidos enriquecidos con Ag_2S con PEG. Fuente propia.

4.6 ENSAYO DE DIFUSIÓN EN AGAR DE Ag_2S

Se realizó el mismo procedimiento previamente descrito. En cajas de agar se colocaron 150 μl de solución ajustada de cloruro de sodio al 0.85% y una colonia de *Candida albicans* ajustada a 0.5 a una escala de Mcfarland y con ayuda de un hisopo estéril, se frotó uniformemente en las cajas Petri sin ser despegado, para homogenizar el sembrado. Se agregaron discos de papel impregnados de Nps de Ag_2S con PEG en sus diferentes concentraciones 1%, 2% y 4%.

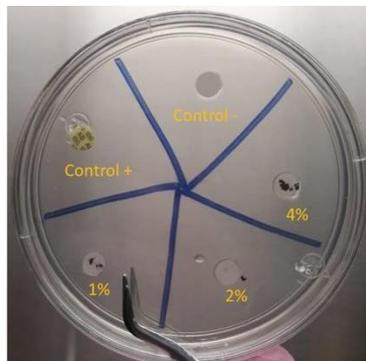


Figura 23: Sembrado y colocación de discos de papel y Nps Ag_2S . Fuente propia

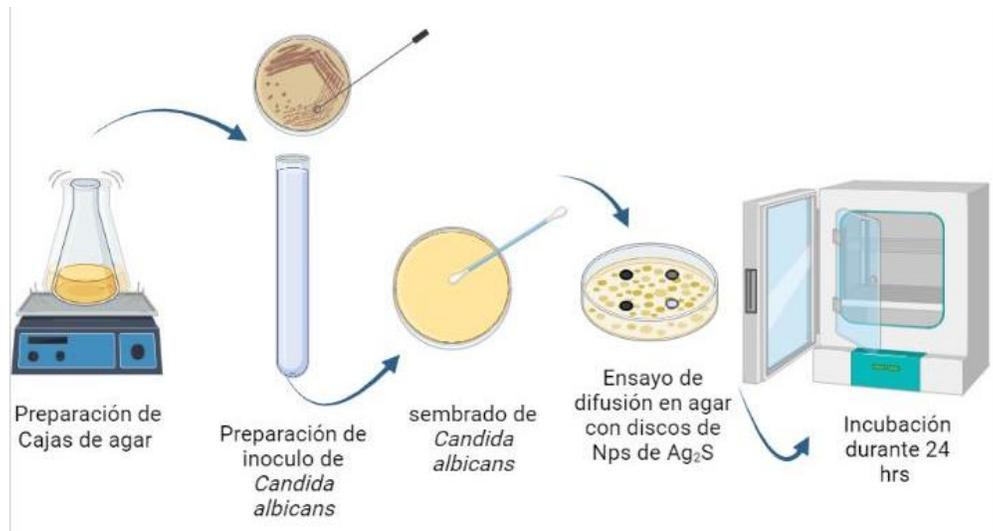


Figura 24: Diagrama de ensayo de difusión en agar.

4.7 ENSAYO DE MICRODILUCIÓN

4.7.1 PREPARACIÓN DEL MEDIO RPMI

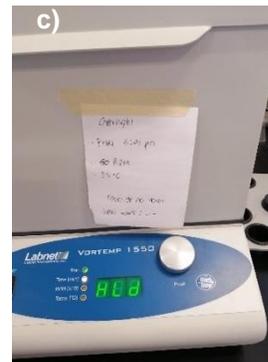
Se preparó medio RPMI 1640 en un vaso de precipitado de 2 L agregando 1000 ml de agua destilada, se colocó el medio RPMI 1640 en polvo y se disolvió con ayuda de un agitador magnético. Se ajustó el pH en el potenciómetro a 7.0 ± 1.0 a temperatura ambiente (25°C) con MOPS (ácido 3-N-morfolino propanosulfónico) y se esterilizó a través de la unidad de filtración mediante el método de filtración para lo cual se utilizó papel filtro de 0.22 micrómetros y se almacenó a 4°C hasta su uso.



Figuras 25: a) Medio RPMI, b) Ajustado de pH, c) Medio RPMI en unidad de filtración. Fuente propia.

4.7.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE LEVADURAS

Se usó una cepa estándar ATCC *Candida albicans* 90028. A partir de un cultivo de 24 horas de crecimiento a 37°C en medio sólido, agar dextrosa Sabouraud; se preparó una suspensión para la cual se colocaron 7 ml de medio RPMI en un tubo falcón y se inoculó una colonia de *Candida albicans*. Se incubó a 37°C por 18 horas en agitación de 40 RPM (Vortemm 1550) por 18 horas. Posteriormente, se procedió a preparar el inóculo el cual se ajustó a escala 0.5 de McFarland y finalmente se realizó una dilución 1:100, la cual se agregó a las placas de 24 pozos (Figura 26).



Figuras 26: a) Cultivo joven, b) preparación de inóculo, c) overnight en incubación (Vortem1550). Fuente propia.

Se inocularon cajas de 24 pozos con 500 µl de esta suspensión de trabajo, en cada uno de los pozos se agregaron los discos de acondicionador de tejidos modificados con Nps de Ag₂S con PEG en sus diferentes concentraciones. Se incubaron las placas a 37 °C a 180 rpm por 24 horas.

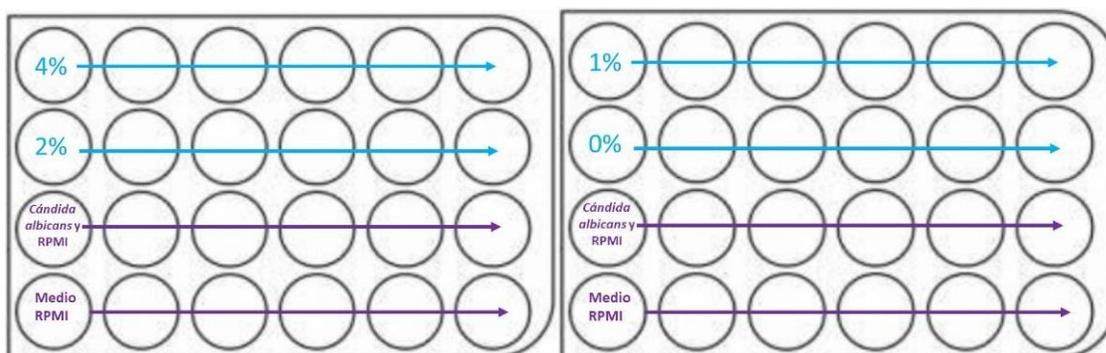


Figura 27: Representación gráfica del acomodo de discos de acondicionador de tejidos adicionados con Nps de Ag₂S. Fuente propia

Para cuantificar la viabilidad de *Candida albicans*, de la caja de 24 pozos se retiró la solución de trabajo y se agregaron 500 µl de la solución compuesta por RPMI y MTT a una concentración de 0.002 mg/ml, se agitó durante 10 min en ultrasonido a 37 kHz. Posteriormente, las cajas de 24 pozos se incubaron por 2 horas y se retiró la solución de RPMI y MTT, finalmente se colocaron 500 µl de DMSO en cada pozo y se incubaron por 1 hora más.

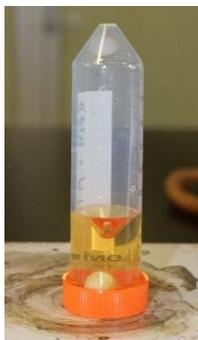
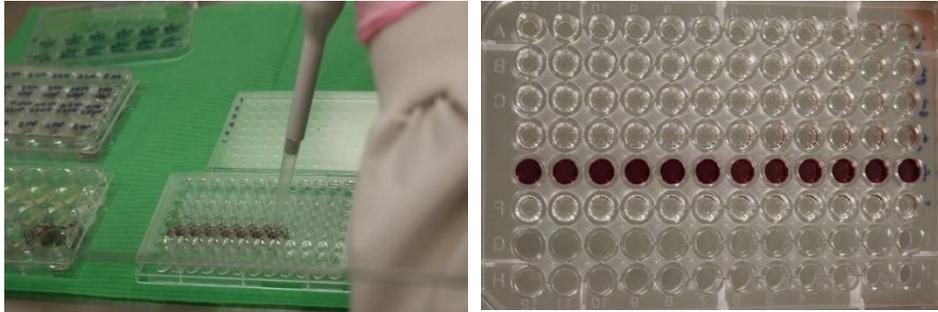


Figura 28: Medio RPMI con MTT en agitación.

Una vez transcurrida 1 hora se transfirieron 1200 μ l de la caja de 24 pozos a una de 96 pocillos colocando 100 μ l en cada pozo para dar lectura en el espectrofotómetro UV-Vis Multiskan™ GO (Thermo Scientific™ Finland) a una longitud de 550 nm.



Figuras 29: Traslado de ensayo de caja de 24 pozos a una de 96 pocillos y placa de 96 pocillos. Fuente propia.

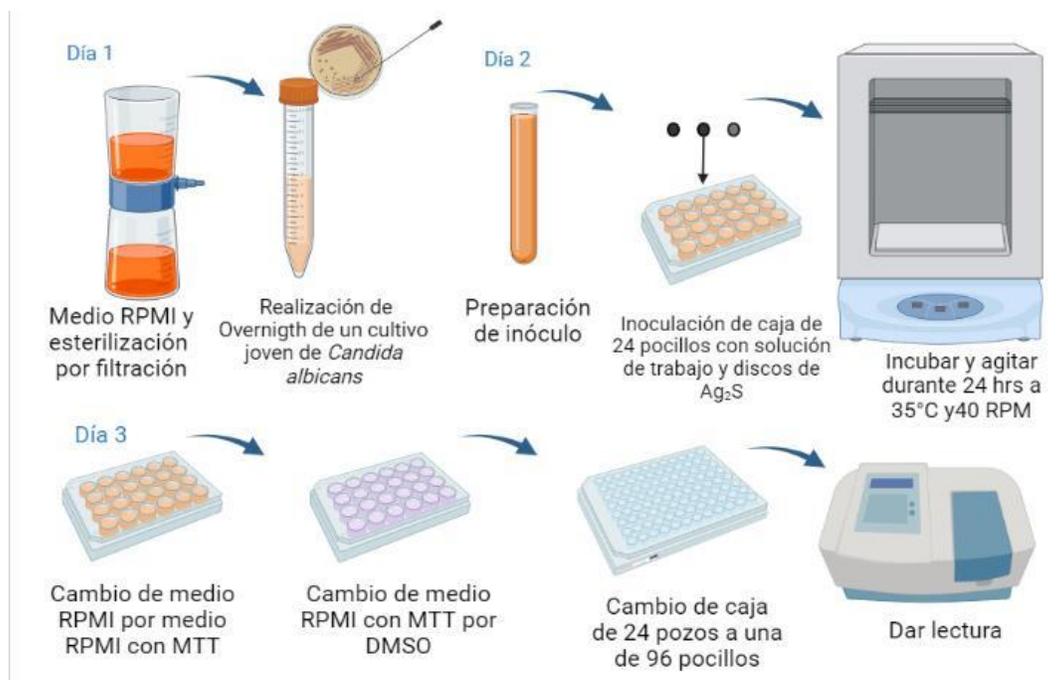


Figura 30: Diagrama del proceso del ensayo de microdilución. Fuente propia

CAPÍTULO V

5 RESULTADOS

5.1 ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV-VIS

En la figura 31 se muestra espectro de absorción del Ag_2S con PEG tomado de un espectrofotómetro UV-Vis Multiskan TM GO (Thermo Scientific TM Finland) en un intervalo de longitud de onda de 300 a 900 nm. En el espectro se puede observar que el rango de absorción máxima va de 300 a 500 nm. El espectro de absorción es característico de las nanopartículas de sulfuro de plata.

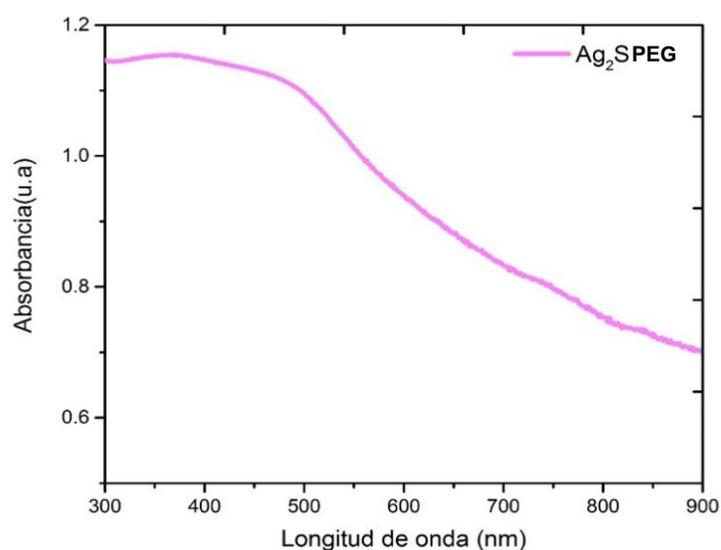


Figura 31: Espectro de absorbancia óptica del sulfuro de plata en polvo disuelto en agua. Fuente propia.

5.2 MICROGRAFÍA TEM DEL SULFURO DE PLATA

En las micrografías TEM de las muestras de Ag_2S con PEG fueron adquiridas a diferente magnificación 100, 200 y 500 nm, en un equipo marca JEOL JEM-2010 a 200 kV con una cámara digital acoplada de GATAN modelo ORIUS. En las

imágenes de la figura 32 se observa una morfología esférica de las nanopartículas de sulfuro de plata (círculo naranja de imagen con la escala de 200 nm). Se observa superposición de las nanopartículas como se muestra en la mayoría de las imágenes (círculo azul y aglomeración círculo rojo de las imágenes con la escala de 100 nm). El tamaño promedio de las nanopartículas de sulfuro de plata es de 16.29 nm, esta promedio fue obtenido con el programa image J.

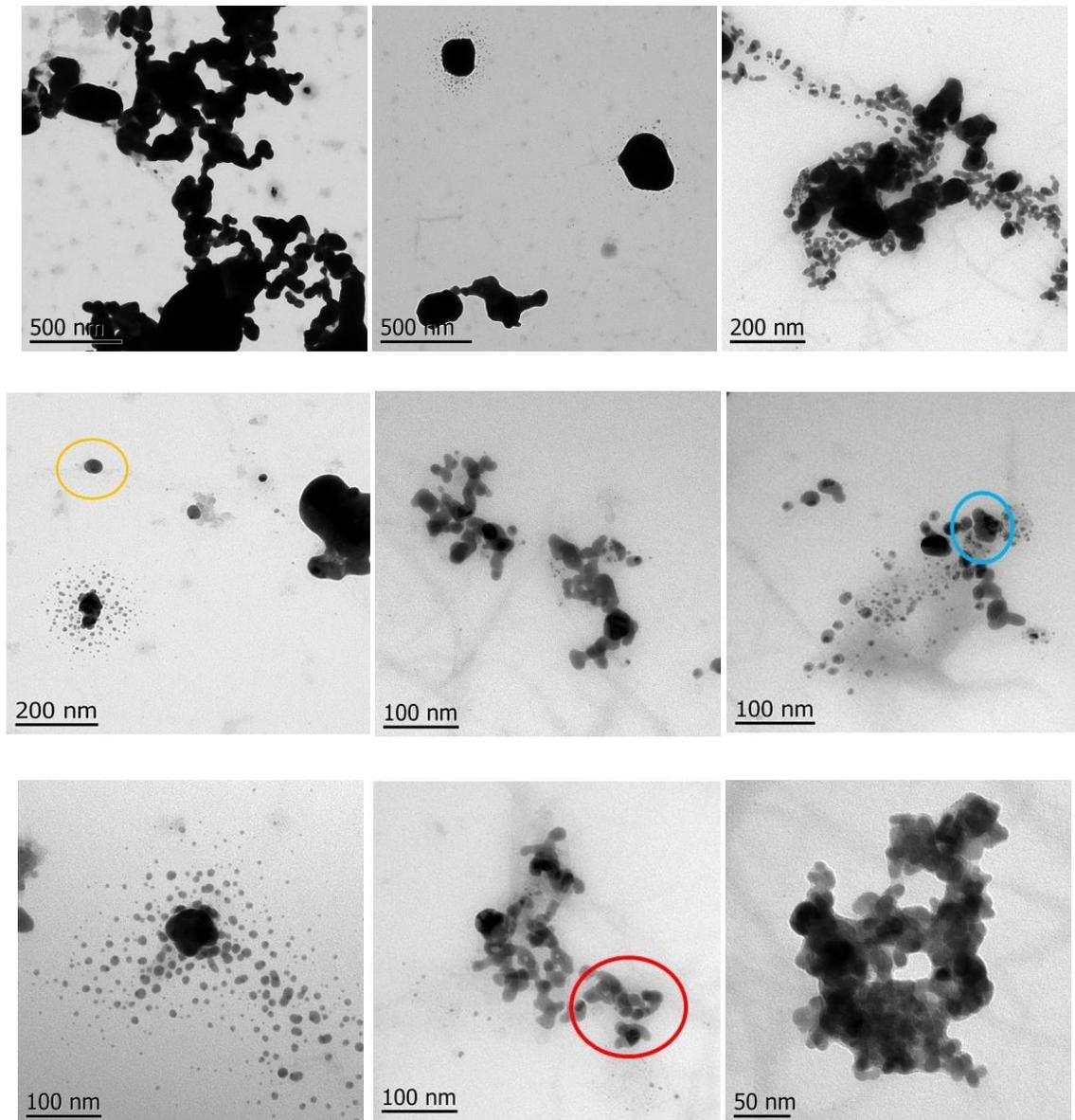


Figura 32: Micrografía TEM de muestras de Ag₂S con PEG. Fuente propia.

5.3 DISCOS DE ACONDICIONADOR DE TEJIDOS (SOFTY) ADICIONADO CON Ag_2S

Se obtuvieron discos de acondicionador de tejido adicionados con Nps de Ag_2S a diferentes concentraciones. En la figura 33 se muestran los discos de acondicionador de tejidos enriquecido de Nps Ag_2S con PEG donde se puede afirmar que los discos a mayor concentración de Nps se torna de color más oscuro, tienen un diámetro de 5.5 mm y un grosor de 1 mm, los cuales fueron medidos con un vernier electrónico.



Figura 33. Discos de acondicionador de tejidos a) sin Nps Ag_2S , b) con Ag_2S al 1% en peso c) con Ag_2S al 2% en peso y d) con Ag_2S al 4% en peso. Fuente propia.

En la figura 34 podemos observar la superficie de los discos de acondicionador de tejidos enriquecidos con Nps de Ag_2S que fueron tomados por un microscopio electrónico de barrido (SEM) de marca Hitachi TM 1000, utilizando un voltaje de aceleración de 15kV, donde puede percibir que las superficies de las muestras tienen cierta rugosidad y pueden observarse algunos poros como se muestra en los círculos azules.

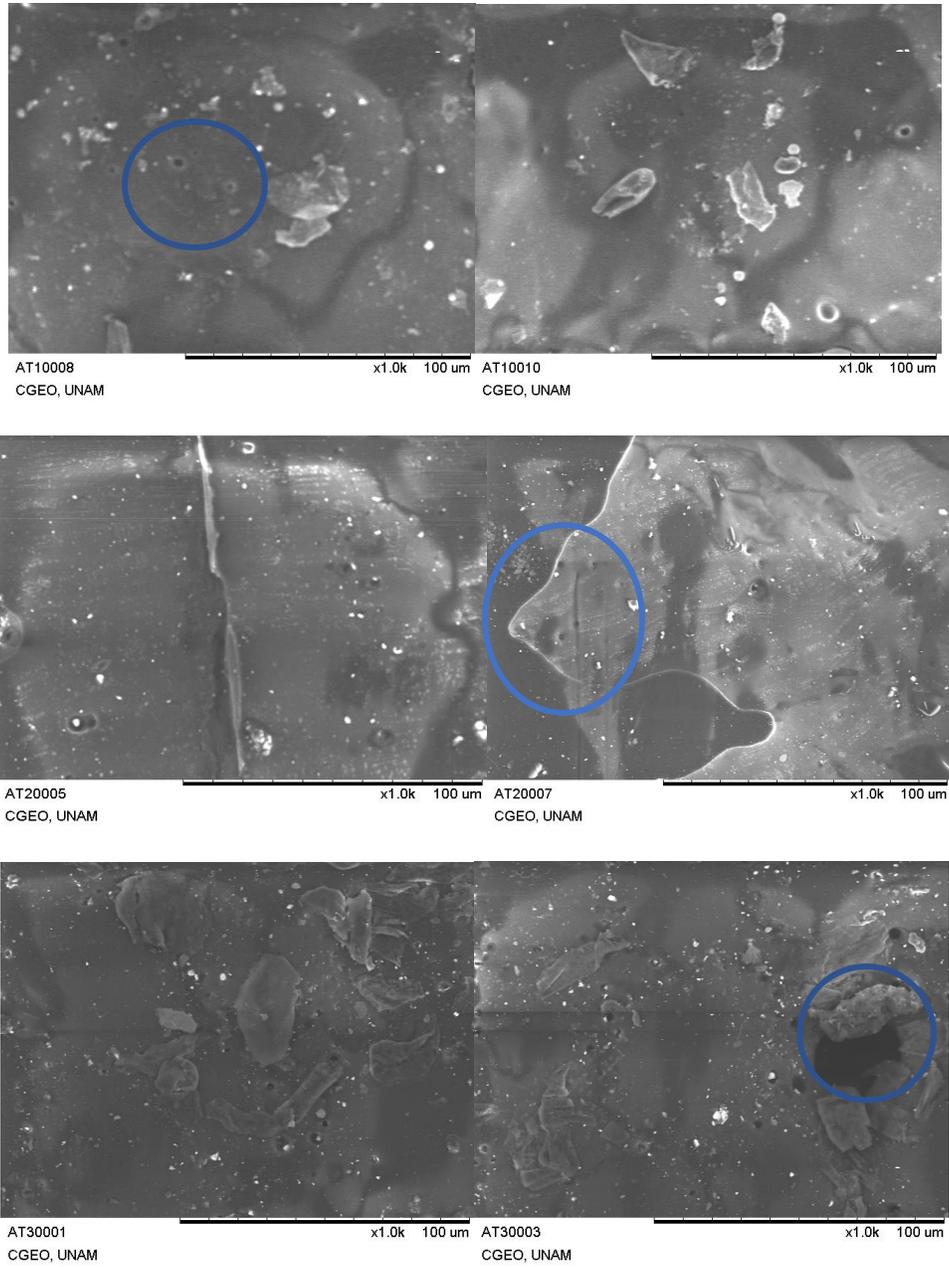


Figura 34. Imágenes SEM de la superficie de los discos de acondicionador de tejidos a tres concentraciones de nanopartículas de sulfuro de plata. a) y b) solo acondicionador de tejidos, c) y d) Ag_2S al 1%, e) y f) Ag_2S al 2%. Fuente propia.

5.4 ENSAYO DE DIFUSIÓN EN AGAR DE NPS AG₂S EN DISCOS DE PAPEL

Una vez que las placas con los discos de papel fueron incubadas a 37 °C, 24 h, se procedió a recabar, procesar e interpretar resultados de la zona de inhibición. Se midieron las zonas de inhibición que se forman alrededor de todos los discos, las cuales son uniformemente circulares (figura 35). A simple vista el grupo control positivo que corresponde a la anfetamínica, presenta un halo de inhibición mayor en comparación con las muestras de sulfuro de plata impregnados en discos de papel.

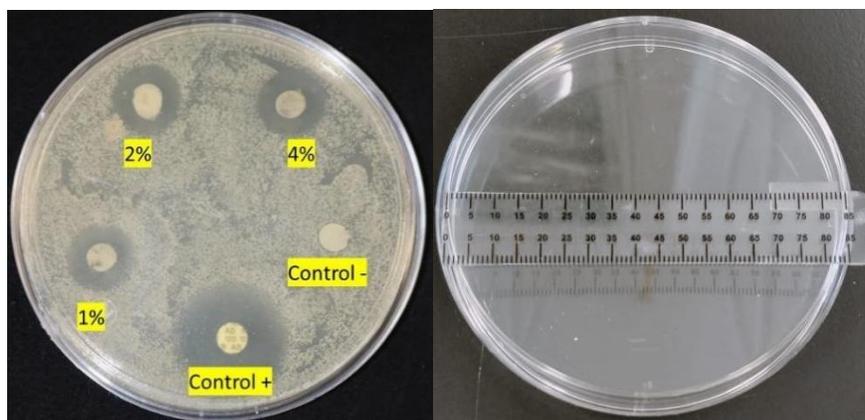


Figura 35: Crecimiento de *C. albicans* en cultivo con discos de papel de Ag₂S.

Fuente propia.

Se puede observar en la figura 35 que las zonas de inhibición de este ensayo como son definidas; el grupo control positivo su promedio fue de 21.29 mm, el grupo control negativo de 0 mm, así como el grupo al 1% de nanopartículas de sulfuro de plata tiene una zona de inhibición promedio de 13.69 mm, al 2% de 13.70 mm y al 4% de 14.40 mm. Los datos promedio con desviación estándar de la zona de inhibición de todos los grupos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Tabla de zona de inhibición y desviación estándar en ensayo de difusión en agar con discos de papel impregnados de Ag₂S.

Grupos	Zona de inhibición (mm)	Media ± SD (mm)
Control (-)	0	0
Control (+)	21.3	21.92 ± 0.55
	22.52	
	21.65	
	22.23	
Grupo de Ag₂S (1%)	13.87	13.69 ± 0.15
	13.77	
	13.60	
	13.54	
Grupo de Ag₂S (2%)	13.78	13.70 ± 0.12
	13.75	
	13.75	
	13.52	
Grupo de Ag₂S (4%)	14.37	14.40 ± 0.21
	14.24	
	14.72	
	14.28	

5.5 ENSAYO DE DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCOS DE ACONDICIONADOR ENRIQUECIDOS DE NPS AG₂S

Una vez que las placas con los discos de acondicionador de tejidos fueron incubadas a 37°C, 24 h, se procedió a recabar los resultados de las zonas de inhibición. Se observa que los discos de acondicionador enriquecidos con Ag₂S no tienen un halo de inhibición, pero tampoco hay un crecimiento de *Candida albicans*

por sobre los discos. El único disco que tiene halo de inhibición es el control (+) compuesto por la Anfotericina B.

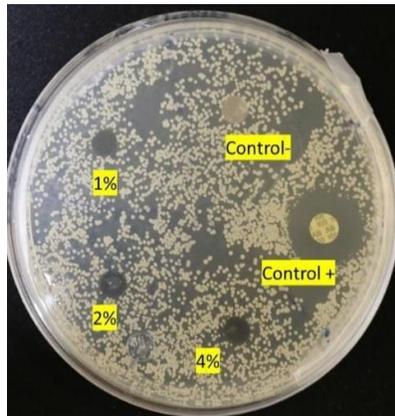


Figura 36. Crecimiento de *C. albicans* en cultivo con discos de acondicionador de tejidos con nanopartículas de Ag_2S . Fuente propia.

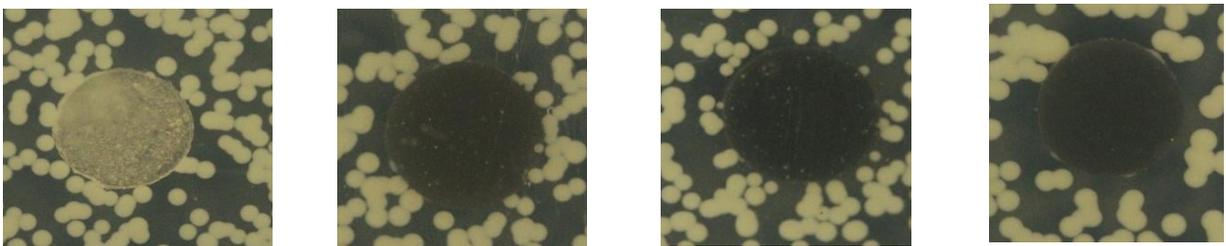


Figura 37: Acercamiento de discos de acondicionador de tejidos a) disco de acondicionador de tejidos b) disco con Ag_2S al 1%, c) disco con Ag_2S al 2%, d) disco con Ag_2S al 4%. Fuente propia.

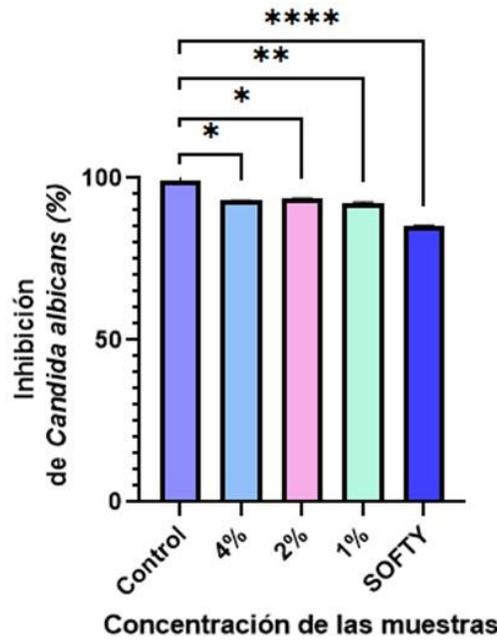
5.6 ENSAYO DE MICRODILUCIÓN

Se obtuvieron promedios, desviaciones estándar, así como porcentajes de las lecturas obtenidas (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de ensayo de microdilución ajustados en %.

	Acondicionador	Concentración de Nps de Ag₂S			Medio + Candida	Medio RPMI
	Softy	1%	2%	4%	100% crecimiento Candida	0% crecimiento Candida
	0.121	0.068	0.051	0.056	0.747	0.048
	0.123	0.066	0.052	0.055	0.735	0.05
	0.124	0.067	0.053	0.054	0.741	0.048
	0.121	0.065	0.051	0.057	0.742	0.047
	0.116	0.066	0.048	0.057	0.745	0.047
	0.121	0.063	0.052	0.06	0.746	0.047
	0.123	0.06	0.052	0.057	0.913	0.047
	0.124	0.06	0.053	0.06	0.921	0.046
	0.121	0.061	0.051	0.057	0.909	0.044
	0.116	0.062	0.053	0.055	0.893	0.049
		0.055	0.052	0.056	0.791	0.049
		0.053	0.053	0.055	0.863	0.049
Promedio	0.121	0.062	0.092	0.057	0.812	0.048
DE	0.003	0.005	0.138	0.002	0.080	0.002

Inhibición de *Candida albicans*



Anova Posthoc tukey test de una vía $P < 0.0001$

Figura 38: Gráfica de inhibición de *Candida albicans* del ensayo de microdilución de las muestras en disco de acondicionador de tejidos con diferentes concentraciones de nanopartículas de Ag_2S .

Se realizó el análisis estadístico ANOVA de una vía con un valor $p < 0.05$ donde se encontró diferencia estadísticamente significativa, por lo que se aplicó la prueba Post-Hoc Tukey test en la cual se encontró que el grupo control tiene diferencia significativa con los grupos al 1%, 2%, 4% y grupo de acondicionador Softy, así mismo como el grupo de acondicionador Softy tiene diferencia significativa con grupo al 1% y al 2% (Tabla 5).

Tabla 5. Tabla de resultados de prueba Post-Hoc Tukey test

Number of families	1							
Number of comparisons per family	10							
Alpha	0.05							
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold ?	Summary	Adjusted P Value			
Control vs. SOFTY	14.09	3.854 to 24.33	Yes	**	0.0026	A-B		
Control vs. 1%	6.849	-2.953 to 16.65	No	ns	0.2919	A-C		
Control vs. 2%	10.46	0.6586 to 20.26	Yes	*	0.0311	A-D		
Control vs. 4%	6.181	-3.822 to 16.18	No	ns	0.4146	A-E		
SOFTY vs. 1%	-7.243	-17.05 to 2.559	No	ns	0.2401	B-C		
SOFTY vs. 2%	-3.631	-13.43 to 6.171	No	ns	0.8315	B-D		
SOFTY vs. 4%	-7.912	-17.91 to 2.091	No	ns	0.1828	B-E		
1% vs. 2%	3.612	-5.735 to 12.96	No	ns	0.809	C-D		
1% vs. 4%	0.6686	-10.22 to 8.888	No	ns	0.9996	C-E		
2% vs. 4%	-4.28	-13.84 to 5.276	No	ns	0.712	D-E		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
Control vs. SOFTY	99.19	85.1	14.09	3.618	10	10	5.508	50
Control vs. 1%	99.19	92.35	6.849	3.464	10	12	2.796	50
Control vs. 2%	99.19	88.73	10.46	3.464	10	12	4.271	50
Control vs. 4%	99.19	93.01	6.181	3.535	10	11	2.473	50
SOFTY vs. 1%	85.1	92.35	-7.243	3.464	10	12	2.957	50
SOFTY vs. 2%	85.1	88.73	-3.631	3.464	10	12	1.483	50
SOFTY vs. 4%	85.1	93.01	-7.912	3.535	10	11	3.165	50
1% vs. 2%	92.35	88.73	3.612	3.303	12	12	1.546	50
1% vs. 4%	92.35	93.01	-0.6686	3.377	12	11	0.28	50
2% vs. 4%	88.73	93.01	-4.28	3.377	12	11	1.792	50

CAPÍTULO VI

6.DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizó síntesis química asistida por ultrasonido de Ag₂S con PEG y se obtuvieron nanopartículas esféricas que se muestran de manera aglomerada en la caracterización TEM. Mendoza y colaboradores realizaron una revisión sistemática en el 2021, encontraron que las nanopartículas de Ag₂S pueden ser utilizadas en biomedicina debido a sus propiedades antimicrobianas contra una amplia gama de microorganismos Gram positivos y Gram negativos y por su baja citotoxicidad con diversas células (Mendoza, et. al, 2021).

Estudios hacen referencia que las nanopartículas de Ag₂S son unas de las mejores candidatas para aplicaciones biológicas. Las nanopartículas de Ag₂S sintetizadas con PEG funciona como agente de protección, ya que el PEG desempeña un papel importante porque reduce el grado de opsonización y proporciona una excelente estabilidad a largo plazo (Prasanth et. al, 2018).

Dentro de esta investigación se realizó un ensayo de difusión en agar donde se fabricaron muestras de acondicionador de tejidos con diferentes concentraciones de nanopartículas de Ag₂S con PEG y como resultado se obtuvo un efecto fungistático de *Candida albicans* ya que no creaba un halo de inhibición, únicamente no crecía por debajo de las muestras, es decir, solamente crecía en las muestras que no tenían nanopartículas de Ag₂S.

Dentro de la literatura hay estudios donde se ha demostrado el uso de diferentes acondicionadores de tejidos con diversos materiales para evitar la contaminación de la prótesis totales, por ejemplo; existe un estudio donde se evalúa el uso del Carvacol a través de ensayos de difusión en disco, donde se realizaron discos de 5 mm de diámetro y 1 mm de espesor y el Carvacol fue incorporado dentro del material exponiéndolo a diferentes cepas; una de ellas fue la *Candida albicans* y se

obtuvieron como resultados una zona de inhibición de $34,00 \pm 1,73$ mm (Baygar et. al, 2018).

Otro estudio demuestra la incorporación de agentes antifúngicos a revestimientos elásticos como la nistatina, en este estudio informaron que la incorporación de aceite de árbol de té al revestimiento blando de las prótesis totales redujo significativamente el crecimiento de *Candida albicans* (Pachava et.al, 2015).

En esta investigación también se realizó un ensayo de microdilución donde se muestra que el grupo control tiene diferencia significativa con los grupos al 1%, 2%, 4% y el grupo que únicamente contiene Softy. En estudios realizados con diferentes nanopartículas como el óxido de cobre (CuO) mostraron que inhibieron con éxito el crecimiento de las cepas estándar probadas de *Candida albicans* y *Streptococcus spp.* Los autores aseveran que la incorporación de nanopartículas de CuO a una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ en los revestimientos blandos exhibió una actividad significativa del 75% en la inhibición de *Candida albicans* (Ansarifard et. al, 2021).

Den y colaboradores utilizaron el método *in situ* para sintetizar nanopartículas de plata en revestimiento acrílicos blandos para obtener efectos antifúngicos. Se prepararon revestimientos blandos a diferentes porcentajes en peso de 2-etilhexanoato de plata (0%, 0.1%, 0.2%, 0.3%) en 10 mm x 10 mm x 3 mm, después de 3,7, y 14 días de almacenamiento en agua se midió la tasa antifúngica. Obtuvieron como resultado que las Nps de Ag quedaron distribuidas uniformemente y la tasa antifúngica aumento a medida que aumento la concentración de plata, mientras que la tasa antifúngica disminuyó con el tiempo de almacenamiento (Den, et al., 2021).

De los estudios más recientes dentro de la literatura Ferreira y colaboradores publicaron un artículo en 2022, que muestra la evaluación *in vitro* a largo plazo de revestimientos dentales blandos incorporados con nanopartículas de Zeolita de plata y Zinc, donde se tomaron 72 muestras a diferentes concentraciones de estas nanopartículas (0,5% y 2%) y con Fluconazol al 5%. Se utilizaron dos revestimientos

que se encuentran en el mercado (Viscogel y el revestimiento de marca GC) y se midieron los diámetros de inhibición al día 1, día 7, día 15 y día 30. Los autores concluyeron que las nanopartículas de Zeolitas de plata y zinc pueden ser incorporadas a los revestimientos blandos y que el fluconazol es la opción indicada para una actividad antifúngica a corto plazo, mientras que la concentración de nanopartículas de Zeolita de plata y zinc al 2% es indicada a largo plazo (Ferreira, et. al, 2022).

CAPÍTULO VII

7. CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados que se obtuvieron en este trabajo se puede concluir que se acepta la hipótesis establecida ya que las nanopartículas de Ag₂S con PEG fueron sintetizadas por método de ultrasonido y fueron óptimas para esta investigación.

En el presente estudio se realizó un ensayo de difusión en agar donde fueron fabricados discos de acondicionador de tejidos enriquecidos con Ag₂S con PEG a diferentes concentraciones y los resultados indican que existe un efecto fungistático, ya que no hay halo de inhibición de *Candida albicans* como tal, únicamente no replica por debajo de los discos, mientras que en el ensayo de microdilución analizado por una prueba Post-Hoc Tukey test en la cual se encontró que el grupo control tiene diferencia significativa con los grupos al 1%, 2% ,4% y grupo de acondicionador Softy. Con esto se puede concluir que las Nps de Ag₂S con PEG son favorables para la inhibición de *Candida albicans*, sin embargo es necesario realizar más estudios y más pruebas para llegar al resultado esperado y posteriormente que exista un biomaterial comercial para prótesis totales con efecto antimicrobiano y que el uso de nanopartículas sea una tecnología para favorecer los materiales dentales y por consiguiente favorecer la calidad de vida de los pacientes.

Este trabajo será importante para futuras investigaciones.

4 REFERENCIAS

Abu-Elteen, K. H., & Abu-Alteen, R. M. (1998). The prevalence of *Candida albicans* populations in the mouths of complete denture wearers. *The new microbiological*, 21(1), 41–48.

Acosta-Torres, L. S., Flores-Arriaga, J. C., Serrano-Díaz, P. N., González-García, I. A., Viveros-García, J. C., Villanueva-Vilchis, M. D. C., Villanueva Sánchez, F. G., García Contreras, R & Arenas-Arrocena, M. C. (2021). Antifungal biomaterial for reducing infections caused by *Candida albicans* in edentulous patients. *Gaceta médica de México*, 157(4), 437-442.

Alikarami S., Soltanizade A., Rashchi F. (2022). Photocatalytic activity of the visible-light-driven spherical Ag₂S modifying the CdS synthesized by the facile chemical methods for the degradation of methylene blue and rhodamine B, *Materials Chemistry and Physics*, 285, 126174. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.126174>.

Altarawneh, S., Bencharit, S., Mendoza, L., Curran, A., Barrow, D., Barros, S., Preisser, J., Loewy, Z. G., Gendreau, L., & Offenbacher, S. (2013). Clinical and histological findings of denture stomatitis as related to intraoral colonization patterns of *Candida albicans*, salivary flow, and dry mouth. *Journal of prosthodontics: official journal of the American College of Prosthodontists*, 22(1), 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2012.00906.x>

Ansarifard, E., Zareshahrabadi, Z., Sarafraz, N., & Zomorodian, K. (2021). Evaluation of Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Copper Oxide Nanoparticles within Soft Denture Liners against Oral Pathogens. *Bioinorganic chemistry and applications*, 9939275. <https://doi.org/10.1155/2021/9939275>

Arora, S., Jain, J., Rajwade, J M., & Paknikar, K. M. (2008). Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters*, 179(2), 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.04.009>

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/1016/j.pha.2015.11.005>

Barata D, Durán A, Carrillo S. (2022). Estomatitis protésica. Aspectos clínicos y tratamiento. *Prof. dent.* 5(10): 622-627.

Baygar, T., Ugur, A., Sarac, N., Balci, U., & Ergun, G. (2018). Functional denture soft liner with antimicrobial and antibiofilm properties. *Journal of dental sciences*, 13(3), 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2017.10.002>

Bengel W., Bornstein M. M., (2011). Candidiasis orales. Parte 2: Diagnóstico, diagnóstico diferencial y tratamiento. *Quintessence*. 24 (1), 50-55

Białożył-Bujak, E., Wyszzyńska, M., Chladek, G., Czelakowska, A., Gala, A., Orczykowska, M., Białożył, A., Kasperski, J., & Skucha-Nowak, M. (2021). Analysis of the Hardness of Soft Relining Materials for Removable Dentures. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(18). <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3390/ijerph18189491>

Barbisan, C. R. (2021). Definición de Concentración Química. Definición ABC. Desde <https://definicionabc.com/concentracion-quimica/>

Cardoso P. (2016). Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Revista pediátrica del hospital de niños de Buenos Aire*; 58(260):19-28.

Chaudhary, J., Tailor, G., Shailesh, S.K., Kumar, D., Characterization Techniques used in Nanomaterials -A Review (2016). *Journal of Environmental Nanotechnology*; (5) No.2

Christine Kranz, Boris Mizaikoff,(2019) Nanomaterials | Characterization Methods, Editor(s): Paul Worsfold, Colin Poole, Alan Townshend, Manuel Miró, Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition), Academic Press, 98-107, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13994-0>.

Dadar M., Tiwari R., Karthik K., Chakraborty S., Shahali Y., Dhama K. Candida albicans - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update, *Microbial Pathogenesis*, (117), 128-138, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028>.

Deng, J., Ren, L., Pan, Y., Gao, H., & Meng, X. (2021). Antifungal property of acrylic denture soft liner containing silver nanoparticles synthesized in situ. *Journal of dentistry*, 106, 103589. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2021.103589>

Dorocka-Bobkowska, B., Medyński, D., & Pryliński, M. (2017). Recent advances in tissue conditioners for prosthetic treatment: A review. *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University*, 26(4), 723–728. <https://doi.org/10.17219/acem/62634>

Ferreira, A. N., D'Souza, K., Aras, M., Chitre, V., Parsekar, S., & Pinto, M. (2022). Long term antifungal efficacy of silver-zinc zeolite nanoparticles incorporated in two soft denture liners - An *in vitro* assessment. *Dental research journal*, 19, 12. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.338775>

Garcia-Contreras, R & Rodríguez-Torres, M. D. P. & Arenas-Arocena, M. C. & Acosta-Torres, L. & Millán, B. (2019). Manual para la enseñanza práctica de los ensayos de susceptibilidad antifúngica de nanopartículas.

Garcia, L. T., & Jones, J. D. (2004). Soft liners. *Dental clinics of North America*, 48(3), 709–vii. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2004.03.001>

Garner, S. J., Nobbs, A. H., McNally, L. M., & Barbour, M. E. (2015). An antifungal coating for dental silicones composed of chlorhexidine nanoparticles. *Journal of dentistry*, 43(3), 362–372. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.12.005>

Gendreau, L., & Loewy, Z. G. (2011). Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *Journal of prosthodontics: official journal of the American College of Prosthodontists*, 20(4), 251–260. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x>

Gow, N., & Yadav, B. (2017). Microbe Profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiology (Reading, England)*, 163(8), 1145–1147. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000499>

Gregorí, B.S (2005). Estructura Y Actividad De Los Antifúngicos, Vol. 39 ISSN 0034-7515. *Versión On-Line* ISSN 1561-2988.

Grela E., Kozłowska J., Grabowiecka A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria – A review, *Acta Histochemica*, 120(4), 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>

Gulati, M., & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and infection*, 18(5), 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>

Gunawan G., Sinaga D., Djunaidi M. CH., Haris A. (2022) Variation of annealing temperature with excess of NaOH concentration on Ag₂S synthesis from argentometry titration waste as NTC thermistor, *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.03.553>.

Jie Deng, Lingyan Ren, Yahui Pan, Hai Gao, Xiangfeng Meng. (2021). Antifungal property of acrylic denture soft liner containing silver nanoparticles synthesized in situ, *Journal of Dentistry*, (106) 103589, <https://doi.org/10.1016/j.ident.2021.103589>.

Jindal, A. K., Pandya, K., & Khan, I. D. (2015). Antimicrobial resistance: A public health challenge. *Medical journal, Armed Forces India*, 71(2), 178–181. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.04.011>

Kavitha K., Vijaya N., Krishnaveni A., Arthanareeswari M., Susai Rajendran, Abdulhameed Al-Hashem, A. Subramania, Chapter (2020) 19 - Nanomaterials for

antifungal applications, Editor(s): Micro and Nano Technologies, Nanotoxicity, Elsevier, (pp.385-398), ISBN 9780128199435, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819943-5.00019-1>.

Kranz, Christine & Mizaikoff, Boris. (2018). Nanomaterials: Characterization Methods. 10.1016/B978-0-12-409547-2.13994-0.

Kinkela Devcic, M., Simonic-Kocijan, S., Prpic, J., Paskovic, I., Cabov, T., Kovac, Z., & Glazar, I. (2021). Oral Candidal Colonization in Patients with Different Prosthetic Appliances. *Journal of fungi* 7(8), 662. <https://doi.org/10.3390/jof7080662>

Lee, Y., Puumala, E., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2021). Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. *Chemical reviews*, 121(6), 3390–3411. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00199>

Lewis, M., & Williams, D. W. (2017). Diagnosis and management of oral candidosis. *British dental journal*, 223(9), 675–681. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2017.886>

Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. (2017) Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. 16(1):19-31.

Melvin P. Weinstein, MD (2018) M02 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 13.^a Edición (ISBN 1-56238-834-7)

Mendoza Avilés, A., Mendoza Ornelas, M., Andrade Martínez, L., Miranda Fernández, H., Mares Muñoz, S., Vilchis Valadez, E., Castañeda Cisneros, J., & Arenas-Arrocena, M.C (2021). Biocompatibilidad y actividad microbiana de sulfuro de plata nanoestructurado para la aplicación en biomateriales: revisión sistemática. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 14(27), 1e-14e.

Millsop, J. W., & Fazel, N. (2016). Oral candidiasis. *Clinics in dermatology*, 34(4), 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.02.022>

Mousavi, S. A., Ghotaslou, R., Kordi, S., Khoramdel, A., Aeenfar, A., Kahjough, S. T., & Akbarzadeh, A. (2018). Antibacterial and antifungal effects of chitosan nanoparticles on tissue conditioners of complete dentures. *International journal of biological macromolecules*, 118(Pt A), 881–885.

Muttagi, S., & Subramanya, J. K. (2017). Effect of incorporating seed oils on the antifungal property, surface roughness, wettability, weight change, and glucose sorption of a soft liner. *The Journal of prosthetic dentistry*, 117(1), 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2016.05.010>

Neppelenbroek, K. H., Lima, J. F. M., Hotta, J., Galitesi, L. L., Almeida, A. L. P. F., & Urban, V. M. (2018). Effect of Incorporation of Antifungal Agents on the Ultimate Tensile Strength of Temporary Soft Denture Liners. *Journal of Prosthodontics*, 27(2), 177–181. <https://doi.org/10.1111/jopr.12660>

Pachava KR, Nadendla LK, Alluri LSC, Tahseen H., Sajja NP (2015) “Evaluación antifúngica in vitro del forro dental suave incorporado con aceite de árbol de té: un nuevo enfoque terapéutico para la estomatitis protésica *Journal of Clinical Diagnostic Research*, 9, 62 – 64.

Panda, S, K., N., Manual, L., Krishna, C., Jagadeesh, K, N., Saidath, K., & Babaji, P. (2021). An in vitro evaluation of tensile bond strength of soft liners bonded to different denture base resins. *Annals of African Medicine*, 20(2), 116-120.

Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., & Alastruey-Izquierdo, A. (2017). The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet. Infectious diseases*, 17(12), e383–e392. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30316-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30316-X)

Pfaller, Michael & Chaturvedi, V. & Espinel-Ingroff, A. & Ghannoum, Mahmoud & Gosey, L.L. & Odds, F.C. (2008). Reference method for broth dilution antifungal

susceptibility testing of yeasts: approved standard-second edition. CLSI document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4). Clin Lab Stand Inst. 22. 1-51.

Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. (2002) Denture stomatitis and salivary Candida in Brazilian edentulous patients. *Journal of Oral Rehabilitation*;29: 1115-9.

Plastun, I, L., Zakharoy, A, A., & Naumov, A, A, (2020). Features of Silver Sulfide Nanoparticles Bacterial Synthesis: Molecular Modeling. 2020 International Conference on Actual Problems of Electron Devices Engineering (APEDE), Actual Problems of Electron Devices Engineering (APEDE), 2020 International Conference on Actual Problems Of, 318-322
<https://doi.org/10.1109/APEDE48864.2020.9255570>

Prasanth, S., RitheshRaj, D., Vineeshkumar, T. V., & Sudarsanakumar, C. (2018). Spectroscopic exploration of interaction between PEG-functionalized Ag₂S nanoparticles with bovine serum albumin. *Chemical Physics Letters*, 700, 15–21.
<https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.cplett.2018.04.004>

Quevedo, A. C., Guggenheim, E., Briffa, S. M., Adams, J., Lofts, S., Kwak, M., Lee, T. G., Johnston, C., Wagner, S., Holbrook, T. R., Hachenberger, Y. U., Tentschert, J., Davidson, N., & Valsami-Jones, E. (2021). UV-Vis Spectroscopic Characterization of Nanomaterials in Aqueous Media. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (176), 10.3791/61764. <https://doi.org/10.3791/61764>

Ramsden, J. (2016). *Nanotechnology: an introduction* (Second edition). William Andrew)

Ramchander M, Ragini G, (2021) Microscopic techniques for characterisation of nanomaterials: A minireview, *Materials Today: Proceedings*, 47(14), 4753-4757, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.05.665>

Rempel, S. V., Aleksandrova, N. N., Kuznetsova, Y. V. & Gerasimov, E. Y. (2016). Influence of the size and charge of nonstoichiometric silver sulfide nanoparticles on

their interaction with blood cells. *Inorganic Materials*, 52(2), 101–105.
<https://doi.org/10.1134/S0020168516020126>

Richardson, J. P., Moyes, D. L., Ho, J., & Naglik, J. R. (2019). Candida innate immunity at the mucosa. *Seminars in cell & developmental biology*, 89, 58–70.
<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.02.026>

Ruzer, L. S. (2017). *Nanoparticles in humans: experiments, methods, and strategies*. Pan Stanford Publishing.

Sadovnikov, S. I., Kuznetsova, Y. V., & Rempel, A. A (2018). Ag₂S silver sulfide nanoparticles and colloidal solutions: Synthesis and properties. *Nano-Structure & Nano-Objects*, 7, 81-91. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2016.06.004>

Schwirn, K. Tietjen, L. Beer, I. (2014) Why are nanomaterials different and how can they be appropriately regulated under REACH?, *Environmental Sciences Europe*; 26: 1-9.

Sheposh, R. (2021). Nanoparticle. *Salem Press Encyclopedia of Science*.

Velazco, G., Ortiz, R., Bustillos, L., Gonzalez, A., & Solorzano, E. (2009) Análisis Estructural De Un Acondicionador De Tejido Utilizado Para El Tratamiento De La Estomatitis Subprotésica. *Acta Microscopica*, 18(3), 232-236.

Vilchis Valadez, E. P., & Arenas Arrocena, M.C. (2022). Efecto antifúngico de nanopartículas de sulfuro de plata en candida albicans para la aplicación en acondicionadores de tejido. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02029a&AN=tes.TES01000823636&lang=es&site=eds-live>

Wang, G., Liu, J., Zhu, L., Guo, Y., & Yang, L. (2019) Silver sulfide nanoparticles for photodynamic therapy of human lymphoma cells: Via disruption of energy metabolism. *Royal Society of Chemistry Advances*, 9(51), 29936–29941.
<https://doi.org/10.1039/c9ra05432d>

Wang, T., Pan, M., Xiao, N., Wu, J., Wang, Q., Cheng, T., Yan, G., Wu, D., Li, N., & Shao, J. (2021). In vitro and in vivo analysis of monotherapy and dual therapy with ethyl caffeate and fluconazole on virulence factors of *Candida albicans* and systemic candidiasis. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 27, 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.10.005>

Wang Y. (2015). Investigando la infección por *Candida albicans*, la respuesta del huésped y las estrategias antifúngicas. *Virulencia*, 6 (4), 307-308. <https://doi.org/10.1080/21505594.2014.1000752>

Xoca-Orozco L.A., González-Carmona C. A., García-Salamanca B. L., Ibarra-Chávez D. M., Sierra N. P., Arenas-Arrocena M.C., & Rougon-Cardoso A. (2019) In vitro inhibition of phytopathogens with silver sulfide nanoparticles, XVIII National Plant Biochemistry and Molecular Biology Congress, 28 al 31 octubre. Mérida Yucatán.

Yamamoto T. (2010). *Rinsho byori. The Japanese journal of clinical pathology*, 58(10), 1027–1034.

ANEXOS

La tabla 1A muestra los resultados del ensayo de microdilución en cuanto a inhibición donde se observa que existe mayor inhibición en los grupos al 1%, 2% y 4% que en la muestra que únicamente tiene Softy.

Tabla 1A. Resultados de ensayo de microdilución ajustados en % en cuanto inhibición

Softy	inhibición (%)		
	1%	2%	4%
85.10	91.63	93.72	93.10
84.86	91.87	93.60	93.23
84.73	91.75	93.47	93.35
85.10	92.00	93.72	92.98
85.72	91.87	94.09	92.98
85.10	92.24	93.60	92.61
84.86	92.61	93.60	92.98
84.73	92.61	93.47	92.61
85.10	92.49	93.72	92.98
85.72	92.37	93.47	93.23
	93.23	93.60	93.10
	93.47	93.23	93.23