



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA
AVANZADA**

**EFFECTO ANTIFÚNGICO DE NANOPARTÍCULAS
DE PLATA EN MATERIALES DE
POLI(METIL METACRILATO) - ANATASA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN TECNOLOGÍA

P R E S E N T A :

TERESA GÓMEZ QUINTERO

DIRECTORES DE TESIS:

**DRA. LAURA S. ACOSTA TORRES,
ENES CAMPUS LEÓN, UNAM
DR. VÍCTOR M. CASTAÑO MENESES
CFATA, UNAM**



JURIQUILLA, QUERÉTARO, 2014



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA LICENCIATURA EN TECNOLOGÍA

Votos Aprobatorios

COMITÉ ACADÉMICO
Licenciatura en Tecnología
PRESENTE

En cumplimiento del Artículo 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis con título **Efecto antifúngico de nanopartículas de plata en materiales de poli(metil metacrilato)-anatasa**, que realizó el (la) pasante **Gómez Quintero Teresa**, con número de cuenta: **40801300-0**, bajo la opción de titulación por Tesis y Examen profesional en la carrera de Licenciatura en Tecnología.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Campus UNAM-Juriquilla, Qro a 14 de Marzo de 2014

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Luz María López Marín	
SECRETARIO	Dra. Laura Susana Acosta Torres	
VOCAL	Dra. Genoveva Hernández Padrón	
1er. SUPLENTE	Dra. Ma. Concepción Arenas Arrocena	
2º SUPLENTE	Dr. Pedro Salas Castillo	

Agradecimientos

Por su apoyo técnico en preparación y análisis de muestras:

A la Dra. Genoveva Hernández Padrón, la Dra. Marina Vega González; el Mtro. Francisco Fernández, el Mtro. Miguel Ángel Canseco Martínez, el Mtro. Salvador López Morales, la Mtra. Ma. de Lourdes Palma Tirado; la Quím. M. Concepción Arredondo de la Rosa; el Tec. Antonio Prado, el Tec. Daniel Mondragón.

Por su apoyo en complementación de ensayos celulares:

A la Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita, la Q. F. B. Alicia Irasema Mendieta.

Por préstamo de espacio:

A la Dra. Sofía Díaz.

Índice general

Agradecimientos	v
Resumen	5
Abstract	7
1. Introducción	9
1.1. Planteamiento del problema	18
1.2. Justificación	18
1.3. Objetivo general	19
1.4. Objetivos específicos	19
1.5. Hipótesis	19
1.6. Criterios de inclusión	20
1.7. Criterios de exclusión	20
1.8. Criterios de eliminación	20
1.9. Marco teórico	22
1.9.1. Técnicas de caracterización	22
1.9.2. Ensayo de adherencia de <i>Candida albicans</i>	33
1.9.3. Ensayos celulares <i>in vitro</i>	34
2. Materiales y Métodos	39
2.1. Síntesis de materiales	39
2.1.1. Síntesis de PMMA- TiO_2 anatasa	39

2.1.2.	Síntesis de nanoesferas y nanoprismas de plata (AgNPs)	40
2.2.	Técnicas de caracterización	41
2.2.1.	Espectroscopía Infrarroja	42
2.2.2.	Espectroscopía Raman dispersivo	42
2.2.3.	Espectroscopía UV-Vis	43
2.2.4.	Difracción de Rayos X	43
2.2.5.	Microscopía electrónica	44
2.2.6.	Termogravimetría	45
2.2.7.	Calorimetría diferencial de barrido	46
2.3.	Elaboración de acrílicos dentales	46
2.3.1.	Muestreo	46
2.4.	Ensayo de adherencia de <i>Candida albicans</i>	48
2.5.	Ensayos celulares <i>in vitro</i>	49
2.5.1.	Ensayo MTT	49
2.5.2.	Ensayo BrdU	50
3.	Resultados	53
3.1.	Caracterización de nanopartículas de TiO_2 anatasa	53
3.1.1.	IR	53
3.1.2.	Raman dispersivo	54
3.1.3.	UV-Vis	54
3.1.4.	Difracción de rayos X	56
3.1.5.	Microscopía	56
3.2.	Caracterización de PMMA-anatasa	59
3.2.1.	Raman dispersivo	59
3.2.2.	SEM	60
3.2.3.	TGA	62
3.2.4.	DSC	62
3.3.	Caracterización de AgNPs	63
3.3.1.	Síntesis verde	63
3.3.2.	TEM	64

3.3.3. Síntesis de esferas y prismas	64
3.4. Ensayo de adherencia de <i>Candida albicans</i>	68
3.5. Ensayos celulares <i>in vitro</i>	70
3.5.1. MTT	70
3.5.2. BrdU	73
4. Discusión	74
4.1. Caracterización de nanopartículas de TiO_2 anatasa	74
4.2. Caracterización de PMMA-anatasa	74
4.2.1. Síntesis de esferas y prismas	76
4.3. Ensayo de adherencia de <i>Candida albicans</i>	77
4.4. Ensayos celulares <i>in vitro</i>	77
5. Conclusiones	79
Apéndice	80
Preparación de agares	80
Infusión de geranio filtrado	81
Preparación de PBS	81
Sales de MTT	81
Apéndice de logros académicos	82

Resumen

El poli(metil metacrilato)[PMMA] es una resina acrílica ampliamente utilizada en odontología para elaborar prótesis dentales removibles; sin embargo, es un reservorio ideal para la proliferación de microorganismos, entre ellos *Candida albicans*, un hongo presente en todas las personas, causante de estomatitis protésica. No existe en el mercado ningún acrílico que exhiba propiedades antifúngicas, por lo que se buscó desarrollar un material que presente efecto nocivo sobre *Candida albicans* y que resultara inocuo para los portadores de prótesis. Se sintetizó un PMMA con nanopartícula de TiO_2 en fase anatasa y al producto se le adicionó nanopartículas de plata [AgNPs] de forma esférica o prismática, las cuales se obtuvieron a partir de un agente reductor de geranio o borohidruro de sodio. Se evaluó la adherencia de *Candida albicans*, se realizaron los ensayos de citotoxicidad (MTT) y (BrdU) sobre cada grupo experimental y se comparó con un acrílico comercial (Nature Ceryl). Los resultados mostraron que el PMMA adicionado con AgNPs cuyo agente reductor fue geranio resultó ser el de menor adherencia del hongo y no hubo diferencia significativa en los ensayos de inocuidad celular con respecto a Nature Ceryl.

Abstract

The poly(methyl methacrylate)[PMMA] is a widely used acrylic resin in dentistry to produce removable dentures, ideal reservoir to microorganism proliferation, like *Candida albicans*, a fungus present in all the people and promotes prosthetic stomatitis. There is no commercial acrylic resin with fungicidal properties in the market, therefore sought to develop a material without adverse effect (or fungicidal activity) on *Candida albicans* and at the same time it proves to be innocuous to the denture wearer. It was synthesized a PMMA with nanoparticles of anatase crystalline phase (TiO_2) and it was added with spherical and prismatic silver nanoparticles (AgNPs), the nanoparticles were synthesized by a reducing agent of geranium and other by sodium borohydride. It was evaluated the adherence of *Candida albicans* on the acrylics; a cytotoxicity assays (MTT) and (BrdU) were realized for all the experimental groups and the results were compared with a commercial acrylic (Nature Cryl). The result showed that the PMMA with AgNPs by a reducing agent of geranium had lower adhesion of the fungus and there were no significant difference between this PMMA and the Nature Cryl assays of cell viability.

Capítulo 1

Introducción

La cavidad oral esta expuesta al medio ambiente externo y sus condiciones se encuentran en constante cambio (pH, temperatura, presencia de bacterias, etc.). En condiciones normales, la cavidad oral es bastante tolerante y resistente a factores externos. El diseño anatómico de dientes y tejidos asociados provee resistencia frente a condiciones hostiles como la presencia de enfermedades, traumas, condiciones fisiológicas inaceptables (relacionadas con inmunosupresión), etc., que pueden modificar la función y estructura de los elementos de esta cavidad [1]. La pérdida de funciones o elementos estructurales nos lleva a la necesidad de reponer tejidos, en donde las prótesis dentales juegan un papel muy importante. El diseño y la elaboración de las prótesis dentales conllevan estudios acerca de la biocompatibilidad, funcionalidad clínica y longevidad, permitiendo así a los usuarios mejorar su calidad de vida, apariencia estética y salud [2]. Existen cuatro grupos de materiales ampliamente usados en odontología para la elaboración de prótesis o reposición de tejidos: metales y aleaciones; cerámicas; polímeros sintéticos orgánicos y biopolímeros (derivados de tejidos naturales) y compositos (una matriz orgánica de diferentes tipos de polímeros rellena con partículas finas inorgánicas). A pesar de que los metales y aleaciones fueron los primeros en utilizarse, el uso de polímeros, compositos y materiales inorgánicos se ha incrementado progresivamente debido a que las aleaciones de metales no preciosos pueden ser químicamente inestables en la cavidad oral, produciendo complicaciones biológicas; detalles estéticos; alto costo de materiales, etc.

El uso de polímeros en odontología se remonta al siglo XIX, el primer polímero rígido empleado fue el poli(metil metacrilato) (PMMA), que se utilizaba en bases de dentaduras, dientes artificiales, ortodoncia removible, férulas quirúrgicas, entre otros [3]. Para saber si un material puede ser utilizado en un medio biológico es necesario revisar sus propiedades intrínsecas y valorar si la exposición al tejido, células y componentes bioquímicos del huésped (paciente) no presentan una respuesta adversa al ponerse en contacto con el material en cuestión, si la respuesta del huésped es positiva y el material probado tampoco se ve afectado por los componentes del medio, podemos llamarlo biocompatible; el PMMA ha resultado ser un excelente biomaterial tanto en odontología como en cirugía general, un material con diversas aplicaciones biomédicas [4]. En odontología las prótesis se clasifican en dos grupos: removibles y fijas; donde las removibles pueden ser totales y parciales (en contacto con encías y sostenida entre dientes, figura 1.1); la fijas son una combinación de polímeros y cerámicas. Generalmente las bases de prótesis removibles son rígidas, preparadas con



Figura 1.1: Ejemplo de prótesis removible total (izquierda) y parcial (derecha).
*[Imágenes de Ultimate Dental y Mahendra Dental Hospitals]

PMMA, pues es estable en el ambiente oral a pesar de absorber un poco de agua y ser frágil; el PMMA se puede usar en sistemas termopolimerizables (usando peróxido de benzoílo como iniciador) o fotopolimerizables (utilizando lámparas o diodos para producir los radicales libres). Los métodos de síntesis polimérica se clasifican en dos categorías: polimerización por adición (reacción de cadena) y polimerización por condensación (crecimiento por pasos); el PMMA es un claro ejemplo de polimerización por adición. En esta categoría, el monómero insaturado reacciona a través de estados de iniciación, propagación y terminación para la obtención del polímero,

los iniciadores pueden ser radicales libres, cationes, aniones, etc. Este iniciador abre la doble cadena del monómero exhibiendo un punto de iniciación en el lado opuesto de la cadena del monómero para continuar el crecimiento. La reacción mediada por peróxido de benzoílo (R) es la siguiente, figura 1.2:

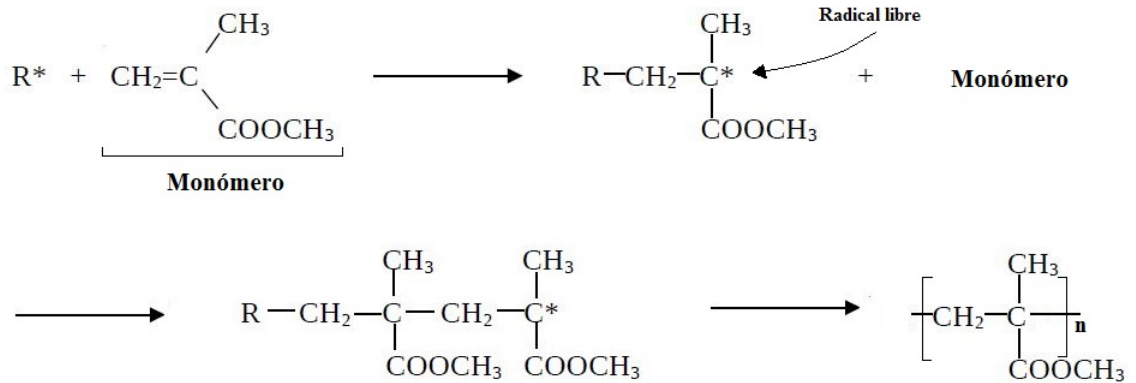


Figura 1.2: Síntesis de PMMA por adición.

En la síntesis por condensación, dos moléculas de monómero forman enlaces covalentes perdiendo partes de sus moléculas en forma de productos secundarios (agua, metanol, dióxido de carbono, etc.), creciendo el polímero paso a paso. La ruta de síntesis afectará significativamente las propiedades del polímero obtenido. Generalmente las polimerizaciones por radical libre, dentro de la categoría de adición, el peso molecular de las cadenas poliméricas es difícil de controlar; sin embargo, la estructura puede controlarse muy precisamente utilizando polimerización aniónica. Además, los polímeros obtenidos por adición pueden ser homopolímeros (como el PMMA, con solo una especie de monómero) o copolímeros (donde en la cadena hay dos o varias especies de monómero); por su composición homopolimérica, el PMMA se caracteriza por ser denso y cristalino [5].

Debido a la interacción entre la prótesis y las encías, u otros tejidos circundantes, una prótesis dental puede convertirse en el reservorio ideal para la proliferación de

microorganismos, pues modifica las condiciones naturales de las encías; además de contribuir a la acumulación de residuos alimenticios (por una higiene bucal deficiente) [6]. Una de las afecciones más comunes en personas que utilizan prótesis removibles es la estomatitis protésica (estomatitis hipertrófica) causada por *Candida albicans*, microorganismo presente en la piel y mucosas del 80 % de la población mundial [7]. *Candida albicans* es un organismo dimórfico que se puede encontrar en forma de levadura o micelio, según las condiciones del medio donde se desarrolle. Generalmente no se desarrolla en forma negativa, pero si prolifera lleva al portador a un cuadro de Candidiasis oral como el que se muestra en la figura 1.3, que se cura fácilmente en condiciones normales. Sin embargo, cuando el sistema inmune está comprometido (pacientes inmunodeprimidos), una infección por *Candida albicans* resulta muy peligrosa, con una tasa de incidencia y mortalidad mayores en pacientes con VIH, pacientes que reciben quimioterapia, personas que recibieron un trasplante de órganos, ancianos, etc. [8].



Figura 1.3: Infección oral producida por *C. albicans*. *[Imagen de infoets.blogspot]

Las fungemias han aumentado en la última década, *Candida* es el cuarto microorganismo recuperado en los hemocultivos realizados a pacientes, aproximadamente el 50 % de los episodios son ocasionados por *Candida albicans* [9]. Hay estudios que sugieren que hasta un 70 % de las micosis a nivel mundial son promovidas por esta especie [10]. Entre el 60-65 % de los casos de estomatitis protésica se encuentran asociados a *Candida*, presentan síntomas claros de la afección, si consideramos a todos los portadores de prótesis que no manifiestan signos de inflamación pero sí un cuadro

de candidiasis el porcentaje se eleva hasta un 75%; *Candida albicans* destaca por el proceso inflamatorio que produce en los pacientes y por su habilidad de fijarse a tejidos duros y blandos de la cavidad oral, contribuyendo a la formación de un biofilm bacteriano (capa blanca conformada por células epiteliales descamadas, fibrinas, leucocitos, pseudohifas y levaduras). Por lo general esta llega a los pacientes en forma levaduriforme y prolifera bajo deficiencias del sistema del huésped atrofiando las células epiteliales; otros ejemplos de potenciales cuadros de candidiasis son los portadores diabéticos, personas con anemia ferropénica, altos niveles de colesterol o xerostomía. Las levaduras de *Candida* se fijan fácilmente a bajos niveles de pH (óptimo en 3), que beneficia la actividad enzimática de proteinasas y lipasas, causantes de la virulencia de *Candida albicans*. La capacidad de este hongo para atravesar tejidos e instalarse se explica por medio de la interacción de ligandos de *Candida* y los receptores de las células huésped. Las levaduras tienen manoproteínas (como material polimérico extracelular) presentes en su superficie celular que interactúan directamente con el epitelio, específicamente con las fucosas (polisacáridos de seis carbonos y un grupo aldehído perteneciente a desoxialdosas) de N-acetilglucosamina de las proteínas de superficie de las células epiteliales [11]. Debe considerarse que las manoproteínas de la pared celular de *Candida* son activadoras de las células CD8 y deprimen la actividad de CD4, los pacientes con sistema inmunológico suprimido tienen un mayor riesgo de desarrollar candidiasis debido al déficit de linfocitos CD4-macrófago, la frecuencia y gravedad de la infección dependerá entonces de la presencia de estas células en la sangre. Estudios muestran recuentos menores a 400 linfocitos CD4/ μl ; pacientes VIH positivos requieren tratamientos largos para preservar la función fagocitaria de neutrófilos y la buena producción de anticuerpos contra el antígeno de 47 kDa de *Candida* [12].

Recientemente, se propone utilizar nanomateriales para combatir enfermedades o afecciones comunes, por ejemplo, el óxido de titanio (TiO_2) en fase cristalina anatasa; el cual ha mostrado realizar foto-oxidación sobre compuestos orgánicos. El dióxido de titanio es un material importante debido a sus diversas aplicaciones, entre ellas destaca la foto-catálisis, células fotovoltaicas, pigmentos blancos, cosméticos, revesti-

mientos, etc. [13]. En la naturaleza se encuentra principalmente en tres fases cristalinas: anatasa, rutilo y brookita, cada una con propiedades físico-químicas diferentes, lo que le permite utilizarse en diferentes ámbitos. Como material en bulto, la fase rutilo es la más estable termodinámicamente, pero a escalas nanométricas los efectos de energía superficial y la química de solución donde se sintetiza el TiO_2 transforma la fase, tamaño y forma dependiendo del pH, por lo que ciertas preparaciones confieren mayor estabilidad térmica incluso a nanopartículas de TiO_2 en fase anatasa [14]. Estudios muestran que células microbiales en agua son aniquiladas cuando se exponen a nanopartículas de anatasa dopadas con diversos elementos, además de la eliminación de otros contaminantes orgánicos. La foto-oxidación se ha convertido en un intento de terapia médica enfocada a la eliminación de células cancerosas, como el caso de células tumorales eritroleucémicas, para las cuales nanopartículas de anatasa dopadas con platino u oro resultan ser una excelente alternativa para la eliminación experimental de células malignas en tratamientos de cáncer [15]. A pesar de ser la fase metaestable del TiO_2 , es un compuesto termoestable más allá de los 300°C y se ha evaluado la conservación de su fase hasta 550°C . Estudios sobre su efecto fotocatalítico muestran su estabilidad nanométrica por encima de los 600°C [16]. A continuación, en la figura 1.4 se muestran las dos fases más utilizadas del TiO_2 , donde las esferas azules representan los átomos de titanio.

Como los nanomateriales presentan propiedades físicas, químicas y biológicas muy diferentes a las de los materiales en bulto, los métodos de síntesis de nanopartículas de metales nobles son un campo de constante interés; encontrar nuevas aplicaciones para tales nanopartículas es una de las nuevas rutas de investigación en catálisis, electrónica, óptica, marcaje biológico, ambiental y biotecnología. Las nanopartículas más utilizadas en estas aplicaciones son aquellas más estables en dispersión, que son las nanopartículas de oro, plata y cobre. Además, las nanopartículas metálicas tienen absorción de resonancia de plasmón superficial en la región UV-Vis. La banda superficial de plasmón surge de la existencia coherente de electrones libres en la banda de conducción, por el tamaño pequeño de partícula. El desplazamiento de esta banda depende del tamaño de partícula, ambiente químico circundante, especies adsorbidas en superficie y de su constante dieléctrica. Comúnmente, estas nanopartículas pueden

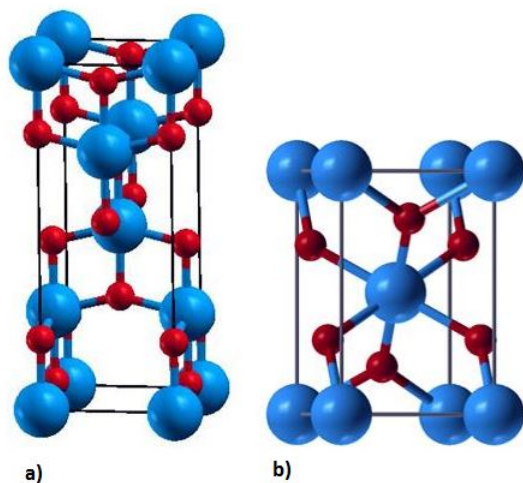


Figura 1.4: Fases cristalinas de TiO_2 : a) anatasa, b) rutilo. *[Imagen de Creative Commons]

prepararse y estabilizarse por métodos físicos y químicos; entre los métodos químicos se encuentran la reducción química, técnicas electroquímicas y reducción fotoquímica como los más utilizados. El diseño del método de síntesis influye en el tamaño, morfología, estabilidad y propiedades controlables que hacen mucho más interesante el campo de investigación. Unas de las nanopartículas que han incursionado en el campo de las ciencias biomédicas son las nanopartículas de plata (AgNPs) dado que poseen propiedades antimicrobianas importantes, buena conductividad iónica, actividad catalítica y estabilidad química considerable (dependiendo del método de síntesis). El método tradicional para la obtención de coloides de nanopartículas de plata es la reducción química, usando como agentes reductores borohidruro, citrato, ascorbato e hidrógeno elemental. La reducción de iones de plata (Ag^+) en solución acuosa por lo general entrega nanopartículas con diámetros de diversos nanómetros, cuando las partículas coloidales son mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz visible se tiene una solución amarilla con una banda intensa entre los 380-400 nm y otra banda menor a lo largo del espectro, esta banda es la excitación colectiva del gas de electrones de las nanopartículas, con un cambio periódico en la densidad

electrónica de su superficie (absorción de superficie de plasmón). Existen varios métodos de síntesis de AgNPs ampliamente estudiados; recientemente se presta atención a las llamadas síntesis verdes debido a su bajo costo de producción (utilizan menos reactivos que otras rutas de síntesis y se realizan a temperatura ambiente, sin necesidad de equipo especializado) y poseen una buena estabilidad química. Las síntesis verdes son aquellas que utilizan un agente reductor proveniente de un ser vivo, generalmente plantas o microorganismos; extracciones de ciertas partes de una planta (hojas, tallos o raíces) y ciertos hongos y bacterias son utilizados como agentes reductores y mediadores del tamaño y forma de las AgNPs sintetizadas. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre estas infusiones o extracciones se centra sólo en la obtención de las AgNPs y no en el mecanismo de acción de los componentes de la planta o microorganismo, por lo que no está claro cuál es la sustancia o sustancias que se encargan de la reducción del nitrato de plata [17]. Ciertas aproximaciones indican que algunas biomoléculas (enzimas, proteínas, aminoácidos, polisacáridos o vitaminas) combinadas con los iones Ag^+ son las encargadas de la formación de nanopartículas; por ejemplo, hay evidencia de que algunas proteínas juegan el papel reductor y controlan el tamaño y la forma de las AgNPs debido a sus grupos carboxilo o quizás por acción de los remanentes de glutamina de los aminoácidos conformados de tales proteínas [18]. La utilización de diversas variedades de planta de la familia *Geraniaceae* para sintetizar AgNPs se destaca por la alta estabilidad de los productos y un tamaño y forma homogéneo para las nanopartículas en disolución [19].

Como se mencionó anteriormente, uno de los motivos por los que las nanopartículas de plata han incursionado en el campo de la biotecnología y biomedicina es su efecto antimicrobiano; el mecanismo de acción no es del todo entendido, diversos estudios proponen que las AgNPs pueden atacar la superficie de la membrana celular cambiando la permeabilidad y afectando las funciones de respiración celular. Nanopartículas pequeñas tienen dimensiones superficiales que les permite interactuar con bacterias directamente, incluso pueden penetrar dentro del microorganismo. Estudios en proteómica y bioquímica muestran que concentraciones nanomolares de AgNPs pueden aniquilar células de *Escherichia coli* en cuestión de minutos posiblemente debido a

la disipación de la fuerza motriz de los protones, parecida a la actividad antimicrobial de los iones de plata. Bajas concentraciones de Ag^+ promueven la fuga masiva de protones a través de la membrana celular, que modifica la bicapafosfolipídica, degenerándola y llevando las células a la muerte. El efecto antibacterial de estas nanopartículas depende del tamaño y forma; la actividad oxidativa de sus diferentes morfologías esta siendo estudiada. Las implicaciones médicas sobre el uso de estas nanopartículas en humanos están siendo debatidas y estudiadas en diversos tejidos, cultivos, etc., por diversos métodos. Las nanopartículas pueden presentar efectos sobre la salud muy distintos a los del material en bulto, involucrarlas en actividades biológicas puede traer beneficios, daños o una combinación de ambos. Si las nanopartículas se sintetizan muy pequeñas, tienen acceso a la piel, riñones, cerebro, etc. Aun no hay suficientes estudios sobre los efectos en la salud al ser expuestos a nanopartículas, pero se saben algunas cosas importantes, como por ejemplo, si células epiteliales de pulmón humano son expuestas a nanopartículas metálicas las células pueden formar especies reactivas de oxígeno que causarán estrés oxidativo y daño celular [18].

Con respecto al tratamiento de micosis y los agentes antifúngicos disponibles se encuentran los triazoles tradicionales (fluconazol, itraconazol y ketoconazol) que inhiben la biosíntesis de ergosterol; además de tres nuevos tipos (posaconazol, ravuconazol y voriconazol). La resistencia del hongo frente a estos agentes está siendo evaluada, la estandarización in vitro de la susceptibilidad a ciertas especies y cantidades de hongo puede ser elaborada de maneras casi sencillas, pero si un paciente no responde positivamente a un tratamiento puede deberse a la resistencia del hongo o la resistencia clínica, por lo que es mejor evitar la proliferación de esta clase de organismos. Por lo tanto, se eligieron nanopartículas de plata debido a que los productos usualmente utilizados sobre *Candida albicans* son poco efectivos [20].

Se han realizado infinidad de estudios que tratan de establecer un tamaño y concentraciones que muestren toxicidad específica de AgNPs en suspensión. Es bien sabido que la exposición a grandes cantidades de estas nanopartículas induce toxicidad en diversos organismos y la exposición crónica a la plata puede producir argirosis en humanos (cambio de coloración en la piel y órganos debido a la exposición a sales

de plata); sin embargo, ensayos de citotoxicidad como el MTT [(3 - (4,5 - Di metil tiazol -2-il) -2,5-di fenil tetrazolio) (sales de tetrazolio)] han mostrado que no hay diferencias significativas en el grado de apoptosis y daño celular para soluciones que van de 5-92 % de nanopartículas/mL, esto sobre células de A549 de pulmón humano [21]. Para la elaboración de nuevos materiales es necesario considerar aspectos de viabilidad celular para pruebas *in vitro*, el ensayo MTT es ampliamente utilizado para determinar para determinar la citotoxicidad (nivel de toxicidad asociado con el daño de la membrana celular generado por la exposición a un agente o agentes [22]) de una muestra, cualquier sustancia, a diferentes concentraciones y sobre diversas líneas celulares o tejidos [23]. Además esta también el ensayo BrdU, que puede utilizarse para medir viabilidad celular después del tiempo de exposición a materiales durante pruebas *in vitro* [24].

1.1. Planteamiento del problema

La candidiasis mediada por *C. albicans* es un problema de salud pública para un sector no específico de la población pero con prevalencia considerable en pacientes portadores de prótesis dentales removibles. Por lo que es necesario tomar medidas preventivas efectivas para evitar llegar a cuadros clínicos severos por infecciones fúngicas orales.

1.2. Justificación

En la actualidad el desarrollo de nuevos y mejores materiales dentales se enfoca en propiedades fungicidas o antimicóticas como método preventivo para el desarrollo de infecciones fúngicas. El PMMA disponible en el mercado permite la adhesión de muchos y diferentes tipos de microorganismos [25], por lo que se propuso desarrollar un material de PMMA con nanopartículas de TiO_2 y AgNPs que exhiba propiedades antifúngicas y tuviera un posible uso comercial para la elaboración de prótesis parciales o totales removibles (la parte rosa de la prótesis, no piezas dentales).

1.3. Objetivo general

- Obtener un PMMA con efecto antifúngico mediante la adición de nanopartículas de TiO_2 anatasa y nanopartículas de plata sin modificar su biocompatibilidad.

1.4. Objetivos específicos

- Sintetizar un material de PMMA- TiO_2 anatasa.
- Sintetizar nanopartículas de plata por al menos dos vías distintas (una síntesis verde y una convencional, la primera con una infusión de geranio como agente reductor y la segunda con borohidruro de sodio como reductor).
- Caracterizar los materiales sintetizados.
- Elaborar acrílicos dentales con nanopartículas de plata integradas.
- Realizar el ensayo de adherencia de *Candida albicans* sobre los acrílicos dentales elaborados mediante una técnica luminométrica .
- Realizar pruebas de viabilidad celular *in vitro* sobre una línea de fibroblastos de ratón mediante ensayos MTT y BrdU.

1.5. Hipótesis

Las nanopartículas de plata adicionadas al PMMA reducirán la adherencia de *Candida albicans* cuando se compare con el PMMA sin modificar y con una resina disponible comercialmente, además de resultar inocuo durante las pruebas *in vitro*.

1.6. Criterios de inclusión

- Acrílicos termopolimerizados únicamente con el producto de una misma síntesis para evitar variaciones en pruebas de adherencia y ensayos celulares.
- Las nanopartículas de TiO_2 en fase cristalina anatasa son de origen comercial (Sigma Aldrich) .
- Las síntesis de nanopartículas que se realicen sólo a partir de dos agentes reductores: infusión de geranio y borohidruro de sodio.
- Cepa de *Candida albicans* certificada.
- Acrílicos perfectamente termopolimerizados para formar parte del ensayo de adherencia de *Candida*.
- Acrílico comercial marca Nature Ceryl.

1.7. Criterios de exclusión

- TiO_2 fase rutilo debido a que formó parte de un estudio anterior.
- Otras rutas para sintetizar nanopartículas de plata debido a que se obtienen por el mismo principio de reducción sin alguna ventaja extra en estabilización u homogeneidad.

1.8. Criterios de eliminación

- Los acrílicos elaborados que muestren fisuras o defectos estructurales.
- Los acrílicos que resulten blandos debido a una termopolimerización incompleta.

- Las pruebas de adherencia al incorporar nanopartículas de anatasa sintetizadas por sol-gel, debido a que mostraron mayor adherencia del hongo durante el ensayo.

1.9. Marco teórico

Algunos de los materiales utilizados para las síntesis, como el producto final de las mismas, fueron analizados mediante técnicas de espectroscopía y microscopía. El funcionamiento de las técnicas analíticas se explicará a continuación. Los ensayos realizados, de adherencia de *C. albicans* como de viabilidad celular, se explicarán de igual forma.

1.9.1. Técnicas de caracterización

Espectroscopía Infrarroja (IR)

Una de las técnicas espectroscópicas más utilizadas en química orgánica e inorgánica, mide la absorción de diferentes frecuencias de IR para una muestra puesta en la trayectoria de un haz infrarrojo. La técnica tiene como objetivo identificar grupos funcionales presentes en la muestra, pues diferentes grupos funcionales absorben en frecuencias distintas de IR. El espectro infrarrojo maneja escalas de número de onda desde 13000 cm^{-1} a 10 cm^{-1} , o longitudes de onda de 0.78 a $1000\mu\text{m}$; que va desde el extremo rojo de la región visible (rojo lejano) a altas frecuencias y la región de bajas frecuencias de microondas. La absorción de IR generalmente se presenta en números de onda (ν) o longitud de onda (λ), el número de onda define el número de ondas por unidad de longitud, entonces, el número de onda es directamente proporcional a la frecuencia, que es la energía absorbida IR. Por otro lado, la longitud de onda es inversamente proporcional a las frecuencias y su energía asociada. Los espectros de IR generalmente presentan en número de onda o la longitud de onda en el eje coordenado X y el porcentaje de transmitancia de la muestra en las coordenadas del eje Y. La transmitancia (T) es la relación de la potencia radiante transmitida por la muestra (I) a la potencia radiante que incide sobre la muestra (I_0). La absorbancia (A) es el logaritmo base 10 del recíproco de la transmitancia, como se muestra en la fórmula 1.1.

$$A = \log_{10} \frac{1}{T} = -\log_{10} T = -\log_{10} \frac{I}{I_0} \quad (1.1)$$

La región IR comúnmente se divide en tres regiones como se muestra en la siguiente tabla 1.1:

Región IR	Número de onda (ν) [cm^{-1}]	Longitud de onda (λ) [μm]
Cercano (near)	13000-4000	0.78-2.5
Medio (mid)	4000-200	2.5-50
Lejano (far)	200-10	50-1000

Cuadro 1.1: Regiones de IR según número o longitud de onda.

En temperaturas por encima del cero absoluto, todos los átomos y moléculas están en continua vibración con respecto a cada uno de los otros. Cuando esta frecuencia de vibración es igual a la frecuencia de la radiación IR dirigida a la molécula, la molécula absorbe la radiación. Una molécula poliatómica de n átomos tiene $3n$ grados de libertad, pero 3 grados son requeridos tanto para describir traslación y 3 grados son requeridos para describir la rotación de la molécula, entonces $3n-6$ es el número de vibraciones fundamentales (modos de vibración) para una molécula no lineal; si la molécula es lineal corresponde a $3n-5$ modos de vibración, pues sólo requiere 2 grados de libertad para describir su rotación. Sea una molécula lineal o no, estos modos de vibración son los que producen un cambio en el momento dipolo resultado en radiación IR. El espectro IR se compone de un número determinado de bandas que pueden representar o no el número de frecuencias fundamentales incluyendo sus armónicos (superposición de otras frecuencias no fundamentales). La combinación de estas bandas de absorción constituyen un espectro IR para cada componente en una muestra; el espectro representa los cambios de transmitancia en función de la frecuencia. La mayoría de los instrumentos miden radiación IR usando un espectrómetro dispersivo o espectrómetro FT (Transformada de Fourier). La muestra se expone a una fuente de radiación IR, un interferómetro colecta la radiación IR y con los datos del detector se obtiene el espectro.

Se pueden obtener espectros IR de diferentes tipos de muestras (líquidas, sólidas, gases), pero muchos materiales son opacos ante radiación IR y deben ser diluidos en una matriz transparente. Cuando la muestra es sólida, difícilmente puede disolverse en solventes especiales que transmitan radiación IR, por lo que tienen que mezclarse

con bromuro de potasio (KBr) seco y elaborar pastillas delgadas de esta mezcla. El KBr fue utilizado para elaborar las pastillas debido a que es un material que no absorbe en infrarrojo, por lo que se utiliza como un medio de soporte que dispersa la muestra y facilita su análisis [26]. El espectrofotómetro FT-IR cuenta con los elementos mencionados anteriormente, pero se aplica Transformada de Fourier al interferograma, que resulta en un espectro de intensidades en el dominio de las frecuencias.

Espectroscopía Raman Dispersivo

Debido a su sensibilidad, información contenida y naturaleza no destructiva, la espectroscopía Raman es utilizada en múltiples campos (biología, geología, farmacología, forense, ciencia de materiales, análisis de falla, etc.). Mientras que la espectroscopía IR es más sensible a grupos funcionales y enlaces altamente polares, Raman es más sensible a estructuras y enlaces simétricos. Algunas de las ventajas de analizar muestras por espectroscopía Raman se basan en la mínima preparación de las muestras, es una técnica no destructiva que puede dar un análisis por capa del material (mostrando su estructura cristalina) y la interferencia mínima de agua ni dióxido de carbono.

El efecto Raman consiste en lo siguiente: Cuando una muestra se irradia con una fuente de luz monocromática (láser) la mayoría de la radiación se dispersa de la muestra a la misma longitud de onda del láser incidente, que es conocido como dispersión Rayleigh. Sin embargo, una pequeña porción de la luz incidente resulta dispersada a una longitud de onda desplazada de la longitud de onda original del láser. Un molécula se encuentra en un grupo vibracional y un estado electrónico, el campo eléctrico del haz incidente eleva la energía de todo el sistema por un instante e induciendo la polarización de las especies químicas; esta condición polarizada no es un verdadero estado de energía de la molécula, se considera un estado virtual, el cambio desde este estado virtual pasa casi instantáneamente y es predominantemente a su estado fundamental inicial. El cambio al primer nivel excitado vibracional se conoce como desplazamiento Stokes-Raman, el desplazamiento de la luz dispersa Stokes-Raman es

de menor energía que la luz del láser. Además, la mayoría de los sistemas tienen un pequeño grupo de moléculas que inicialmente ya estaban en un estado de excitación, cuando el proceso Raman inicia desde ese estado excitado vibracional, el desplazamiento a su estado fundamental es posible, produciendo la dispersión de alta energía (a una longitud de onda corta) que la de la luz láser.

Los estados de vibración probados por espectroscopía Raman son similares a aquellos involucrados en espectroscopía infrarroja; sin embargo, son técnicas complementarias pues las vibraciones que son fuertes en el espectro infrarrojo (fuertes momentos dipolo) son típicamente débiles en Raman. Así como grupos no polares que tienen fuertes vibraciones en Raman resultan débiles en señal infrarroja. Raman provee información acerca de la estructura molecular del compuesto, posición e intensidad de características, de este modo el espectro se utiliza para determinar la composición química de una muestra. Estos espectros pueden mostrar sutiles cambios dependiendo de la forma cristalina, transición de fases y polimorfismos; es decir, dos moléculas no tienen exactamente el mismo espectro Raman, la intensidad de la luz dispersa es proporcional a la cantidad de materia presente. El rango de operación de longitud de onda usado por el equipo no afecta los modos vibracionales.

Los espectroscopios Raman se basan en dos tecnologías: Raman dispersivo y Raman Transformada de Fourier. Para Raman dispersivo la longitud de onda del láser normalmente está en 780 nm, 633 nm, 532 nm y 473 nm. La intensidad de la dispersión es proporcional a $1/\lambda^4$, entonces un láser de excitación con longitud de onda corta resultará en una señal Raman más fuerte. El problema de usar esa longitud de onda es la fluorescencia pues el colector de la dispersión se satura y la medición Raman se vuelve imposible [27].

Espectroscopía UV-Vis

La espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis) es una técnica utilizada para identificar grupos funcionales de moléculas y determinar el contenido y fuerza de una sustancia; la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones me-

tales en transición y compuestos orgánicos altamente conjugados. Una característica importante para el análisis de muestras es su color, que depende de los dobles enlaces y conjugación de sus moléculas conformantes.

La técnica se basa en la absorción de radiación ultravioleta-visible por una molécula. Existe una importante relación entre el color de una sustancia y su estructura electrónica. Una molécula o ion absorbe en la región visible o la ultravioleta cuando la radiación causa una transición de electrones en la estructura de la muestra. La energía proveída por la luz incidente en la muestra promueve que los electrones pasen de su estado de energía basal a uno de mayor energía, estado excitado, liberando el exceso de energía en forma de calor. Las diferencias entre niveles de energía varía entre los diversos orbitales, algunos enlaces moleculares (como los dobles enlaces) provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible y en el UV. Cuando luz blanca incide sobre una muestra, la luz puede ser reflejada o absorbida totalmente, si sólo una porción es absorbida y la demás es reflejada, el color de la muestra es determinado por la luz reflejada, por lo que el color se describe como característica complementaria. Muchas sustancias que parecen incoloras también tienen su espectro de absorción (en regiones del IR cercano o UV). A continuación se muestra una tabla con las regiones del espectro 1.2:

Región UV-vis	Número de onda (ν) [cm^{-1}]	Longitud de onda (λ) [nm]
Lejano (far UV)	1000000-50000	10-200
Cercano (near UV)	50000-25000	200-400
Visible (Vis)	25000-12500	400-800

Cuadro 1.2: Regiones de UV-Vis según número o longitud de onda.

Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una disolución que contiene un muestra absorbente, la intensidad del haz incidente (I_0) es atenuada hasta una nueva intensidad (I), esta fracción de radiación que no logra traspasar la muestra es denominada transmitancia (T), para fines prácticos, la unidad utilizada para su medición es la absorbancia (A) definida por la fórmula 1.1, por estar relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente según la ley de Beer-Lambert expresada en la fórmula 1.2.

$$\frac{I_t}{I_0} = e^{-klc} \quad (1.2)$$

Donde: I_t es la intensidad de luz captada por el tubo de fotolorimetría; I_0 es la intensidad de luz que sale del tubo de fotolorimetría y que llega a la celda fotoeléctrica donde se colecta; k es la capacidad de captación del haz del campo electromagnético; l es la longitud de onda del tubo de fotolorimetría (en cm) y c es la concentración de la muestra ya ubicada en el tubo de fotolorimetría. Entonces la ley de Beer permite calcular la concentración de la muestra por UV, que se puede expresar de la siguiente manera, fórmula 1.3:

$$A = \varepsilon Cl \quad (1.3)$$

Donde: A es la absorbancia; ε es el coeficiente de extinción; l es el largo del paso de la cuba (cm) y C es la concentración en moles/l. La región de longitudes de onda que se registra en UV-Vis esta entre 200 y 800 nm. En esta zona no absorben ni dobles ni triples enlaces aislados. Sólo absorberán enlaces π conjugados y grupos cromóforos.

La excitación electrónica en UV-Vis se nombra a partir las siguientes transiciones:

- $\sigma \rightarrow \sigma^*$: Para $\lambda < 150$ nm, transiciones en hidrocarburos que poseen enlaces C-H o C-C. La energía requerida para esta transición es relativamente grande y pertenece a la región espectral denominada Ultravioleta de vacío.
- $n \rightarrow \sigma^*$: Para λ entre 150 y 200 nm, para moléculas de hidrocarburos que poseen átomos con pares de electrones no compartidos (por ejemplo: O, N, etc.). La energía requerida es alta, se encuentra en la región lejana del UV.
- $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$: Para λ entre 200 y 700 nm. Donde π es el grupo de electrones de los cromóforos (compuestos insaturados, aromáticos, multicíclicos, etc.), $\pi \rightarrow \pi^*$ corresponde a la región UV lejano y cercano; y $n \rightarrow \pi^*$ pertenece a la región visible del espectro.

Las transiciones más favorecidas son entre el orbital ocupado de energía más alto

(HOMO) y el orbital desocupado de energía más bajo (LUMO). Un espectro UV-Vis mostrará la absorbancia (A) Vs. longitud de onda.

En espectrofotómetro permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia. Las muestras que se analizan mediante esta técnica se preparan en solución y se colocan en celdas especiales o cubas; se utilizan dos lámparas, una de hidrógeno o deuterio para la región UV, y una de wolframio/halógeno para la región visible. La técnica puede detectar hasta partes por millón de un cromóforo, por lo que se considera de alta sensibilidad [28].

Difracción de Rayos X

Los átomos de un material que tienen una estructura ordenada periódicamente pueden difractar la luz. La longitud de onda de los rayos X, radiación electromagnética cuya longitud de onda se encuentra entre los 10 y 0.01 nm, son similares a la distancia entre tales átomos, por lo que representan un patrón de difracción distinto para cada muestra analizada por este método. Los materiales amorfos (que no tienen un arreglo ordenado a gran escala) no producen difracción de rayos X. El patrón de difracción es único para cada tipo específico de muestra, pues representa directamente el orden interno único del material, por consiguiente, puede diferenciar entre distintos estados cristalográficos de la misma muestra.

La técnica se centra en la simetría de elementos para definir el arreglo a gran escala a partir de una única celda cristalográfica que se repite en toda la muestra (todas sus dimensiones), esta celda puede contener más de una molécula, es decir, puede contener complejos de moléculas. La simetría en la estructura cristalina muchas veces conlleva a similitudes en propiedades y comportamientos de otros materiales. Hay 7 celdas básicas utilizadas para definir los planos cristalográficos de la muestra; celda cúbica, tetragonal, hexagonal, romboidal, ortorrómbica, monoclinica y triclinica. Los planos cristalográficos definidos por las celdas se identifican mediante números, índices de Miller, que son los recíprocos de las intersecciones que el plano determina con los ejes de un sistema coordinado. En el espectro típico obtenido de un difractóme-

tro de rayos X se muestran la posición e intensidad de los picos característicos de la muestra, la posición de los picos está determinada por la distancia entre planos paralelos de átomos según la ley de Bragg 1.4:

$$\lambda = 2d_{hkl}\text{Sen}\theta \quad (1.4)$$

Que calcula el ángulo donde se genera interferencia constructiva de los rayos X dispersos por los planos paralelos de átomos produciendo un pico de difracción. En la mayoría de los difractómetros la longitud de onda de los rayos X, λ) es fija; una familia de planos produce picos de difracción a un ángulo específico, 2θ ; $2d_{hkl}$ es la distancia entre los planos paralelos de átomos en la familia (la función geométrica de tamaño y forma de la celda unitaria). La intensidad del pico dependerá del arreglo interno de átomos en todo el cristal [29].

Microscopía electrónica

La microscopía electrónica se basa en instrumentos que utilizan un haz de electrones de alta energía para examinar objetos a escala fina. Nos entrega información acerca de la topografía (características de superficie), morfología (forma y tamaño), composición y estado cristalográfico. La muestra es irradiada por un haz de electrones; las interacciones dentro de la muestra analizada afectan el haz, tales interacciones y efectos son detectados y transformados en una imagen. El haz de electrones con que se examina la muestra es monocromático, generalmente se genera un vacío para mantener una diferencia de potencial en el haz y así poder bombardear las muestras. En Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), cuando los electrones acelerados por la diferencia de potencial bombardean la muestra, encontramos tres diferentes interacciones entre el haz de electrones y esta; electrones dispersos (el haz), electrones dispersos elásticamente (haz difractado) y electrones dispersos inelásticamente. Cuando los electrones incidentes atraviesan la muestra sin ninguna interacción dentro de la muestra, se dice que ese electrón fue transmitido; cuando emergen de la

superficie de la muestra como resultado del bombardeo del haz se le llama electrón secundario [30].

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Como en microscopia de transmisión, un equipo de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, Scanning Electron Microscopy) posee una cañón de electrones donde el haz de electrones es acelerado a través de una columna de vacío para generar la diferencia de potencial necesaria para barrer la muestra depositada en la cámara; además del conjunto de lentes (para condensar el objetivo y enfocar), una serie de aperturas (para regular el paso del haz), controles de posición y el área de interacción entre el haz y la muestra. El haz se controla para barrer la superficie de la muestra punto a punto, la señal es guardada por el colector de electrones y procesada para generar la imagen; la intensidad de la señal se convierte en escala de grises dependiendo de su valor y así se da sentido de profundidad a la imagen obtenida de la muestra, con alta resolución. Este tipo de microscopios poseen una buena profundidad de campo que le permite enfocar gran parte de la muestra. Para poder analizar una muestra mediante SEM solo necesita que esta sea conductora, si no lo es, generalmente se recubre con una capa de carbono o metal (como oro) para darle esa propiedad.

Para la formación de imagen, se utilizan electrones secundarios que son electrones desacelerados debido a la interacción del haz de electrones con la muestra. Las otras formas de interacción electrónica también están presentes, pero sólo se considera a los electrones secundarios para obtener el barrido ya que muestran morfología y topografía, también puede mencionarse una determinación cualitativa de los componentes químicos de la muestra si esta es totalmente desconocida.

Como toda técnica, tiene sus limitaciones, como utilizarse preferentemente para analizar muestras sólidas que quepan en la cámara del microscopio, no mayores a 40 mm y que no se liberen gas a bajas presiones [31].

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Como se mencionó con anterioridad, en microscopía electrónica de transmisión, un haz de electrones interactúa y pasa a través de la muestra. Los electrones emitidos por el haz se concentran y son magnificados por un sistema de lentes magnéticas; es decir, el haz es confinado por dos lentes condensadoras que controlan la luminosidad del haz sobre la superficie de la muestra. Los electrones dispersos elásticamente conforman el haz transmitido, que pasa a través de la lente del objetivo, que forma la imagen según los electrones colectados a través de una apertura, el objetivo y las aperturas son utilizadas para seleccionar los electrones dispersos elásticamente y formar la imagen. La transmisión de estos electrones no dispersos es inversamente proporcional al grosor de la muestra, zonas de la muestra que sean más gruesas aparecerán con menos electrones transmitidos (región oscura de la imagen generada) y las zonas más delgadas con mayor número de electrones transmitidos (región iluminada en la imagen).

Para utilizar TEM se necesita ultra vacío y alto voltaje, usando las aperturas para capturar diferentes porciones del haz se pueden generar diferentes tipos de imágenes, pudiendo ver la estructura, composición e información cristalográfica.

TEM es una técnica muy utilizada en nanotecnología de materiales debido a los detalles que puede brindar sobre tales materiales en rangos de 1 a 100 nm. Toda muestra debe ser extremadamente delgada, menor a 100 nm de espesor, para que los electrones del haz puedan atravesar el material. Algunas muestras requieren una preparación especial, dependiendo del tipo de imagen o datos que se requieran obtener, si lo que se desea es conocer la morfología a escala nanométrica de la muestra se coloca en las rejillas especiales y se observa directamente. Los tipos de muestras pueden clasificarse en muestras autosoportables y muestras no autosoportables (que necesitan rejillas mencionadas con anterioridad); las rejillas comúnmente son elaboradas de cobre, oro, berilio, etc. Los nanomateriales son preferentemente analizados sobre rejillas de soporte [32].

Termogravimetría

El análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés-thermal gravimetric analysis) consiste en monitoreo de una sustancia en función de la temperatura o el tiempo (o ambos) sujeta a condiciones y una atmósfera controladas. Generalmente se observa si un material (la muestra) incrementa o reduce su masa al ser sometido a tratamientos térmicos en un horno o cámara especial. Básicamente, un aparato para TGA consiste en un contenedor (de cerámica o platino) dentro de un horno que es enfriado y calentado durante un experimento, con una cámara purgante de gases para controlar en ambiente interno, la mayoría de los análisis se realizan en atmósferas de gas inerte. La temperatura y el tiempo máximo de experimentación varían de equipo a equipo al igual que las características que pueda medir, como pérdida de agua, descomposición, pérdida de masa, etc. Las características de la muestra también pueden variar dependiendo de la capacidad del contenedor del TGA, pero puede decirse que por lo común los equipos analizan muestras pequeñas cuyo peso vaya entre 2 y 50 mg, lo suficiente para cubrir la superficie del contenedor. La muestra puede ser líquida o sólida (películas, polvos, cristales, etc.), es mejor tener una mayor área expuesta para correr las muestras, si la muestra es muy gruesa y puede extenderse sobre la superficie del contenedor, es recomendable hacerlo. La temperatura máxima a la que se realiza el análisis dependerá del tipo de muestra que requiera ser estudiada.

El resultado del análisis se expresa en un termogravograma que muestra en el eje de las abscisas la temperatura o el tiempo y en el eje de las ordenadas la variación de la masa como valor absoluto o porcentaje; esta gráfica se conoce como curva de descomposición térmica.

Calorimetría diferencial de barrido

Esta técnica es utilizada para caracterizar muchos tipos de materiales, se basa en el mismo principio de TGA con la diferencia de que el flujo de calor se analiza sobre la muestra y un material de referencia controlando rampas de temperatura, el

material de referencia debe tener una capacidad calorífica definida en el intervalo de temperaturas en el que se realizará el barrido; cuando la muestra analizada muestre un cambio de fase entonces fluirá mayor calor a la muestra de referencia para mantener ambas a la misma temperatura. Determinando la diferencia del flujo de calor entre la muestra y las transiciones el calorímetro DSC es capaz de medir la cantidad de calor absorbido o liberado durante las transiciones.

Luego se puede determinar las transiciones que incluyen valores de, fusión, cristalización, cinética, etc. Analizar la capacidad calorífica de la muestra permite determinar si su estructura es amorfa, la edad de la muestra, estructura, etc., cualquier cosa que afecte la movilidad interna de las moléculas afectará su capacidad calorífica. Por ejemplo, polímeros cristalinos poseen una estructura con menos grados de libertad en movimientos moleculares, lo que significa un menor movimiento de sus moléculas y por consiguiente una capacidad calorífica menor [33].

1.9.2. Ensayo de adherencia de *Candida albicans*

Anteriormente se mencionaron algunos aspectos importantes sobre como *Candida albicans* se fija en tejidos y prolifera, además de sus consecuencias más obvias. Como parte complementaria podemos agregar los siguientes datos. El género *Candida* comprende más de 150 especies, cuya característica principal es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies micóticas; se clasifican como levaduras y sólo una docena de las especies, entre ellas *albicans*, pueden adaptarse a temperaturas de 37°C [34]. Las levaduras poseen formas ovaladas y un tamaño que va de 2 a 5 μm ; cuando se ha instalado en un tejido prolifera en formas filamentosas, hifas o pseudohifas, que son las levaduras individuales unidas entre sí. Siendo organismos eucarióticos, que se reproducen asexualmente por un proceso de gemación: producen nuevo material celular a partir de la superficie de la blastospora (blastosporas o blastoconidios son las esporas que se originan de una parte de una célula somática, una hifa, un conidióforo u otra espora, y se desarrollan antes de la formación del septo que lo separa de la célula de origen), cuando el brote está listo se produce la división celular y se forma un septo entre las dos células.

Vistas al microscopio, todas las especies de *Candida* lucen similares, todas son levaduras Gram positivas, *C. albicans* presenta dimorfismo, que es cuando su forma se transforma de ovoide a hifas.

La composición química de *C. albicans* está representada por 20-40 % de proteínas y un 30-50 % de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos no puede estimarse, la fracción lipídica depende de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales, etc. La pared celular está conformada en su mayoría por manoproteínas, glucagón y quitina. La membrana citoplasmática (la principal afectada por antibióticos y antimicóticos) es una bicapa lipídica contiene las enzimas que sintetizan la pared celular; en el citoplasma están contenidos ribosomas, mitocondrias, gránulos de glucógeno y vacuolas, núcleo con membrana celular limitante (uno o varios nucleolos; ADN, ARN y cromosomas) [35].

Una vez que la cepa es aislada e identificada, para su crecimiento se utilizan agares especiales (sólo bacterias y hongos) que les proporcionarán los nutrientes necesarios, figura 1.5; para cultivo propagación de hongos el agar dextrosa Sabouraud es uno de los más utilizados; contiene agar, pluriptonas (polipéptidos formados durante la degradación enzimática de proteínas, fuente de nitrógeno para el cultivo de hongos y bacterias), glucosa, cloranfenicol (antibiótico) y pH ácido (5.6), favoreciendo el desarrollo de hongos y no bacterias. La apariencia del agar preparado es ámbar, opaco pero sin sedimentos.

Para los ensayos de adherencia, se utiliza un caldo de cultivo para la cepa crecida sobre agar, este caldo posee los mismos nutrimentos pero le permite a las levaduras fijarse a objetos inmersos en el, ya que las mantiene flotantes en solución.

1.9.3. Ensayos celulares *in vitro*

La línea celular elegida fue una línea de fibroblastos de ratón denominada 3T3-NIH debido a su disponibilidad, la pequeña semejanza que podemos establecer entre estos y el tejido de encías y otras condiciones, por ejemplo, su gran capacidad de adaptación a condiciones *in vitro*, su alta tasa de multiplicación en condiciones básicas y manteniendo sus características morfológicas y funcionales. Además, son un tipo ce-

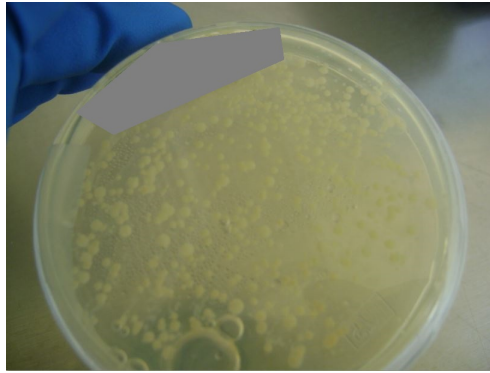


Figura 1.5: Agar con cepa de *C. albicans*.

lular que no precisa un sustrato específico para proliferar y diferenciarse (fácilmente cultivables en sustratos de poli-L-lisina, poli-D-lisina, fibronectina y colágeno [I, III, IV, V, IX]); cualquier tipo de suero favorece su crecimiento. Son ampliamente utilizados en estudios de actividad intracelular, toxicidad, viabilidad, proliferación, etc. [36].

Ensayo MTT

Este ensayo de citotoxicidad se basa en la conversión de las sales de MTT ((3-[4.5-dimetiltiazol-2-il]-2,5, bromuro de difenil tetrazol) en cristales de formazán dentro de las células vivas, para determinar la actividad mitocondrial. El método es ampliamente utilizado para medir efectos citotóxico in vivo de la liberación de drogas (a las mismas concentraciones o no) en líneas celulares o células primarias. El propósito del ensayo es medir la viabilidad celular con un alto rendimiento sin necesidad de elaborar un conteo de células; debido a que la actividad mitocondrial celular está constantemente activa, el aumento o decremento en el número de células viables resulta linealmente relacionada con la actividad mitocondrial y esta a su vez refleja la conversión de sales de tetrazol dentro de las células en cristales de formazán. Por lo que se puede medir la proliferación celular en función de la concentración de sales, mediante la medición de su densidad óptica (DO), leyéndose entre 540 y 720 nm. Luego, al comparar esa densidad óptica con las de células que no fueron tratadas

con drogas o expuestas a materiales de prueba, se puede tener un porcentaje de viabilidad celular [37]. La línea celular o tejidos sobre los que puede realizarse este ensayo tiene pocas excepciones. La reacción de reducción de las sales de MTT a sales azul de formazán se efectúa sólo cuando las enzimas mitocondriales reductasas están activas, la enzima deshidrogenasa se adhiere al anillo del tetrazol produciendo los cristales de formazán como se muestra en la figura 1.6.

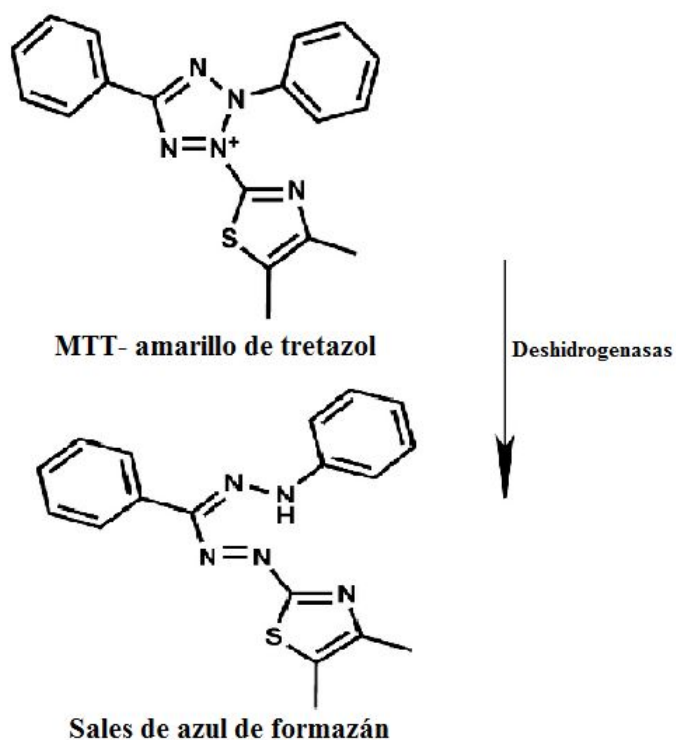


Figura 1.6: Reducción de sales de MTT a sales de azul de formazán.

Ensayo BrdU

Este ensayo puede utilizarse para medir proliferación celular, es una técnica que puede ser colorimétrica o por quimioluminiscencia. Mide la capacidad de síntesis de ADN durante exposición a sustancias de prueba; es un inmunoensayo que utiliza un

anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra bromodeoxiuridina (BrdU), que es un análogo de timidina que se incorpora en la nueva síntesis de ADN de las células durante la fase S del ciclo celular (donde ocurre la replicación del material genético) justamente como si fuera ese nucleósido. Después de la posible incorporación a la célula, este análogo de timidina puede detectarse utilizando un anticuerpo monoclonal contra BrdU. En la siguiente imagen pueden observarse las estructuras de la timidina y el BrdU, figura 1.7.

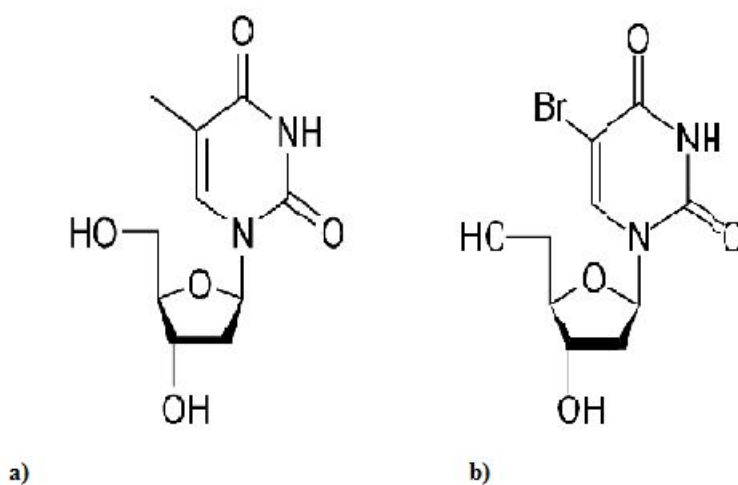


Figura 1.7: a) Nucleósido de timidina, b) Análogo BrdU.

El proceso para realizar el ensayo completo es el siguiente: Una vez incorporado el BrdU en en ADN de la nueva síntesis, las células o tejidos sobre los que se realiza el ensayo deben fijarse y desnaturalizarse (para tener acceso el BrdU incorporado), después ya puede ser agregado el anticuerpo monoclonal de ratón contra BrdU para realizar el marcaje. El inmuno-complejo puede ser detectado agregando un segundo sustrato que reaccione con el anticuerpo y genere color [38].

Después de esta breve introducción se dejó en claro cuáles fueron los objetivos del trabajo de tesis y las motivaciones. El capítulo 2, Materiales y Métodos, describe todos los materiales utilizados y/o sintetizados para las pruebas de adherencia de *Candida albicans* e inocuidad celular. Contiene, además, una explicación sobre todas las técnicas de caracterización de materiales utilizadas. En el capítulo 3, Resultados, muestra todos los datos obtenidos durante la etapa de caracterización y las pruebas centrales; se acomodaron individualmente según el material analizado o el ensayo realizado.

El capítulo 4, Discusión, se reportan aspectos básicos a considerar para una mejor interpretación de resultados. Finalmente, el capítulo final es el de las conclusiones, que más que un capítulo, establece los puntos importantes de este trabajo.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1. Síntesis de materiales

Los experimentos realizados a lo largo de este trabajo partieron de tres síntesis de materiales. La primera fue la de PMMA-anatasa, el grupo base. Las otras dos síntesis fueron de nanopartículas de plata; una síntesis verde, cuyo agente reductor fue una infusión de geranio; y una síntesis química con borohidruro de sodio como agente reductor.

2.1.1. Síntesis de PMMA- TiO_2 anatasa

Materiales:

- Nanopartículas de TiO_2 -anatasa al 99 % [Sigma Aldrich, México].
- Óxido de hierro [(Fe_2O_3) ; González Cano y Asociados, México].
- Benzofenona [$(C_{13}H_{10}O)$; Sigma Aldrich, México].
- Hidróxido de sodio [(NaOH); Sigma Aldrich, México].
- Peróxido de benzoílo [$(C_{14}H_{10}O_4)$; Sigma Aldrich, México].

- Monómero de metil metacrilato (MMA) [($CH_2:C(CH_3)COOCH_3$); Sigma Aldrich, México].

Método:

Se sintetizaron en suspensión partículas de PMMA agregando al MMA *in situ* partículas de TiO_2 -anatasa, Fe_2O_3 y benzofenona como pigmentos para obtener una resina acrílica color rosa semejante a la encía; a la mezcla anterior, se le agregó peróxido de benzoílo como iniciador, todo en atmósfera inerte de N_2 y 70 ± 1 °C [39]. Las proporciones fueron acorde al peso en gramos de MMA utilizado, donde las cantidades de reactivos fueron las siguientes (todas en peso y en relación con el monómero): NaOH-8 %, iniciador-0.3 %, pigmentos (nanopartículas de TiO_2 anatasa, benzofenona y óxido de hierro)-<1 %.

El producto final de la síntesis, un PMMA-anatasa, fue un polvo fino en solución que se lavó múltiples veces para eliminar residuos del iniciador. Se secó en estufa por 24 h a 60 °C. Después el polvo se tamizó con malla de 140 μm .

2.1.2. Síntesis de nanoesferas y nanoprismas de plata (AgNPs)

Síntesis verde

Materiales:

- Infusión de geranio (reductor) [Preparada, ver Apéndice.]
- Poli(etilenglicol) [($C_{2n+2}H_{4n+6}O_{n+2}$); Sigma Aldrich, México].
- Nitrato de plata [($AgNO_3$); Sigma Aldrich, México].

Método:

Se prepararon AgNPs a partir de una infusión de geranio filtrado, que se agregó en poli(etilenglicol) (20 ml), por goteo, se agregó una solución de nitrato de plata

[0.025M], todo en sistema con agitación y a temperatura de 176 ± 1 °C. El producto final se conservó en agua como medio de suspensión.

Síntesis Química

Materiales:

- Borohidruro de sodio [($NaBH_4$); Sigma Aldrich, México]
- Nitrato de plata [($AgNO_3$); Sigma, México]
- Citrato de sodio trisódico [($Na_3C_3H_5O(COO)_3$); Sigma, México]
- Lámpara de luz, 70 W

Método:

Obtención de nanoesferas: Se preparó una solución de citrato de sodio [3mM] y nitrato de plata en agua [1mM], a la cual se le agregó por goteo borohidruro de sodio [8mM]; todo esto en agitación y a temperatura ambiente. El producto exhibió coloración amarilla, característica de las nanoesferas obtenidas mediante esta síntesis. Se conservó la solución en refrigeración.

Obtención de nanoprismas: El producto anterior fue expuesto a una fuente de luz (70 W) durante 44 h, exhibiendo una coloración azul característica de la morfología prismática. Se conservó la solución en refrigeración, reacción por fusión.

2.2. Técnicas de caracterización

La preparación de muestras para análisis por espectroscopía y microscopía se presenta a continuación.

2.2.1. Espectroscopía Infrarroja

Muestras analizadas con esta técnica:

1. Nanopartículas de TiO_2 -anatasa.

Preparación de muestras:

1. Las partículas de anatasa en polvo fueron mezcladas con KBr. Se hizo una pastilla delgada con ellos y se midió por FT-IR normal en el intervalo de 4000-400 cm^{-1} .

Equipo:

Espectrómetro de mediano y cercano infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) Bunker Vector 33.

2.2.2. Espectroscopía Raman dispersivo

Muestras analizadas con esta técnica:

1. Nanopartículas de TiO_2 -anatasa.
2. PMMA-anatasa.

Preparación de muestras:

1. La muestra se puso directamente sobre el portamuestras del equipo, presentación en polvo.
2. Igual que la muestra anterior, presentación en polvo.

Equipo:

Espectrómetro Raman dispersivo, modelo Senterra, marca Bunker, equipado con microscopio y un láser de 785 nm, resolución espacial en el intervalo de 80 a 3500 cm^{-1} .

2.2.3. Espectroscopía UV-Vis

Muestras analizadas con esta técnica:

1. Nanopartículas de TiO_2 -anatasa.

Preparación de muestras:

1. Se diluyeron la nanopartículas de anatasa en agua desionizada, esta muestra se analizó directamente en celdas de cuarzo.

Equipo:

Spectronic Genesys 2PC; la medición se realizó en el intervalo que va de 200 a 800 nm.

2.2.4. Difracción de Rayos X

Muestras analizadas con esta técnica:

1. Nanopartículas de TiO_2 -anatasa.

Preparación de muestras:

1. La muestra se analizó directamente en el portamuestras del difractómetro, en polvo; ángulo: 2θ y velocidad de 2° /minuto.

Equipo:

Difractómetro de Rayos X Rigaku, modelo MiniFlex+.

2.2.5. Microscopía electrónica

Microscopía electrónica de barrido

Muestras analizadas con esta técnica:

1. Nanopartículas de TiO_2 -anatasa.
2. PMMA-anatasa.

Preparación de muestras:

1. Por ser conductoras, se colocaron directamente sobre el papel de carbono. No se requirió recubrir con oro. Se observó directamente en el microscopio.
2. PMMA-anatasa: Se observaron directamente en el microscopio.

Equipo:

Microscopio Electrónico de Barrido, JEOL modelo JSM-6060LV, con voltaje de aceleración de 0.5 a 30 kV.

Microscopía Electrónica de Transmisión

Muestras analizadas con esta técnica:

1. AgNPs.
 - a) Nanopartículas de TiO_2 -anatasa.
 - b) De Geranio como agente reductor (nanoesferas) [Geranio].
 - c) De borohidruro de sodio como agente reductor (nanoesferas) [Esferas].
 - d) De borohidruro de sodio como agente reductor (nanoprismas) [Prismas].

Preparación de muestras:

- a) Se pusieron en solución en metanol, luego se tomó la muestra sobre las rejillas especiales.
- b) Se tomó la muestra de nanopartículas en agua con rejillas especiales, las muestras ya conductoras se observaron directamente en el microscopio.
- c) Directamente sobre rejillas de suspensión.
- d) Directamente sobre rejillas de suspensión.

Equipo:

Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL modelo JEM-1010, con un rango entre 60 y 80 kV, resolución de 0.25 nm.

2.2.6. Termogravimetría

Muestras analizadas:

- PMMA-anatasa.

Preparación de muestras:

- El polvo del polímero se midió directamente sobre el contenedor del TGA, a una tasa de calentamiento de 10 °C/min., hasta alcanzar una temperatura de 900 °C (en atmósfera inerte de N_2).

Equipos: TA Instrument Q500 V6.3.

2.2.7. Calorimetría diferencial de barrido

Muestras analizadas:

- PMMA-anatasa.

Preparación de muestras:

- El polvo del polímero se midió directamente sobre el contenedor del TGA; 20 mg de muestra sometida a calentamiento gradual de 0 a 225°C.

Equipos: TA Instruments Q500HR.

2.3. Elaboración de acrílicos dentales

El acrílico se preparó a partir de una mezcla de PMMA-anatasa y monómero de metil(metacrilato) [MMA] en proporciones 3:1 (mL), además del 1% de peróxido de benzoílo como iniciador. La mezcla resultante fue empacada en moldes para su posterior termopolimerización en microondas 3 minutos a 500 W. El resultado final fueron muestras sólidas de acrílico dental que fueron lijadas con papel abrasivo No. 100 para mostrar uniformidad de superficie durante los ensayos como se muestra en la figura 2.1.



Figura 2.1: Disco de acrílico dental listo para ensayos.

2.3.1. Muestreo

Los grupos que se consideraron para los ensayos fueron cinco, tomando el acrílico de la marca Nature Cryl como referencia comercial, el muestreo se dividió en los siguientes grupos, ver tabla 2.1.

Nombre del grupo	Base	Nanopartículas de plata(AgNPs)		
		Síntesis verde	Síntesis química esferas	Síntesis química prismas
Nature Cryl(GC, USA)	Resina acrílica comercial	—	—	—
PMMA-anatasa	Síntesis PMMA-Anatasa	—	—	—
PMMA-AgNPs Geranio	Síntesis PMMA-Anatasa	Sí	—	—
PMMA-AgNPs Esferas	Síntesis PMMA-Anatasa	—	Sí	—
PMMA-AgNPs Prismas	Síntesis PMMA-Anatasa	—	—	Sí

Cuadro 2.1: Grupos de acrílicos experimentales

Donde sólo los últimos tres grupos contienen nanopartículas de plata, la incorporación de estas se realizó manualmente antes del proceso de termopolimerización, el método de incorporación ha sido estudiado previamente, mediante TEM y los acrílicos mostraron una dispersión uniforme en el acrílico [40].

Las concentraciones de nanopartículas de plata entre los grupos PMMA-AgNPs Geranio, PMMA-AgNPS Esferas y PMMA-AgNPs Prismas fueron diferentes debido su manejo durante la incorporación en el acrílico. Para el grupo PMMA-AgNPs Geranio la concentración utilizada fue de $16.06 \mu\text{g}/\text{ml}$, la cantidad de microlitros utilizado durante la termopolimerización fue de $22.2 \mu\text{l}$ ($0.36 \mu\text{g}$ de AgNPs) estimándose en $0.06 \mu\text{g}$ de AgNPs por pieza de acrílico.

Con respecto a la síntesis química de esferas y prismas, la concentración inicial de nitrato de plata para la síntesis fue de 1mM ($0.0017 \text{ g } \text{AgNO}_3/10 \text{ ml agua}$), la síntesis final tuvo una concentración de 0.1 mM de AgNO_3 ; para la termopolimerización se incorporaron $333 \mu\text{l}$ debido a que más de $333 \mu\text{l} / \text{ml}$ de MMA no permitió la polimerización completa, el estimado de nanopartículas de plata por acrílico no puede determinarse de forma sencilla.

2.4. Ensayo de adherencia de *Candida albicans*

Materiales:

- Cepa 90110-FM, UNAM.
- Caldo para cultivo (Tryptic Soy Broth, Sigma-Aldrich).
- Kit-BacTiter-Glo (Promega, USA).
- Cloruro de benzalconio (Sigma, USA).

Método:

Se cultivó *Candida albicans* en caldo para cultivo (Tryptic Soy Broth, Sigma-Aldrich), la cual se puso en contacto directo con los acrílicos experimentales overnight, se hicieron 3 lavados en agua a los acrílicos y se removió la *Candida* fija con una solución de cloruro de benzalconio (1 %); de la solución obtenida del cloruro de benzalconio con *Candida* se tomaron las muestras a las que se agregó el reactivo Kit-BacTiter-Glo. Este reactivo se basa en reacción de lucifereína-luciferasa de mitocondrias viables de *Candida albicans* (por lo que es proporcional al número de unidades formadoras de colonias (UFS's) de *Candida albicans* adheridas a cada pieza de acrílico). Luego, se tomaron alícuotas para leer en el luminómetro para conocer la proporción directa de *Candida* para cada grupo experimental en unidades relativas de luz (URL's) [39]. La reacción se basa en la mono-oxigenación de las sales de luciferina (sal monopotásica sintetizada como un sustrato por luciérnagas) catalizada por luciferasa en presencia de Mg^{2+} , ATP y oxígeno molecular, como se muestra en la figura 2.2. La reacción procede en dos pasos: Primero se da una adenilación de las sales de luciferina, seguido de la oxigenación de la adenil-luciferina; después la adenilación activa el complejo enzima-adenil-luciferina (análogo a la activación de ácidos grasos por ligasas acil-CoA). En el segundo paso la luciferasa actúa como una oxigenasa sobre la adenil-luciferina para producir oxiluciferina y CO_2 , el decaimiento de la oxiluciferina produce un fotón de luz [41].

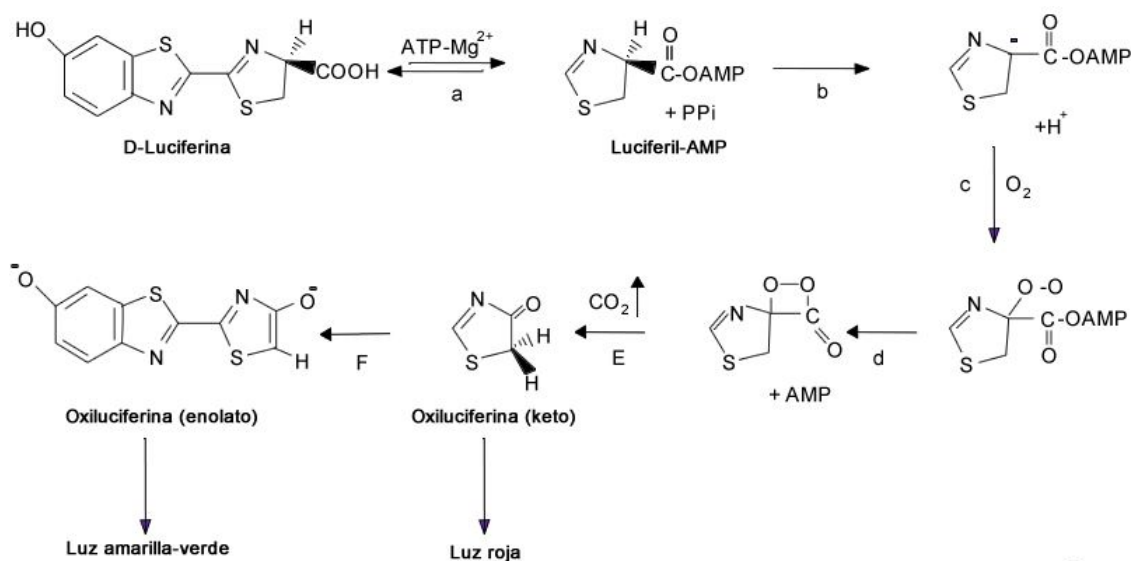


Figura 2.2: Reacción Luciferina-Luciferasa.

Equipo:

GloMax 20/20 Luminometer, Promega, para luminiscencia y quimioluminiscencia.

2.5. Ensayos celulares *in vitro***2.5.1. Ensayo MTT****Materiales:**

- Células y controles: Incubadora con atmósfera al 5% de CO₂, a 37 °C. Cajas de 96 pozos, para microtutulación. Línea celular sobre la que se hará el ensayo.
- Soluciones y disolventes: Sales de MTT y solución estabilizante.

Método:

Se realizaron 2 ensayos, de 24 h y 48 h; para los dos tiempos las células se incubaron al menos 24 h antes de realizar el ensayo, con DMEM completo como medio de

nutrientes (10% suero fetal bovino; 1% antibiótico (penicilina-estreptomicina)), en cajas de 24 pozos. Para el ensayo a 24 h se sembraron 2×10^4 células por pozo y para el de 48 h se sembraron $1,5 \times 10^4$ células. Cuando las células ya estuvieron fijadas, se dejaron en $500 \mu\text{l}$ de DMEM completo, se pusieron las muestras de acrílico flotantes en cada pozo, también las soluciones de nanopartículas ($14 \mu\text{l}$ por pozo). Después del tiempo de evaluación, se retiraron las muestras sólidas (los pozos con muestras líquidas se quedaron igual) y se agregaron las sales disueltas de MTT en PBS; se incubó de nuevo por 4 h, antes de extraer el DMEM y de agregar $100 \mu\text{l}$ de solución estabilizante para disolver las células con los cristales en su interior. Para disolver los cristales de formazán se agitó manualmente la caja de cultivo. Enseguida, se tomaron alícuotas de $50 \mu\text{l}$ de cada pozo y se pusieron en una caja de microtitulación de 96 pozos, para ser llevada al lector de placas para microtitulación a 655 nm.

Preparación de grupos experimentales:

Las muestras de acrílico fueron lavadas y esterilizadas (luz ultravioleta en campana de flujo laminar) antes de colocarse en contacto con los pozos de cultivo. Las AgNPs solo fueron esterilizadas con luz UV antes de colocarse en los pozos.

Equipo:

iMark Microplate Absorbance Reader, No.168-1130, para placas de microtitulación de 96 pozos.

2.5.2. Ensayo BrdU

Materiales:

- Células y controles: Incubadora con atmósfera al 5% de CO_2 , a 37°C . Cajas de 96 pozos, para microtitulación. Línea celular sobre la que se hará el ensayo.
- Disolventes y soluciones:
 - Labeling Solution [LS].

- Fix Denat [FD].
- Working Solution (Anti-BrdU-POD Fab [ABP] y Antibody Dilution Solution [ADS]).
- Washing Buffer [WB].
- Substrate Solution [SS].

Método:

Se sembraron 2×10^4 células 3T3-NIH por pozo para el ensayo. Estas células se sembraron al menos 24 h antes de comenzar, con 500 μl de DMEM completo por pozo. Una vez terminado el tiempo de incubación, se cambió el DMEM viejo por 500 μl de nuevo y se colocaron las muestras flotantes sobre cada pozo (para acrílicos) y en disolución junto con el DMEM (para soluciones de AgNPs); además, se realizó el primer paso para el ensayo, que fue agregar 10 μl de Labeling Solution por pozo, para que se incorporara a las células durante la síntesis de ADN. Se incubaron las células con muestras y Labeling Solution por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se retiraron las muestras sólidas, con pinzas, y líquidas durante el aspirado del DMEM. Se agregaron 200 μl de Fix Denat a cada pozo y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, se succionó el reactivo y se agregaron 100 μl de Working solution (una dilución 1:100 ABP: ADS) y se incubó por 90 minutos a temperatura ambiente. Al término del último tiempo de incubación, se succionó el reactivo y se realizaron dos lavados con 150 μl de Washing Buffer a cada pozo. Para terminar, se agregaron 100 μl de Substrate Solution y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, de ésta última solución se tomaron alícuotas de 50 μl para medir absorbancia a 415 nm (óptimo 405 nm).

Preparación de grupos experimentales:

Las muestras de acrílico fueron lavadas y esterilizadas (luz ultravioleta) antes de colocarse en contacto con los pozos de cultivo. Las AgNPs solo fueron esterilizadas con luz UV (en campana de flujo laminar) antes de colocarse en los pozos.

Equipo:

iMark Microplate Absorbance Reader, No.168-1130, para placas de microtitulación de 96 pozos.

Capítulo 3

Resultados

3.1. Caracterización de nanopartículas de TiO_2 anatasa

Las nanopartículas fueron analizadas mediante algunas técnicas, con la finalidad de observar sus características y corroborar la fase mediante diversos medios analíticos.

3.1.1. IR

La muestra analizada mostró los picos correspondientes a la fase anatasa del TiO_2 según las bases de datos establecidas; con los picos característicos entre 750 y 600 cm^{-1} , como se muestra en la figura 3.1. Óxidos con más de un oxígeno absorben en la región que va de 1020 - 970 cm^{-1} , en general, los óxidos metálicos (M=O) tienen una banda fuerte de absorción entre 1100 y 850 cm^{-1} ; algunos dióxidos, como el TiO_2 , la banda se corre lentamente hasta 750 cm^{-1} . Los diferentes polimorfismos para el TiO_2 se diferencian en la región que va de 1000 a 400 cm^{-1} [42].

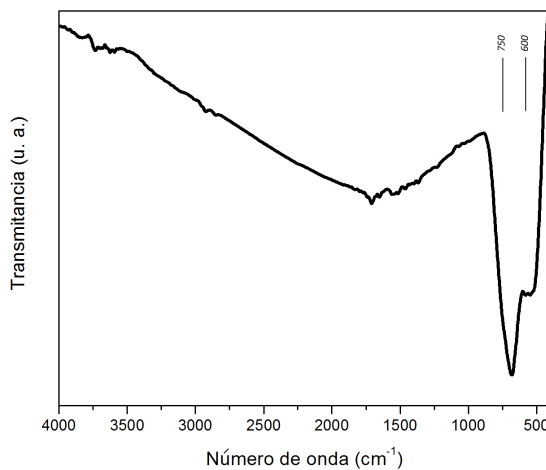


Figura 3.1: Espectro FT-IR de nanopartículas de anatasa.

3.1.2. Raman dispersivo

El espectro obtenido por Raman dispersivo muestra los picos principales dentro del intervalo característico para metales unidos a oxígeno mediante dobles enlaces, que va desde 140 a 450 cm^{-1} . Se dio un ligero desplazamiento en los valores de los 4 picos con respecto a los valores encontrados en la bases de datos, los valores obtenidos fueron 141, 394, 514 y 643 cm^{-1} mientras que la mayoría de las bases de datos muestran valores de 143, 395, 516 y 645 cm^{-1} , respectivamente.

3.1.3. UV-Vis

El espectro obtenido por UV-Vis se muestra a continuación, comparando la absorbancia entre dos de las fases del TiO_2 , anatasa y rutilo, figura 3.3. Las diferencias se encuentra en el valor donde la absorbancia decae para cada fase; comparando con diversos artículos [43], para la misma concentración de TiO_2 en las muestras, la fase anatasa reduce sus valores de absorbancia antes de 375 nm y la rutilo más allá de los 400 nm.

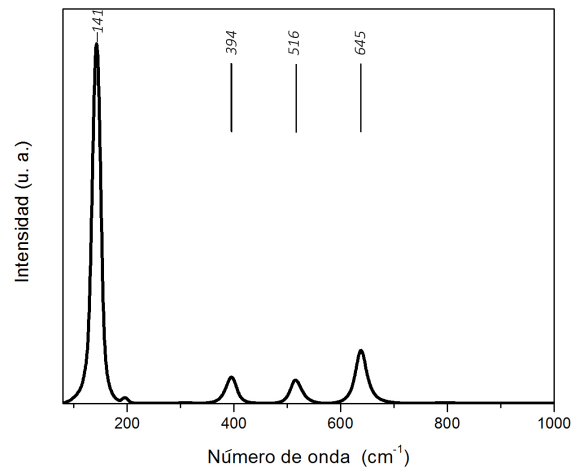


Figura 3.2: Espectro Raman de nanopartículas de anatasa.

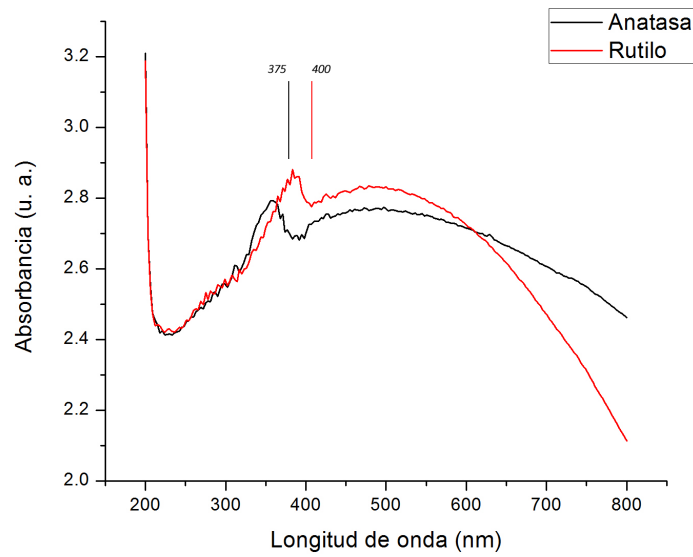


Figura 3.3: Espectro UV-Vis de nanopartículas anatasa y rutilo donde se observa la diferencia en absorbancia para ambas fases cristalinas.

3.1.4. Difracción de rayos X

El difractograma de rayos X obtenido de las nanopartículas se muestra en la figura 3.4, con los picos correspondientes a la fase cristalina que estamos utilizando. Los picos corresponden a los valores encontrados durante el análisis por difracción de rayos X para otras muestras ya identificadas en fase [44]. Los valores de los picos en ángulos son los siguientes: 25.367° , 37.053° , 37.909° , 38.667° , 48.158° , 54.051° , 55.204° , 62.867° , 68.976° , 70.479° y 75.303° ; que se atribuyen a los planos 101, 103, 004, 112, 200, 105, 211, 204, 116, 220 y 215, respectivamente, todos pertenecientes a elementos y posiciones característicos para esta fase de TiO_2 .

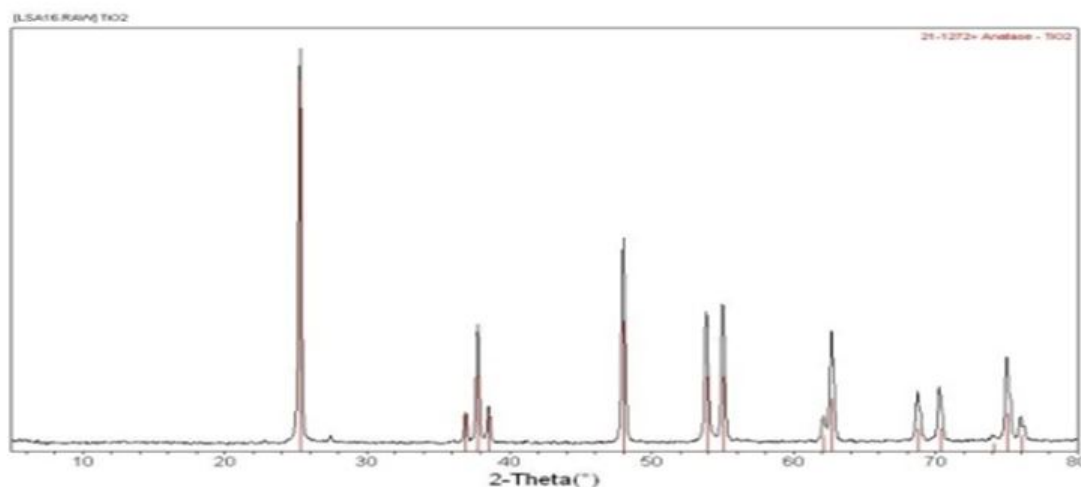


Figura 3.4: Difractograma de nanopartículas de TiO_2 en fase anatasa donde se muestran los ángulos correspondientes a los planos característicos de la fase.

3.1.5. Microscopía

Para las microscopías SEM y TEM de las nanopartículas de TiO_2 anatasa se encontraron distribuciones de tamaño muy diferentes entre sí al realizar la comparación, esto pudo deberse a la agregación física dentro del recipiente en que se almacenaban las nanopartículas. La primer muestra se tomó para SEM, donde las nanopartículas

las se observaron de menor tamaño. A continuación se muestran las micrografías y tamaños de nanopartícula encontrados.

SEM

La microscopía SEM que se muestra en la figura 3.5 muestra las nanopartículas de TiO_2 anatasa con detalles superficiales parecidos a cúmulos. El diámetro promedio observado fue de 53 ± 24 nm. La muestra requirió sólo 20 kV como diferencia de potencial para visualizar las nanopartículas.

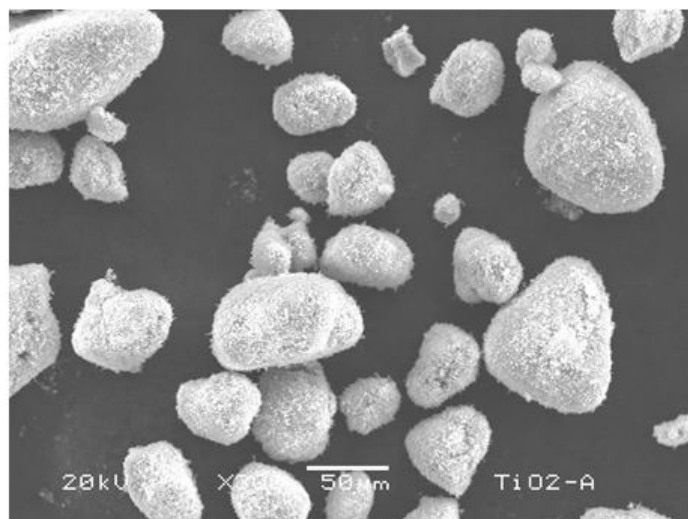


Figura 3.5: Micrografía SEM de nanopartículas de anatasa observadas mediante SEM donde se observan detalles de superficie y distribución de tamaño.

TEM

A continuación se muestra una imagen obtenida mediante microscopía de transmisión, figura 3.6, cuyo diámetro promedio resultó de 123 ± 70 nm.

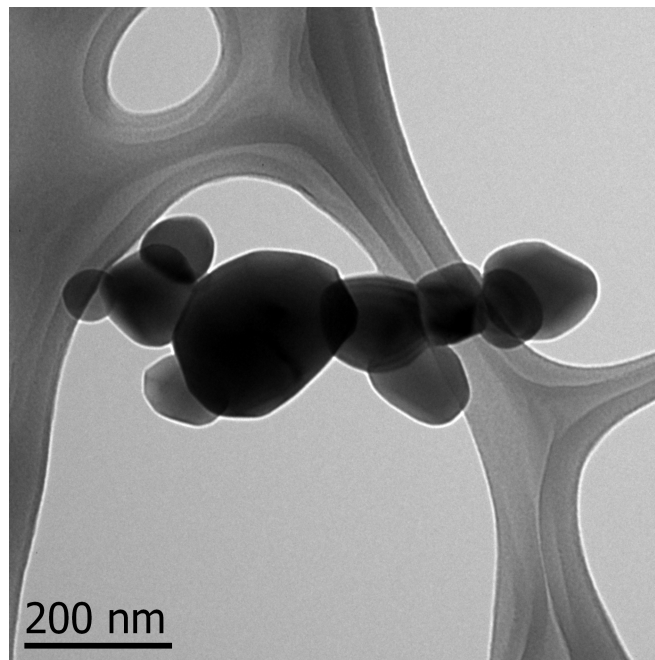


Figura 3.6: Micrografía TEM de nanopartículas de anatasa observadas mediante TEM donde se observa una distribución en tamaño igual que en SEM.

3.2. Caracterización de PMMA-anatasa

Como se mencionó con anterioridad, la síntesis de PMMA que se realizó fue un polvo color rosa de textura fina. Observado con microscopio óptico en la figura 3.7 podemos mostrar una aproximación a la morfología del material como primera instancia, donde observamos homogeneidad en formas esféricas bien formadas en el material.

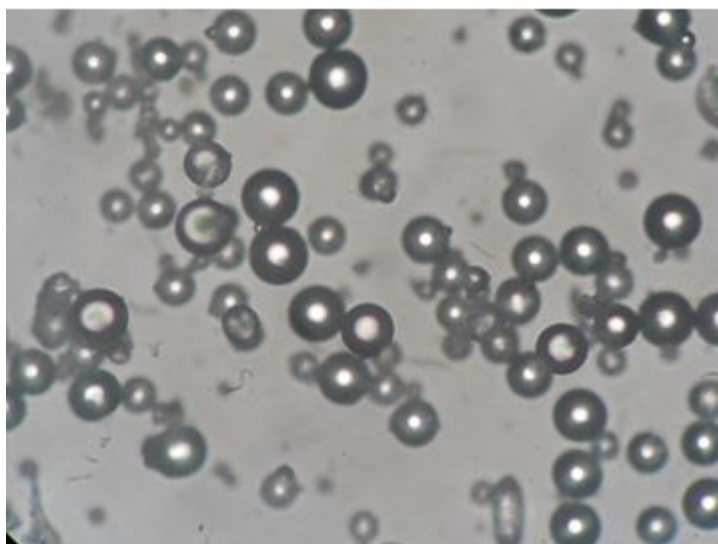


Figura 3.7: Muestra de polvo de PMMA-anatasa vista al microscopio óptico, objetivo 40X.

3.2.1. Raman dispersivo

El polvo obtenido de la síntesis se analizó mediante Raman dispersivo para observar posibles modificaciones en su estructura. La figura 3.8 muestra el espectro obtenido, donde el espectro muestra los mismos picos característicos del espectro de metil(metacrilato) pero una mayor intensidad en la señal. Los picos corresponden a los grupos funcionales del MMA; en valores cercanos a 3000 cm^{-1} están los grupos (-C-H) de (-O-CH), en 1460 cm^{-1} están los grupos (-C-H) de (-CH₃); en 1648 cm^{-1} están los (-C=C-), (-C-COO-) y (-C=O); en 853 cm^{-1} están los grupos (-CH₂); etc.

Comparado con el espectro Raman de otros PMMA puros encontrados en las bases de datos, el espectro de muestra no mostró diferencias entre grupos funcionales conformantes, por lo que podemos decir que la estructura no fue afectada el proceso de síntesis.

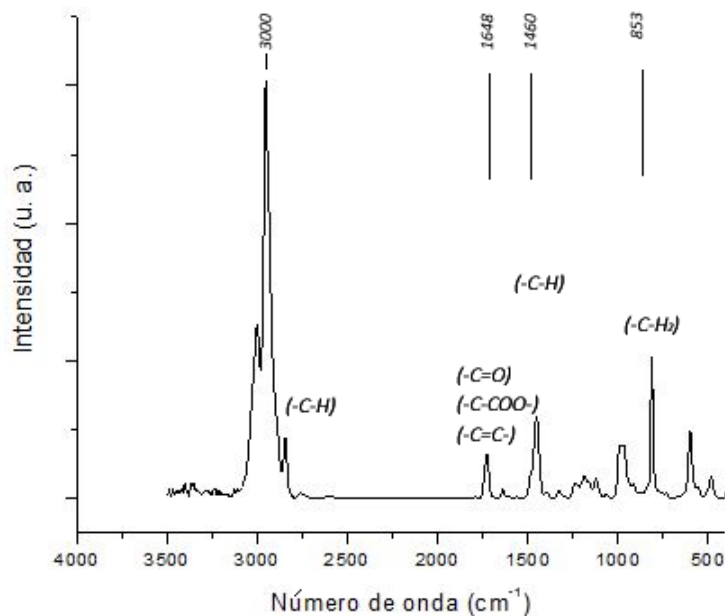


Figura 3.8: Espectro Raman dispersivo para PMMA-anatasa con los picos característicos del monómero de MMA.

3.2.2. SEM

Las siguientes imágenes muestran el polímero sintetizado con anatasa, el diámetro promedio calculado fue de $50 \pm 20 \mu m$. La morfología del polímero se mostró bastante uniforme, sus partículas tuvieron una tendencia generalizada a formar esperas simétricas. Las formaciones alargadas y otras formaciones son polímero no terminado. Enseguida se muestran dos imágenes representativas de la muestra, figura 3.9 y la figura 3.10:

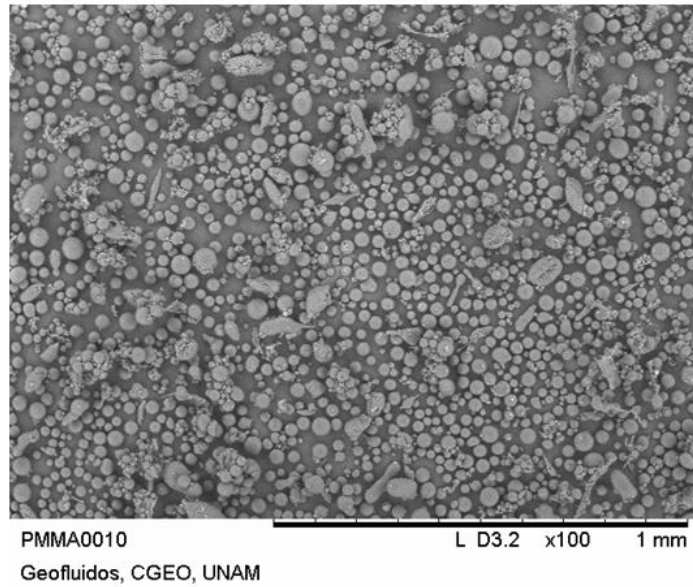


Figura 3.9: Micrografía SEM para una muestra del polímero sintetizado con nanopartículas de anatasa.

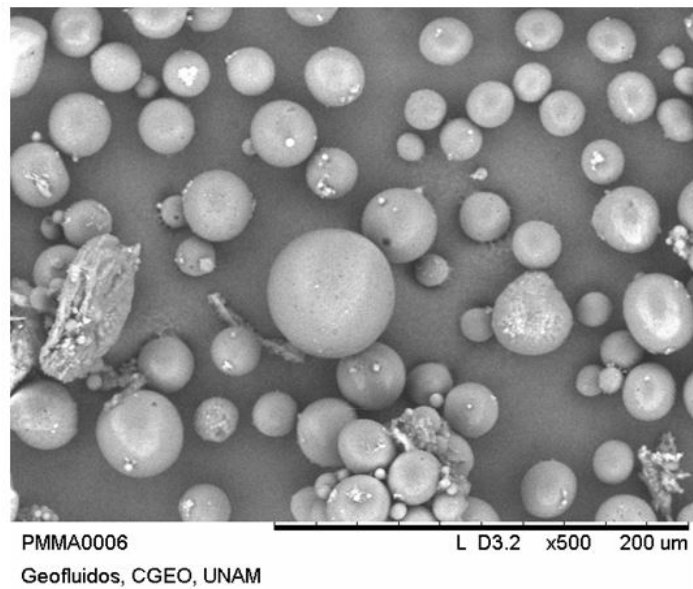


Figura 3.10: Micrografía SEM para una muestra del polímero sintetizado con nanopartículas de anatasa donde se observa la morfología predominante del material sintetizado, tamaños dispersos.

3.2.3. TGA

Los resultados del análisis termogravimétrico se muestran en la siguiente figura 3.11. Los datos indican que la pérdida de porcentaje de masa es relativamente nula a 100°C, que sobre pasa la temperatura a las que comunmente será sometido el material. Por otra parte, el temogravigrama muestra que se conserva el 94 % a temperaturas de hasta 300°C.

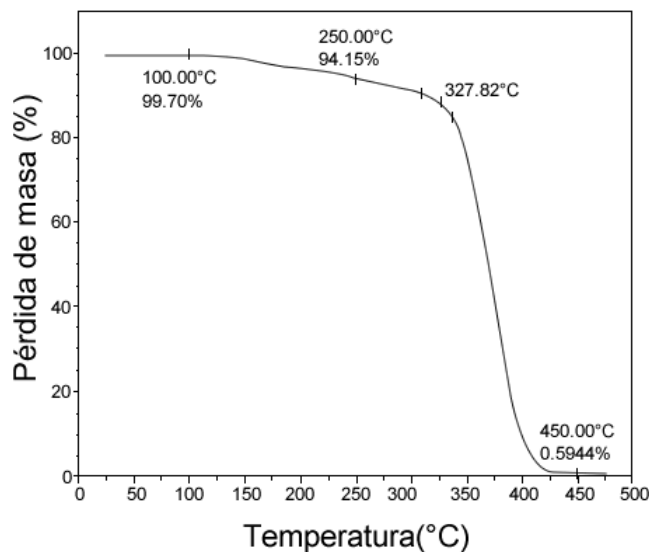


Figura 3.11: Termograma de la pérdida en porcentaje de peso en función de la temperatura para el PMMA-anatasa, se encontró que se conserva un 80 % de la masa hasta temperaturas de 328°C.

3.2.4. DSC

La lectura de DSC obtenida se muestra en la figura 3.12, donde podemos observar que el polímero se funde entre los 150 y 161°C. El PMMA común tiene un punto de fusión de 161°C, por lo que la adición de anatasa no mejoró sus características térmicas.

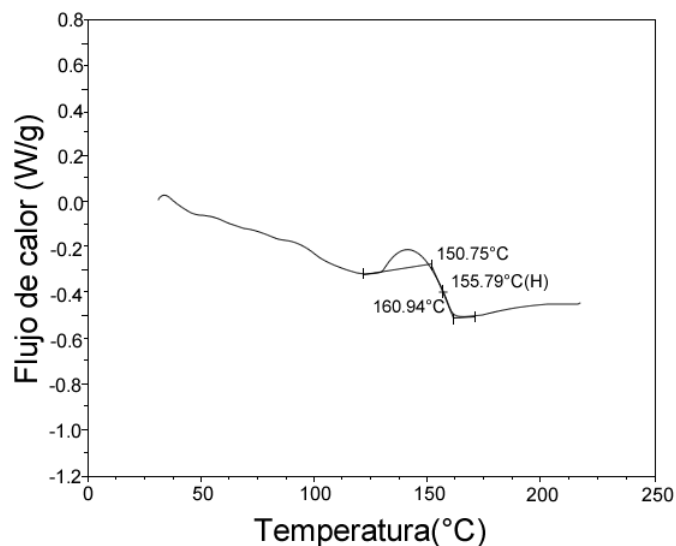


Figura 3.12: Termograma de la fusión de PMMA-anatasa en función del flujo de calor que muestra la temperatura a la que se fundió el PMMA sintetizado.

3.3. Caracterización de AgNPs

3.3.1. Síntesis verde

La síntesis de AgNPs mediante infusión de geranio se muestra en la siguiente figura 3.13, ya sonicada, pues en condiciones normales exhibe coloración café y se encuentran en montículos superficiales dentro de la solución.



Figura 3.13: Nanopartículas de plata obtenidas con infusión de geranio como agente reductor, la coloración café indica que cerca del 100 % de los iones de plata fueron convertidos en nanopartículas [45].

3.3.2. TEM

La síntesis mostró uniformidad en la simetría de las nanopartículas. El diámetro promedio calculado fue de 20 ± 5 nm, figura 3.14 El color de las nanopartículas fue café, para analizarlas en TEM e incorporarlas en el PMMA-anatasa se necesitó sonicar por periodos de una a dos horas para tener una solución homogénea.

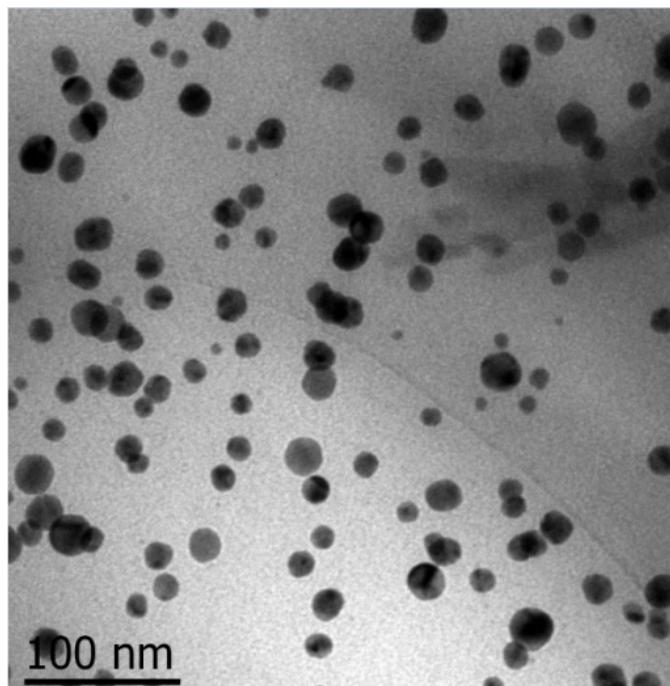


Figura 3.14: Micrografía TEM de la solución de AgNPs Geranio donde se observa el tamaño y forma homogéneos de las nanopartículas.

3.3.3. Síntesis de esferas y prismas

Nanoesferas

El primer resultado de la síntesis fueron las nanoesferas de plata en solución acuosa. La coloración fue amarilla, como se muestra en la figura 3.15.

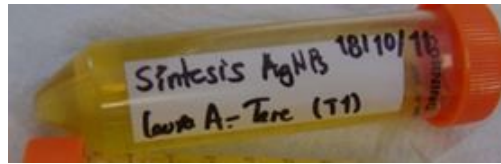


Figura 3.15: Solución con nanoesferas de plata con borohidruro de sodio como agente reductor, la coloración amarilla es un indicativo de la formación del plasmón.

Estas nanoesferas fueron observadas mediante TEM, la morfología y tamaños quedan ilustrados en la siguiente figura 3.16. Las nanopartículas sintetizadas por este método mostraron un diámetro promedio de 6 ± 3 nm.

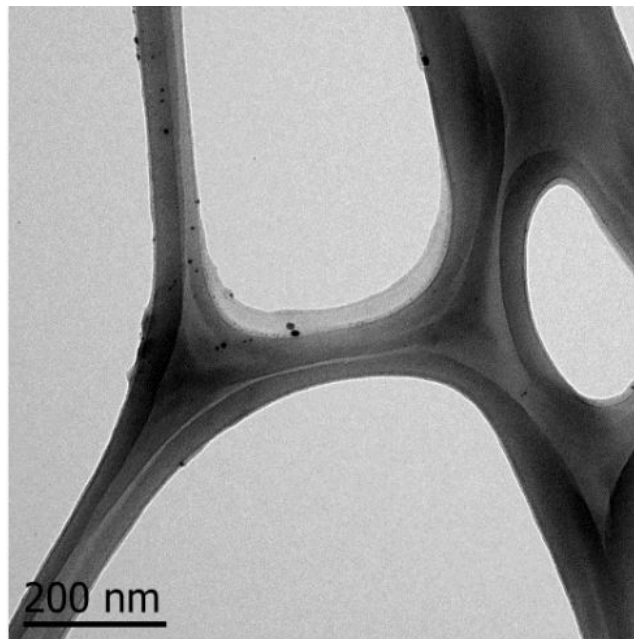


Figura 3.16: Micrografía TEM de solución de AgNPs Esferas donde se observan diámetros de unos cuantos nanómetros.

Nanoprismas

La solución azul obtenida del segundo paso para la síntesis se muestra en la siguiente figura 3.17, donde el incremento en el tamaño de los prismas y su interacción con la luz produce su característica coloración.

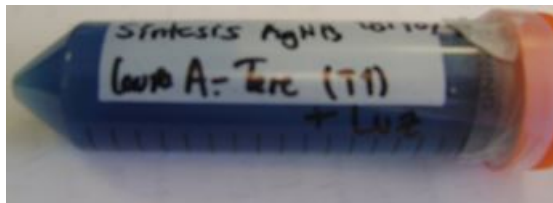


Figura 3.17: Solución con nanoprismas de plata con borohidruro de sodio como agente reductor, la coloración azul se debe al nuevo índice de refracción de la luz sobre la superficie de los prismas [46].

Los prismas sintetizados se midieron lado por lado para calcular sus dimensiones, la longitud promedio por lado fue de 96 ± 53 nm. Los prismas observados fueron muy diferentes entre sí, hubo unos con mejor morfología definida; en general los lados presentaron longitudes similares, pero el área de estos fue totalmente variable entre ellos. A continuación se muestran una imagen de las nanopartículas observadas mediante TEM, 3.18.

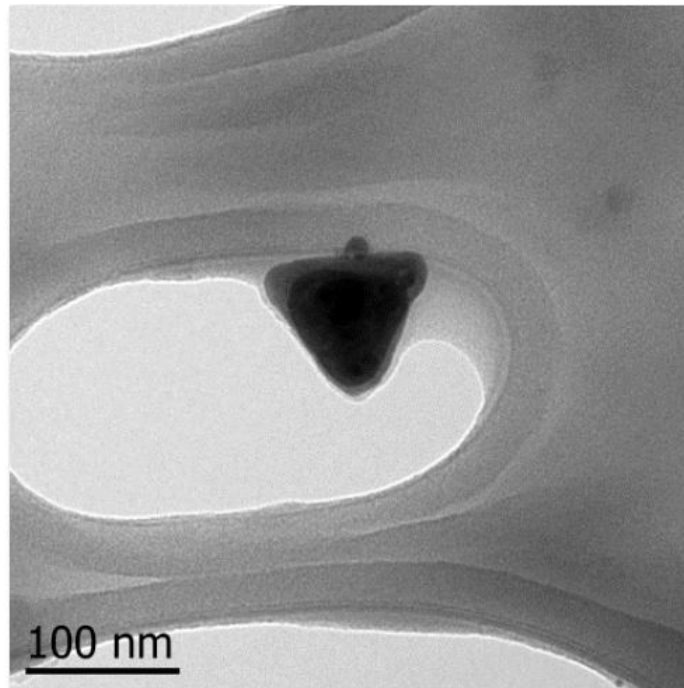


Figura 3.18: Micrografía TEM de de solución de AgNPs Prismas donde se observa la morfología típica obtenida.

3.4. Ensayo de adherencia de *Candida albicans*

El ensayo de adherencia se realizó sobre todos acrílicos dentales termopolimerizados.

A continuación se muestra la gráfica de adherencia final donde se muestran las Unidades Formadoras de Colonias por cada cm^2 de acrílico.

El análisis estadístico mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el acrílico con AgNPs Geranio y todos los demás grupos experimentales. Además de mostrar diferencias significativas entre los grupos de AgNPs Esferas y AgNPs Prismas. Entre el acrílico comercial y la síntesis de PMMA-anatasa no hubo diferencia significativa, por lo que podemos observar que en cuanto a la adherencia de *Candida albicans* la síntesis base exhibe características similares a las de Nature Cryl. El grupo que exhibió las mejores propiedades antifúngicas fue el de PMMA-AgNPs Geranio. Los valores obtenidos fueron los siguientes, de mayor promedio de adherencia a menor: PMMA-AgNPs Prismas con 198 ± 51 UFCs/cm²; luego PMMA-AgNPs Esferas con 195 ± 28 UFCs/cm², seguidos por 145 ± 20 UFCs/cm² del grupo Nature Cryl, después PMMA-anatasa con 140 ± 14 UFCs/cm² y finalizando con el grupo de menor adherencia, PMMA-AgNPs Geranio, con 89 ± 13 UFCs/cm². La siguiente gráfica muestra los resultados por columnas, figura 3.19.

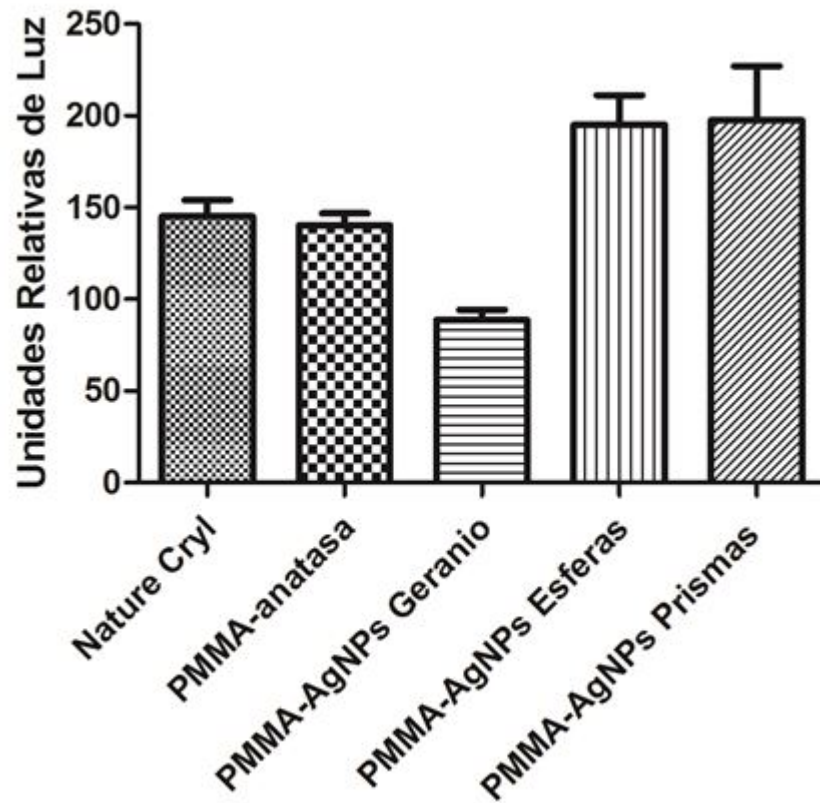


Figura 3.19: Resultados para prueba de adherencia de *Candida albicans*, en UFCs/cm². ANOVA de Una Vía; p<0.05

3.5. Ensayos celulares *in vitro*

3.5.1. MTT

Los resultados para ambos ensayos MTT (24 y 48 h) se muestran a continuación. Todos los grupos de acrílico y soluciones de AgNPs fueron analizados.

MTT 24 h

Todos los grupos experimentales mostraron un porcentaje de viabilidad celular aceptable, como se muestra en la figura 3.20, el más bajo fue de $93\pm 10\%$ correspondiente al grupo PMMA-AgNPs Esferas, siguiendo el orden de incremento se encontró PMMA-AgNPS Geranio con $94\pm 5\%$, luego PMMA-Prismas de $95\pm 12\%$, siguiendo con un $97\pm 4\%$ para Nature Cryl; y el grupo PMMA-anatasa obtuvo el valor más alto con $103\pm 6\%$. No hubo diferencia significativa entre todos los grupos, ($p < 0.05$).

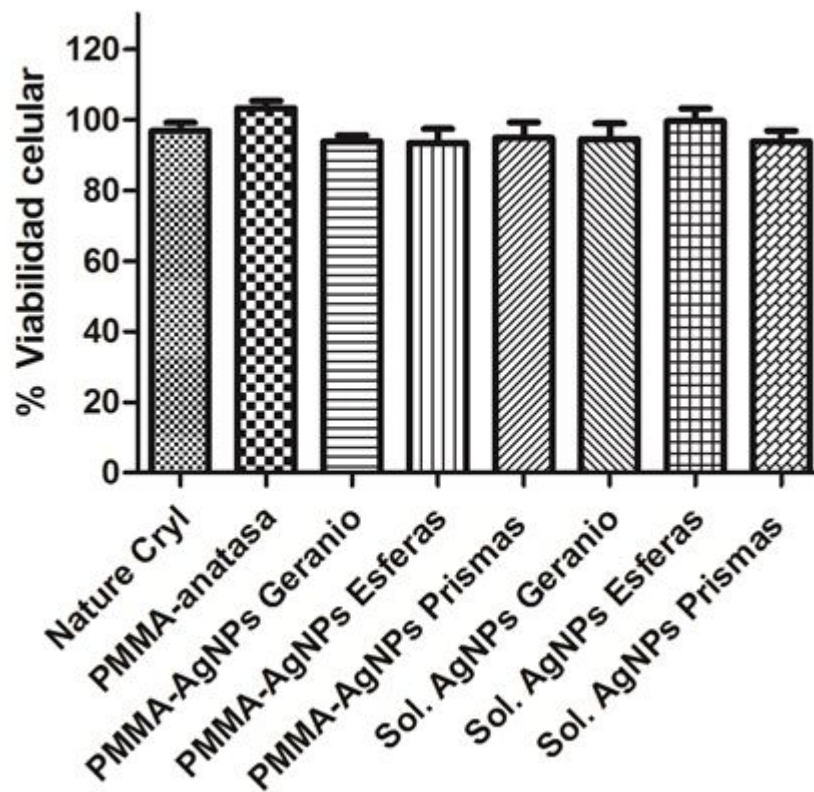


Figura 3.20: Resultados para ensayo MTT a 24 h, ANOVA de Una Vía; $p < 0.05$

MTT 48 h

Para el MTT a 48 h los resultados comenzaron a variar significativamente con respecto al primer ensayo, figura 3.21. Los promedios de porcentaje de viabilidad celular para cada grupo, en orden creciente, son los siguientes: PMMA-AgNPs Prismas $34\pm 2\%$, seguido por $75\pm 4\%$ para Sol. AgNPs Geranio, luego PMMA-AgNPs Geranio con $77\pm 4\%$, $80\pm 18\%$ para el grupo PMMA-AgNPs Esferas, $82\pm 7\%$ para Sol. AgNPs Esferas, $86\pm 25\%$ para Sol. AgNPs Prismas, $83\pm 11\%$ para PMMA-anatasa y $94\pm 2\%$ para Nature Cryl. El análisis comparativo para los grupos mostró que hubo diferencia significativa entre PMMA-AgNPs Prismas y todos los demás grupos experimentales ($p > 0.05$), exclusivamente.

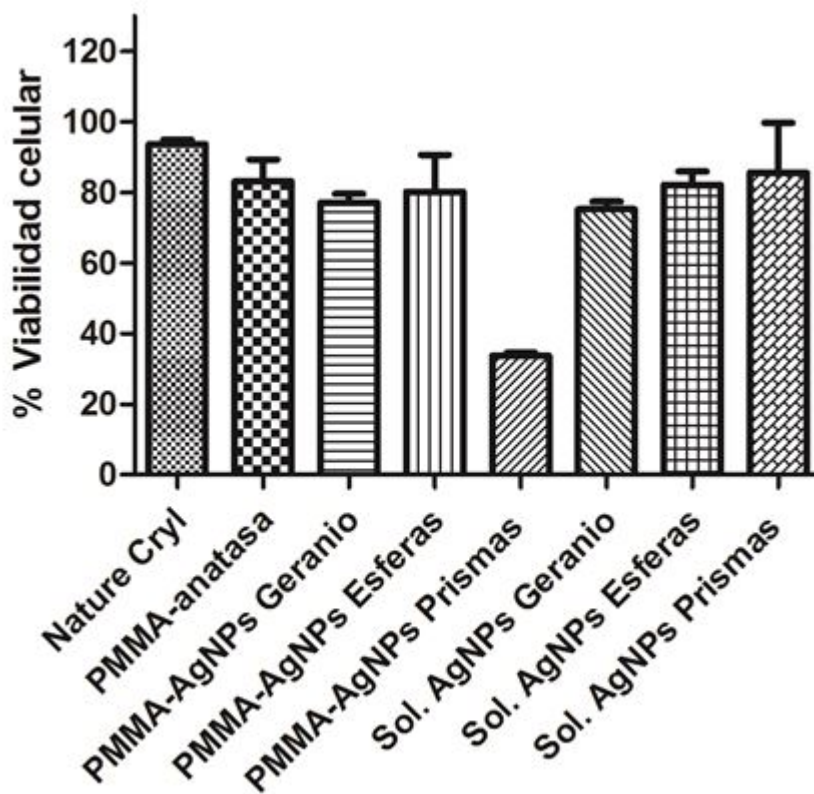


Figura 3.21: Resultados para ensayo MTT a 48 h, ANOVA de Una Vía; $p > 0.05$

3.5.2. BrdU

El análisis estadístico por comparación de columnas no mostró diferencia significativa entre todos los grupos, ($p < 0.05$), figura 3.22. Los valores promedio calculados fueron, en orden creciente, los siguientes: 93 ± 4 % para PMMA-anatasa, 95 ± 18 % para PMMA-AgNPs Geranio, 102 ± 10 % para Sol. AgNPs Prismas, 104 ± 17 % para Sol. AgNPs Geranio, 105 ± 12 % para PMMA-AgNPs Prismas, 107 ± 18 % para PMMA-AgNPs Esferas, 108 ± 14 % Sol. AgNPs Esferas y 111 ± 13 % para Nature Ceryl.

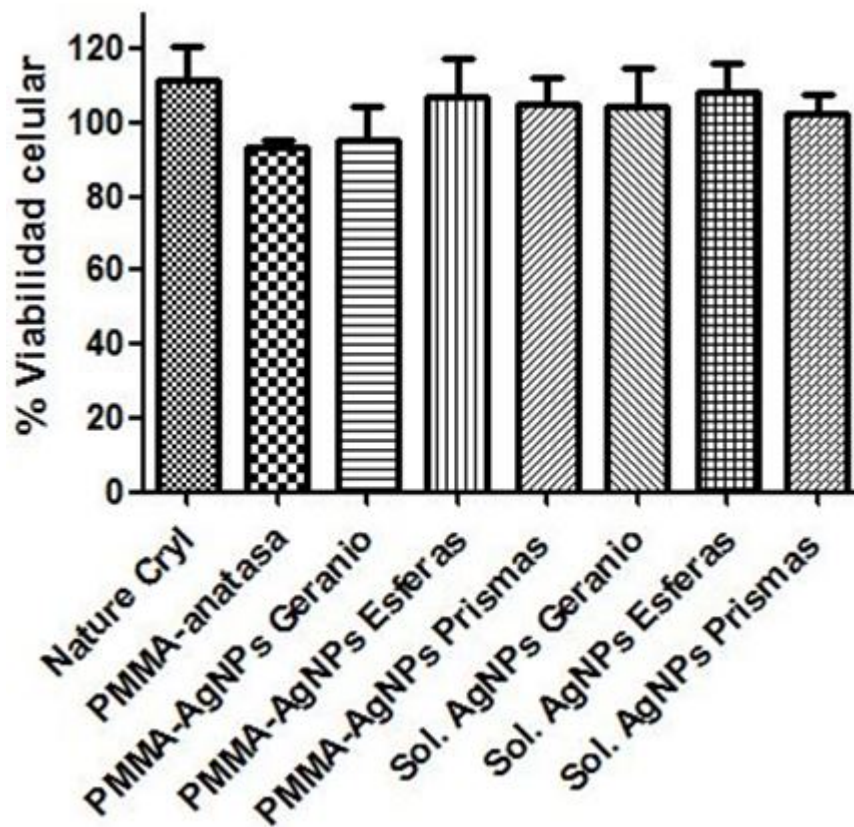


Figura 3.22: Resultados para ensayo BrdU a 24 h, ANOVA de Una Vía; $p < 0.05$

Capítulo 4

Discusión

4.1. Caracterización de nanopartículas de TiO_2 anatasa

Las nanopartículas de anatasa fueron analizadas mediante diferentes técnicas, tanto para verificación de fase cristalina como para conocer sus características morfológicas. Las mediciones de tamaño de la muestra resultaron dentro del mismo rango entre micrografías SEM y TEM, considerados nanométricos. Mediante ambas técnicas mostraron una morfología irregular y dispersión de tamaños muy amplia, al igual que en otros estudios de su morfología a través de métodos de síntesis variados [47]. Las pruebas de espectroscopía y Rayos X confirmaron fase del material, anatasa.

4.2. Caracterización de PMMA-anatasa

El polímero sintetizado mostró una estructura química idéntica a los disponibles comercialmente.

Debido al color final del PMMA sintetizado (preservado antes y después de la termopolimerización) se consideró la posible incorporación de las nanopartículas de anatasa en el material; pues otros acrílicos elaborados a partir de síntesis distintas (con otra concentración de nanopartículas de anatasa o sin estas) mostraron diferentes cara-

cerísticas y pigmentación. La coloración tradicional del acrílico para prótesis dental (encías) es más rosácea en comparación con el acrílico obtenido a partir de la síntesis de PMMA-anatasa, las nanopartículas de anatasa dieron una coloración más tenue; sin embargo, puede considerarse estéticamente adecuada para su utilización como acrílico dental [2].

Las micrografías SEM mostraron un material con un tamaño considerado homogéneo, por lo que las condiciones y método de síntesis se consideraron aceptables para la aplicación evaluada; sin embargo, los diámetros obtenidos son considerados grandes en comparación con otros métodos de síntesis o condiciones de agitación y temperatura. Se ha encontrado una relación directa entre la velocidad de agitación del sistema durante la síntesis y el tamaño de partícula final, por ejemplo, si la síntesis se lleva a cabo con las mínimas variaciones en temperatura y velocidad de agitación relativamente alta, las partículas de PMMA obtenidas tendrán un diámetro menor con una desviación estándar casi nula. Hay experimentos donde se controla en cámaras cerradas todos los factores durante el proceso de síntesis de PMMA y se han obtenido partículas esféricas menores a $1 \mu\text{m}$ de diámetro con una desviación estándar próxima a cero [48].

El análisis termogravimétrico (TGA y DSC) mostró un comportamiento térmico similar a lo esperado de un PMMA tradicional, con lo que este PMMA-anatasa puede someterse a los mismos procesos de termopolimerización sin perder un porcentaje significativo en peso o estabilidad. El porcentaje de pérdida en peso a temperaturas de 100°C es menor al 1%, el material soporta hasta 250°C con sólo una reducción en peso del 5%; por otro lado, el material se desintegra completamente a 450°C . Comparando estos datos con los encontrados en análisis termogravimétricos para el PMMA tradicional, a temperatura de 120°C se da una pérdida de peso del 2% y la descomposición total se da a 410°C . Las nanopartículas de anatasa incorporadas durante la síntesis no cambiaron las propiedades térmicas del polímero base en intervalos de temperatura entre 0 y 250°C . En el termogravígrama obtenido de DSC muestra la fusión del acrílico a temperatura de 161°C , que corresponde a la temperatura de fusión para otros PMMA [49].

4.2.1. Síntesis de esferas y prismas

La síntesis verde, cuyo agente reductor fue la infusión de geranio (cuyo elemento activo se está buscando), mostró nanopartículas uniformes al analizar su morfología esférica en TEM; además de una simetría significativa, por lo que la solución de estas nanopartículas se considera homogénea. La estabilidad de estas disoluciones (considerando solo que no se diera una agregación) se estima en al menos 6 meses (hasta un año), según lo observado durante su almacenamiento. Otros estudios muestran que la estabilidad y agregación de las AgNPs varía dependiendo de la solución en que se encuentren y el tipo de almacenamiento que se les de, por ejemplo, algunos reportan que síntesis de AgNPs con citrato de sodio como reductor y estabilizante pasan alrededor de 21 días sin experimentar cambios en su concentración, tamaño o forma; no se da agregación, pero días después la AgNPs comienzan a tener cambios morfológicos hasta agregarse [50]. Otros reportan que son 15 días los que las nanopartículas permanecen sin agregarse y perder su coloración característica (además de que la exposición a la luz no es un factor de impacto en la degradación de la síntesis) [51].

El tamaño de estas nanopartículas está dentro del rango observado mediante este método de síntesis y agente reductor, que va de 16 hasta 40 nm [19].

La síntesis mediada con borohidruro de sodio como reductor mostró en sus micrografías de fase esférica una distribución de tamaños homogénea en comparación con los prismas sintetizados a partir de las mismas. El diámetro de las AgNPs esféricas sintetizadas con borohidruro mostraron ser unos nanómetros más pequeñas que las obtenidas habitualmente por este método de síntesis, que van alrededor de los 12 nm; sin embargo, al no precipitarse los iones de plata (Ag^+) durante la síntesis y debido al tiempo de estabilidad, se considera que la cantidad de borohidruro de sodio fue suficiente para estabilizar la nucleación. Debido a que cualquier parámetro puede afectar el tamaño de las nanopartículas sintetizadas por este medio, se considera la coloración amarilla una prueba importante de efectividad de la reacción [52].

Los nanoprismas mostraron heterogeneidad debido a que no recibieron un tratamiento posterior con borohidruro de sodio ni más citrato trisódico para modular su

formación. Su estabilidad protegido de la luz se estimó en al menos 6 meses, al igual que las anteriores disoluciones (6 meses después de su síntesis aun se pudo homogeneizar las disoluciones a partir de simple sonicación). Es muy común obtener prismas de plata con una distribución que va de los 25 a 400 nm de longitud por lado, por lo que los primas con tamaños mayores durante la síntesis se encuentran en un tamaño intermedio y dentro de los reportado; por otro lado, se ha encontrado que los prismas de plata poseen características antibacteriales notables debido a su aristas, en comparación con otro tipo de morfología [53].

4.3. Ensayo de adherencia de *Candida albicans*

En cuanto a los ensayos de adherencia de *Candida albicans*, el mejor grupo evaluado fue el de las nanopartículas de plata de geranio, que mostró menor adherencia en comparación con los demás grupos. Entre las esferas de la síntesis química y los prismas sintetizados a partir de esta también hubo diferencia significativa para la aplicación buscada; las variaciones entre morfología y concentraciones no pueden observarse directamente pero se muestra una diferencia importante entre ambos tipos de esferas (síntesis verde y química); además de descartar los prismas como material antifúngico a pesar de estar reportado que esta morfología parece ser más reactiva ante organismos vivos. Pareciera ser que el tamaño de las AgNPs-Geranio exhibieron mejor efecto antifúngico que las de borohidruro (AgNPs-Esferas), algunos estudios sugieren que AgNPs con diámetros promedio de 4 nm y 21 nm muestran excelente incorporación dentro de *E. coli*, con lo que estos resultados experimentales muestran similitudes; por otra parte, una buena razón por la cual las AgNPs-Primas exhibieron una adherencia mayor puede ser su tamaño promedio por lado, 96 nm, lo que dificultaría su interacción directa con *Candida albicans* [53].

4.4. Ensayos celulares *in vitro*

A pesar de obtener porcentajes de viabilidad celular aceptables para las primeras 24 h, evaluando citotoxicidad, y no mostrar diferencias significativas entre grupos, los

acrílicos dentales con AgNPs de geranio y la solución de las mismas nanopartículas obtuvieron valores bajos en el mismo ensayo a 48 h; sin embargo, sólo hubo diferencia significativa comparando el porcentaje de viabilidad celular de todos los grupos y obtenido para los acrílicos de PMMA-AgNPs Prismas. Este resultado puede deberse a los iones de plata que quedaron libres en la solución durante la síntesis de los primas, todos los iones Ag^+ que no formaron un prisma pero sí perdieron su estabilidad de nanopartícula y que son liberados del acrílico después de 48 h; a diferencia de los resultados para el grupo Sol. AgNPs Prismas, que pudo tener un porcentaje de viabilidad mayor debido a que la síntesis tenía menos tiempo de vida, por lo que la formación de iones Ag^+ en el momento de realizar los ensayos pudo ser menor que los liberados en el acrílico dental expuesto al medio de cultivo por 48 h. Durante el ensayo BrdU realizado para verificar la proliferación celular de los acrílicos y soluciones de AgNPs no hubo diferencia significativa entre los grupos evaluados, por lo que se puede decir que el porcentaje de viabilidad celular es el mismo para todos los materiales, incluyendo el comercial.

Capítulo 5

Conclusiones

Con todo lo anterior, resumiendo los resultados de los ensayos, el grupo que mostró menor adherencia de *C. albicans*, PMMA- AgNPs Geranio, también mostró resultados de viabilidad celular similares a los encontrados para Nature Cryl, pero con la característica que se buscaba, reduciendo la adherencia hasta en un 40 % con respecto al disponible comercialmente.

La relación de tamaños de AgNPs esféricas, tanto sintetizadas con geranio como con borohidruro de sodio como reductores, aun no esta determinada; sin embargo se considera que exhibió un mayor efecto sobre la adherencia de *C. albicans* debido al tamaño de la cepa o a una mejor incorporación de las nanopartículas en el acrílico.

Los objetivos generales y particulares de este trabajo se cumplieron, con lo que propone a partir de los anteriores resultados continuar con la evaluación del afecto antifúngico de las AgNPs de Geranio en diferentes concentraciones para encontrar la adecuada relación entre reducción de adherencia de *Candida* y el aumento en el porcentaje de viabilidad para las pruebas de citocompatibilidad.

Otras pruebas que se deben realizar son los mismos ensayos con diferentes síntesis de AgNPs-Prismas (tamaños menores) para evaluar su toxicidad frente a *C. albicans* y repetir ensayos celulares con síntesis a diferentes tiempos de vida.

Apéndice

Preparación de agares

Agar sólido

Los agares sólidos para cultivo de *Candida* se preparan con 6.5 g de agar dextrosa sabouracid (Sigma Aldrich, México) en 100 ml de agua destilada. En un matraz Erlenmeyer se mezclan el agar en polvo y el agua destilada, se mantienen en agitación magnética hasta obtener una dilución libre de grumos, color ámbar y una temperatura de 185°C. Se coloca un tapón de gasa al matraz para evitar derrames. Una vez disuelto el polvo, observando una dilución homogénea, el tapón de gasa se pega al matraz con cinta testigo y se envuelve en papel aluminio para esterilizarse en autoclave. Cuando el autoclave termina el periodo de esterilización (manteniendo a 121 °C por 15 minutos), se toma el agar estéril y se pone en cajas petri para cultivo, se dejan enfriar y solidificar. Sobre el agar sólido se hace el sembrado del hongo.

Caldo de cultivo

Los agares líquidos son para la suspensión y preservación de la cepa en refrigeración. Se utilizan 3 g de Tryptic soy broth (Sigma Aldrich, México) en 100 ml de agua destilada puestos en agitación magnética y a temperatura de 110°C. Se esteriliza en autoclave y se pone en tubos de ensayo de 25 ml con tapón, dispuestos para crecer *C. albicans* sin fijar.

Infusión de geranio filtrado

Para la preparación de la infusión de geranio se utilizan 5 g de hojas verdes de esta planta, las más jóvenes observadas visualmente; se lavan con agua de grifo, jabón y se les da un baño con agua desionizada. Las hojas se muelen en mortero y se ponen en 100 ml de etanol. Se almacena la mezcla en recipiente estéril y se mantiene en refrigeración hasta el día de su utilización. Para la síntesis de AgNPs se filtra previamente.

Preparación de PBS

Para preparar PBS 1X se parte de una a 10X. Los materiales necesarios son 80 g de cloruro de sodio (NaCl), 2.0 g de cloruro de potasio (KCl), 14.4 g de fosfato disódico (Na_2HPO_4) y 2.0 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4); se disuelven en 800 ml de agua desionizada y se ajusta el pH a 7.4, después se afora hasta alcanzar 1 l de PBS. Para PBS al 1X se hacen diluciones con agua desionizada la proporción necesaria. La esterilización del PBS al 1X se realiza en autoclave.

Sales de MTT

Preparar una disolución de 500 mg de sales de MTT en 10 ml de PBS al 1X disueltos hasta que no queda precipitado, preferentemente en oscuridad. Se filtra a $0.22\mu m$ y guarda en alícuotas de 10 ml. *El MTT es tóxico y sensible a la luz, debe protegerse de esta. Para disolver los cristales de formazán se utiliza solución estabilizante o DMSO. *La solución estabilizante es isopropanol acidificado; también pueden utilizarse metanol o etanol.

Apéndice de logros académicos

Publicaciones

- Gómez-Quintero T., Acosta-Torres L.S., Hernández-Padrón G., Campos P., de la Fuente, Castaño V. M. (2012), “Nanopartículas con efecto antifúngico en prótesis dentales”, Ide@s CONCYTEG, 7(87), 1101-1112 pp. ISSN: 2007-2716

Premios y distinciones

- Síntesis de Nano-esferas y Nano-prismas de Plata para Aplicaciones en Biomateriales. T. Gómez-Quintero, L.S. Acosta-Torres, G. Hernández-Padrón, V. M. Sataño-Meneses. Séptimo Coloquio de Tecnología de la UNAM, 25 de enero de 2012 en Juriquilla, Querétaro. Mejor exposición oral en la sesión de Biotecnología.

Congresos

- Síntesis de nanoesferas y nanoprismas de plata para aplicación en biomateriales. Gómez Quintero Teresa, Acosta Torres Laura Susana, Hernández Padrón Genoveva, Castaño Meneses Víctor Manuel. IX Encuentro de la Mujer en la ciencia. Organizado por el Centro de Investigaciones en Óptica en mayo 2012, León, Gto. Poster.

Bibliografía

- [1] B. C. Webb, C. J. Thomas, M. D. Willcox, D. W. Harty, and W. K. Knox. Candida-associated denture stomatitis. aetiology and management: a review. *Australian Dental Journal.*, 43(1):45–50, 1998.
- [2] F. H. Munzenmayer. Dentures are esthetic dentistry. *Journal of Dental Technology.*, pages 34–39, 2010.
- [3] D. Togawa, T. W. Bauer, I. H. Lieberman, and S. Takikawa. Histologic evaluation of human vertebral bodies after vertebral augmentation with polymethyl methacrylate. *Spine.*, 28 (14):1521–1527, 2003.
- [4] R. Q. Frazer, R. T. Byron, P. B. Osborne, and K. P. West. Pmma: an essential material in medicine and dentistry. *Journal of long-term effects of medical implants.*, 15(6):629–39, 2005.
- [5] A. Bascones, J. M. Vega, N. Olmo, J. Turnay, N. Gavilanes, and M. A. Lizarbe. *Polymeric Biomaterials, Capítulo 16.* 2002.
- [6] S. L. Avon, J. P. Goulet, and N. Deslauriers. Removable acrylic resin disk as a sampling system for the study of denture biofilms in vivo. *The Journal of Prosthetic Dentistry.*, 97:32–38, 2007.
- [7] K. H. Abu-Elteen and R. M. Abu-Alteen. The prevalence of candida albicans populations in the mouths of complete denture wearers. *New Microbiol.*, 21 (1):41–48., 1998.

-
- [8] K. S. Kim, Y. S. Kim, I. Han, M. H. Kim, M. H. Jung, and et al. Quantitative and qualitative analyses of the cell death process in candida albicans treated by antifungal agents. *PLoS ONE.*, 6:12, 2011.
- [9] A. Benetucci, I. N. Tiraboschi, N. Fernández, B. Perazzi, and M. B. Lasala. Factores de riesgo asociados a candidemias causadas por múltiples especies. *Revista Argentina de Microbiología.*, 40:30–36, 2008.
- [10] W. Cornistein, A. Mora, N. Orellana, F. J. Capparelli, and M. Del Castillo. Candida: epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.*, 31(6):380–4., 2013.
- [11] C. Salerno, Pascale. M., M. Contaldo, V. Esposito, Busciolano. M., L. Milillo, A. Guida, M. Petruzzi, and R. Serpico. Candida-associated denture stomatitis. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal.*, 16:139–143, 2011.
- [12] R. Zaragoza and J. Pemán. Opciones terapéuticas para el tratamiento antifúngico en el paciente crítico. *Revista Iberoamericana de Micología.*, 29(2):108–113, 2012.
- [13] Market study: Titanium dioxide (uc-4705). Technical report, Ceresana: Market Intelligence Consulting., 2013.
- [14] H. Yin, Y. Wada, T. Kitamura, S. Kambe, S. Murasawa, H. Mori, T. Sakata, and S. Yanagida. Hydrothermal synthesis of nanosized anatase and rutile tio₂ using amorphous phase tio₂. *Journal of Materials Chemistry.*, 11:1694–1703, 2001.
- [15] C. Lazau, L. Mocanu, I. Miron, P. Sfirloaga, G. Tanasiea, C. Tatu, A. Gruia, and I. Grozescu. Consideration regarding the use of tio₂ doped nanoparticles in medicine. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures.*, 2:257–263, 2007.
- [16] F. Qi, A. Moiseev, J. Deubener, and A. Weber. Thermostable photocatalytically active tio₂ anatase nanoparticles. *Journal of Nanoparticles Research.*, 13:1325–1334, 2011.

- [17] D. Ashok kumar. Rapid and green synthesis of silver nanoparticles using the leaf extracts of parthenium hysterophorus: A novel biological approach. *International Research Journal of Pharmacy.*, 2 (2):169–173, 2012.
- [18] V. K. Sharma, R. A. Yngard, and Y. Lin. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science.*, 145:83–96, 2009.
- [19] S. Shiv Shankar, A. Ahmad, and Sastry. M. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. *Biotechnology Progress.*, 19:1627–1631, 2008.
- [20] D. Sanglard and F. C. Odds. Resistance of candida species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infectious Diseases.*, 2:73–85, 2002.
- [21] C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, D. S. Sutherland, and H. Autrup. Toxicity of silver nanoparticles—nanoparticle or silver ion. *Toxicology Letters.*, 208:286–292, 2012.
- [22] R. Lima, L. O. Feitosa, D. Ballotin, P. D. Marcato, L. Tasic, and N. Durán. Cytotoxicity and genotoxicity of biogenic silver nanoparticles. In *Journal of Physics: Conference Series 429*, 2013.
- [23] J. Meerloo, G. J. L. Kaspers, and J. Cloos. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, Second Edition, Methods in Molecular Biology*. Springer Science., 2011.
- [24] T. Chen, N. Mei, and P. P. Fu. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Applied Toxicology.*, 30:183–196, 2010.
- [25] H. Tan, Z. Penq, Q. Li, X. Xu, S. Guo, and T. Tang. The use of quaternised chitosan-loaded pmma to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant staphylococcus. *Bio-materials.*, 33 (2):365–377, 2012.

-
- [26] S. Hsu. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry.*, chapter IR Spectroscopy , Infrared Spectroscopy., pages 247–283. Prentice Hall PTR (ECS Professional)., 2009.
- [27] Thermo Fisher Scientific Inc. *Molecular spectroscopy. Introduction to Raman Raman Spectroscopy.*, 2003- 2008. pp. 1-12.
- [28] Thermo Spectronic. *Basic UV-Vis Theory, Concepts and Applications.*, 2010.
- [29] S. A. Speakman. Basics of x-ray powder diffraction, mit. 2013.
- [30] B. Voutou. Physics of advanced materials winter school 2008. In *Electron Microscopy: the basics*, 2008.
- [31] Hafner B. *Scanning Electron Microscopy Primer.* Characterization Facility, University of Minnesota., 2007.
- [32] B. D. Williams and C. B. Carter. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science.* Springer Science., 2009.
- [33] PerkinElmer. *Thermogravimetric Analysis (TGA): A beginner's Guide.*, 2010.
- [34] A. Tuite, A. Mullick, and P. Gros. Genetic analysis of innate immunity in resistance to candida albicans. *Nature Publishing Group: Genes and Immunity.*, 5:576–567, 2004.
- [35] Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Capítulo 60.* 2006.
- [36] G. Loyzaga. *Cultivo de células animales y humanas: Aplicaciones en medicina regenerativa.*, chapter Segunda parte: cultivo de células animales y humanas., pages 147–161. Fundación FG-UCM., 2011.
- [37] L. S. Acosta-Torres, L. M. López-Marín, R. E. Núñez-Anita, G. Hernández-Padrón, and V. M. Castaño. Biocompatible metal-oxide nanoparticles: Nanotechnology improvement of conventional prosthetic acrylic resins. *Journal of Nanomaterials*, 109:1–8, 2011.

- [38] Roche. *Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric).*, 2010.
- [39] L. S. Acosta-Torres, F. H. Barceló-Santana, C. A. Álvarez Gayosso, and J. Reyes-Gasga. Synthesis and characterization of poly(methyl methacrylate) polymerized by microwave energy or conventional water bath. *Journal of Applied Polymer Science.*, 109:3953–3960, 2008.
- [40] L. S. Acosta Torres, E. B. Bejarano de Jesús, A. I. Mendieta Trejo, G. Hernández Padrón, and V. M. Castaño. Efecto antifúngico de un pm-ma/nanopigmentos con agnps. *Biomateriales en Odontología Actual.*, 99:44–47, 2011.
- [41] J. P. Steghens, K. L. Min, and J. C. Bernengo. Firefly luciferase has two nucleotide binding sites: effect of nucleoside monophosphate and coa on the light-emission spectra. *Biochemical Journal.*, 336:109–113, 1998.
- [42] George Socrates. *Infrared and Raman Characteristics Group Frequencies: Tables and Charts.* John Wiley and Sons, LTD., third edition. edition, 2001.
- [43] S. V. Ingale, P. B. Wagh, A. K. Tripathi, A. S. Dudwadkar, S. S. Gamre, P. T. Rao, I. K. Singh, and S. C. Gupta. Photo catalytic oxidation of tnt using tio₂-sio₂ nanocomposite aerogel catalyst prepared using sol-gel process. *Journal of Sol-Gel Science and Technology.*, 58 (3):682–688, 2011.
- [44] S. Bagheri, K. Shameli, S. Bee, and A. Hamid. Synthesis and characterization of anatase titanium dioxide nanoparticles using egg white solution via sol-gel method. *Journal of Chemistry*, 2013:1–5, 2013.
- [45] R. Das, S. S. Nath, D. Chakdar, G. Gope, and R. Bhattacharjee. Preparation of silver nanoparticles and their characterization. *AZo Open Access Rewards System*, 2009.
- [46] A. Power, J. Cassidy, and T. Betts. Non aggregated colloidal silver nanoparticles for surface enhanced resonance raman spectroscopy. *Analytical Chemistry Commons.*, 136:2794–2801, 2011.

-
- [47] D. Verhovšek, N. Veronovski, U. Lavrenčič Štangar, M. Kete, K. Žagar, and M. Čeh. The synthesis of anatase nanoparticles and the preparation of photocatalytically active coatings based on wet chemical methods for self-cleaning applications. *International Journal of Photoenergy.*, 2012:1–10, 2012.
- [48] F. Novio, E. Evangelio, N. Vazquez-Mera, P. González-Monje, E. Bellido, S. Mendes, N. Kehagias, and D. Ruiz-Molina. Robust spin crossover platforms with synchronized spin switch and polymer phase transition. *Scientific reports*, 3:1–7, 2013.
- [49] M. Natamai Subramanian. *Polymer Testing: Chapter 6, Thermoplastics*. Momentum Press., 2012.
- [50] M. Tejamaya, I. Römer, R. C. Merrifield, and J. R. Lead. Stability of citrate, pvp, and peg coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Journal of Environmental Science and Technology.*, 46 (13):7011–7017, 2012.
- [51] X. Li and J. Lenhart. Aggregation and dissolution of silver nanoparticles in natural surface water. *Journal of Environmental Science and Technology.*, 46 (10):5378–5386, 2012.
- [52] K. Mavani and M. Shah. Synthesis of silver nanoparticles by using sodium borohydride as a reducing agent. *International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)*, 2(3):1–5.
- [53] P. Van Dong, C. Hoang Ha, L. Tran Binh, and J. Kasbohm. Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles. *International Nano Letters*, 2(9):1–9, 2012.