



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE
LA SALUD
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

CAMPO DEL CONOCIMIENTO DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS: BIOMATERIALES

**Efecto antifúngico de nanopartículas de sulfuro de plata en *Candida albicans*
para aplicación en acondicionadores de tejido**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
EDNA PAMELA VILCHIS VALADEZ

TUTORA: Dra. Ma. Concepción Arenas Arrocena, ENES León

León, Gto. Noviembre 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de crecimiento profesional y personal.

A la ENES Unidad León de la UNAM por darme más de lo que pude imaginar y permitirme ser parte de esta gran comunidad, sobre todo por ser mi segundo hogar.

A La Mtra. Paloma Netzayeli Serrano Díaz por su apoyo científico y emocional en todo momento.

A la Dra. Laura Susana Acosta Torres por el apoyo incondicional, la motivación y por creer en mí.

A la Dra. Ma. Concepción Arenas Arrocena por el apoyo incondicional que siempre me brindo y por inspirarme a cumplir mis objetivos.

Al Dr. Rene García Contreras por todo el apoyo que me brindo.

A la Dra. Lourdes Palma Tirado del INB-UNAM por las mediciones de TEM, Dra. Marina Vega González del CGeo-UNAM por las mediciones en SEM y EDS, al Dr. German Alvarado Tenorio de Centro de Investigación en Química Aplicada por las mediciones de TGA.

Al proyecto PAPIIT-DGAPA IN112921: Síntesis in-situ de composites de politiofenos/sulfuros metálicos funcionalizados para aplicaciones fotovoltaicas, por la beca otorgada para la conclusión de este proyecto.

DEDICATORIAS

A Dios, a la vida, al universo.

A mis padres Felipe Vilchis y Patricia Valadez, por ser mi gran ejemplo a seguir, mi fuerza y la luz que me guía en cada paso que doy, porque no se cansan de apoyarme o de verme soñar y sobre todo por dejarme crecer y creer con libertad, gracias infinitas por todo el amor que siempre tienen para mí, son el amor de mi vida.

A mis hermanos por siempre hacerme reír, pero sobre todo a Felipin por ser mi alma gemela y mi mejor amigo, por ser el refugio que siempre necesito en los días más difíciles y una de mis más grandes motivaciones para seguir adelante en cada aventura que emprendo. Te amo con todo mi ser.

A mi mejor amigo canino Black por ser mi pedacito de cielo y mi espacio de paz en este turbio mundo.

A Victor Mora, por enseñarme a ver el mundo desde otra perspectiva, por dejarme ser libre, por acompañar y apoyar cada sueño haciéndolo alcanzable, por hacerme una mejor persona y por amar cada diferencia que hay entre nosotros, por haberme acompañado durante esta travesía desde el día 0 hasta el día de hoy. Porque revolucionas mi mundo, Te amo.

A mi amiga del alma Paloma Serrano por hacer de estos dos años una experiencia increíble, por todo el conocimiento que me brindaste con paciencia y amor por la ciencia, por ser mi confidente y mi hombro para llorar cada que algo salía mal. Gracias por creer en mí y sobre todo por tu amistad incondicional. Te admiro demasiado.

A cada persona que me dio su mano, su hombro para llorar, una sonrisa sincera, paz y su tiempo durante este magnífico proceso. Gracias totales.

Por último, pero no menos importante a mis profesoras que dejaron una marca dentro de mí y un pedacito de ellas en mi mundo. Dra. Lau, Dra. Cony, Dra. Carmen, Dra. Harumi, Dra. Kalpana, Dra. Ilane, las admiro y aplaudo son maravillosas.

¡A todos ustedes!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
DEDICATORIAS	3
RESUMEN	6
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. MARCO TEÓRICO	11
1.1 <i>CANDIDA ALBICANS</i> Y CANDIDIASIS ORAL	11
2.2. ESTOMATITIS PROTÉSICA Y TRATAMIENTO CON AGENTES ANTIFÚNGICOS ANTIBIÓTICOS	13
2.3 ACONDICIONADORES DE TEJIDOS ADICIONADOS CON AGENTES ANTIFÚNGICOS	15
2.4 NANOPARTÍCULAS DE SULFURO DE PLATA: SÍNTESIS Y PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y CITOTÓXICAS	19
2.5 PRINCIPIOS FÍSICOS DE TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES	25
<i>ESPECTROSCOPIA UV-Vis</i>	25
<i>DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)</i>	25
<i>ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)</i>	26
<i>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)</i>	27
<i>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)</i>	28
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
4. JUSTIFICACIÓN	29
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	30
6. HIPÓTESIS	30
7. OBJETIVO GENERAL	31
7.1 <i>Objetivos Específicos</i>	31
8. MATERIALES Y MÉTODOS	31
8.1 <i>Tipo de Estudio</i>	31
8.2 <i>Criterios de Selección</i>	31
<i>Criterios de Inclusión</i>	31
<i>Criterios de Exclusión</i>	32
<i>Criterios de Eliminación</i>	32
8.3 <i>Variables</i>	32
8.4 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE SULFURO DE PLATA EXPERIMENTALES SIN Y CON POLIETILENGLICOL	34
8.6 <i>Esterilización de nanopartículas de sulfuro de plata</i>	36
8.7 <i>Caracterización de nanopartículas mediante UV-Vis, TEM, DRX, MEB, EDS y TGA</i>	37
<i>Espectroscopia de UV-Vis</i>	37
<i>Microscopía Electrónica de Transmisión</i>	37
<i>Difracción de rayos X</i>	37
8.8 ENSAYOS ANTIFÚNGICOS DE NANOPARTÍCULAS DE SULFURO DE PLATA EN <i>CANDIDA ALBICANS</i>	39
8.8.1 <i>Ensayo de difusión en agar</i>	39
8.8.2 <i>Ensayo de susceptibilidad antifúngica de nanopartículas de sulfuro de plata en Candida albicans</i>	40
8.9 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE SULFURO DE PLATA (Ag ₂ S) EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS (FGH)	41
9. RESULTADOS	42
9.1 PROPIEDADES MORFOLÓGICAS, ÓPTICAS Y ESTRUCTURALES DE SULFURO DE PLATA	42



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.

9.3 PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS DE SULFURO DE PLATA EN <i>CANDIDA ALBICANS</i>	52
9.4 CITOTOXICIDAD DE SULFURO DE PLATA EN FGH	55
10. DISCUSIÓN.....	57
11. CONCLUSIÓN	58
12. REFERENCIAS.....	60
ANEXOS.....	65
1. ARTÍCULOS EN PROCESO	65
2. PUBLICACIÓN DE UN ARTÍCULO DE REVISIÓN.....	66
3. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS.....	67

RESUMEN

Objetivo: Estudiar la respuesta antifúngica de las nanopartículas de sulfuro de plata (Ag_2S) en *Candida albicans* (ATCC 90028), así como evaluar la citotoxicidad en células orales como Fibroblastos Gingivales Humanos (FGH) para aplicaciones en acondicionadores de tejidos.

Métodos: Las Nanopartículas de sulfuro de plata se obtuvieron por síntesis química asistida con ultrasonido. Se realizaron dos síntesis bajo diferentes condiciones, condición experimental sin polietilenglicol (Ag_2S EX) y condición experimental con polietilenglicol (Ag_2S PEG), fueron comparadas con nanopartículas comerciales (Ag_2S COM) de la marca Sigma Aldrich. Se realizó la caracterización de Uv-Vis, TEM, SEM, DRX y TGA y se realizaron pruebas de susceptibilidad y difusión en agar en *Candida albicans* con las nanopartículas de sulfuro de plata en concentraciones de 7.5 mg/mL a 0.11 mg/mL, incubadas a 37 °C durante 24 h. La viabilidad celular de las líneas celulares de Fibroblastos Gingivales Humanos (FGH) se realizó mediante el método MTT en placas de 96 pocillos incubadas a 37°C en 5% de CO_2 durante 24 h con las concentraciones de nanopartículas ya mencionadas. Se realizaron análisis estadísticos ANOVA de una vía y la prueba de Tukey.

Resultados: Se obtuvieron nanopartículas semiesféricas con un tamaño de partícula entre 1-10 nm con un aspecto aglomerado. La concentración mínima inhibitoria fue de 0.23 mg/mL tanto para las nanopartículas experimentales (Ag_2S EX) como para las nanopartículas con polietilenglicol (Ag_2S PEG), mientras que para las nanopartículas comerciales (Ag_2S COM) fue de 3.75 mg/mL. Por el método de difusión en agar se obtuvieron zonas de inhibición de 14 mm para las nanopartículas experimentales (Ag_2S EX), se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los grupos, excepto en los siguientes grupos de dosis utilizados 3.5 mg/mL vs. 1.87 mg/mL, 1.87 mg/mL vs. 0.93 mg/mL, 0.93 mg/mL vs. 0.46 mg/mL, 0.93 mg/mL vs. 0.23 mg/mL, 0.46 mg/mL vs. 0.23 mg/mL. Para el sulfuro de plata experimental con polietilenglicol (Ag_2S PEG) (se encontraron diferencias significativas en algunos grupos de dosis, a excepción del grupo de dosis 0.46 mg/mL vs. 0.23 mg/mL, 0.23 mg/mL vs. 0.11 mg/mL, 0.23 mg/mL vs. 0.05 mg/mL y 0.11 mg/mL vs. 0.05 mg/mL los cuales no mostraron diferencia estadísticamente significativa. El sulfuro de plata comercial (Ag_2S COM) no mostró zonas de inhibición en ninguna de sus dosis. En el ensayo de citotoxicidad las nanopartículas comerciales (Ag_2S COM) mostraron un efecto se puede observar un incremento en la proliferación celular de forma dosis-dependiente, por lo que según la norma internacional para citotoxicidad (ISO 10993) se considera no citotóxico. El sulfuro de plata experimental (Ag_2S EX) tiene un efecto citotóxico dosis- dependiente y una dosis citotóxica media CC_{50} de 0.22 mg/mL. El sulfuro de plata experimental con polietilenglicol (Ag_2S PEG) tiene un efecto de hormesis a las primeras 3 dosis bajas y la dosis citotóxica media CC_{50} es de 0.099 mg/mL.



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.

Conclusión: El método de síntesis química asistida por ultrasonido fue efectivo para obtener nanopartículas de sulfuro de plata, las cuales mostraron efectividad contra *Candida albicans* y mostraron actividad no citotóxica en algunas dosis, por lo que estos resultados pueden conducir a la potencial aplicación en acondicionadores de tejidos.

ABSTRACT

Objective: To study the antifungal response of silver sulfide nanoparticles (Ag₂S) on *Candida albicans* (ATCC 90028), as also to evaluate the cytotoxicity on oral cells such as Human Gingival Fibroblasts (HGF) for applications in tissue conditioners.

Methods: Silver sulfide nanoparticles were obtained by ultrasound-assisted chemical synthesis. Two syntheses were performed under different conditions, experimental condition without polyethylene glycol (Ag₂S EX) and experimental condition with polyethylene glycol (Ag₂S PEG), were compared with commercial nanoparticles (Ag₂S COM) of Sigma Aldrich brand. Uv-Vis, TEM, SEM, XRD and TGA characterization and susceptibility and agar diffusion tests were performed on *Candida albicans* with the silver sulfide nanoparticles at concentrations from 7.5 mg/mL to 0.11 mg/mL, incubated at 37 °C for 24 h. Cell viability of Human Gingival Fibroblast (HGF) cell lines was performed by the MTT method in 96-well plates incubated at 37°C in 5% CO₂ for 24 h with the aforementioned nanoparticle concentrations. One-way ANOVA statistical analysis and Tukey's test were performed.

Results: Semispherical nanoparticles with a particle size between 1-10 nm with an agglomerated appearance were obtained. The minimum inhibitory concentration was 0.23 mg/mL for both experimental nanoparticles (Ag₂S EX) and nanoparticles with polyethylene glycol (Ag₂S PEG), while for commercial nanoparticles (Ag₂S COM) it was 3.75 mg/mL. By the agar diffusion method, inhibition zones of 14 mm were obtained for the experimental nanoparticles (Ag₂S EX), significant differences were found in most of the groups, except for the following dose groups used 3.5 mg/mL vs. 1.87 mg/mL, 1.87 mg/mL vs. 0.93 mg/mL, 0.93 mg/mL vs. 0.46 mg/mL, 0.93 mg/mL vs. 0.23 mg/mL, 0.46 mg/mL vs. 0.23 mg/mL. For the experimental silver sulfide with polyethylene glycol (Ag₂S PEG) (significant differences were found in some dose groups, except for the dose group 0.46 mg/mL vs. 0.23 mg/mL, 0.23 mg/mL vs. 0.11 mg/mL, 0.23 mg/mL vs. 0.05 mg/mL and 0.11 mg/mL vs. 0.05 mg/mL which showed no statistically significant difference. Commercial silver sulfide (Ag₂S COM) showed no zones of inhibition at any of its doses. In the cytotoxicity test, the commercial nanoparticles (Ag₂S COM) showed a dose-dependent increase in cell proliferation, which according to the international standard for cytotoxicity (ISO 10993) is considered non-cytotoxic. Experimental silver sulfide (Ag₂S EX) has a dose-dependent cytotoxic effect and a mean CC₅₀ cytotoxic dose of 0.22 mg/mL. The experimental silver sulfide with polyethylene glycol (Ag₂S PEG) has a hormesis effect at the first 3 low doses and the mean CC₅₀ cytotoxic dose is 0.099 mg/mL.

Conclusion: The ultrasound-assisted chemical synthesis method was effective to obtain silver sulfide nanoparticles, which showed effectiveness against *Candida albicans* and showed non-cytotoxic activity at some doses, so these results can lead to potential application in tissue conditioners.

1. INTRODUCCIÓN

Las especies de *Candida* aisladas de la cavidad bucal son: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis* (Agrawal, 2014). *Candida albicans* es un microorganismo presente en la microbiota oral normal que coexiste en armonía con otros miembros, sin embargo, es una de las pocas especies de hongos que pueden causar enfermedades en los humanos (Lohse, 2018). Existen cambios que alteran su balance, por ejemplo: variaciones del pH en el medio local, el uso de antibióticos o alteraciones del sistema inmunológico causado por infección o terapia inmunosupresiva, lo que propicia la rápida proliferación de *Candida albicans* (Vande Velde, 2014). Además, *Candida albicans* es la especie fúngica más predominante que se aísla de dispositivos médicos como prótesis dentales, catéteres, marcapasos, válvulas cardíacas, prótesis articulares y lentes de contacto (Kojic & Darouiche, 2004).

Según el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB) el 0.8% de los adultos mayores portadores de prótesis removibles presentan estomatitis protésica, la cual es una enfermedad recurrente y debilitante causada principalmente por *Candida albicans* (Agrawal, 2014). Se han desarrollado prótesis removibles anticandidales como una estrategia prometedora para manejar esta condición (Dorocka-Bobkowska et al., 2017). Aunque la falta de eficacia a largo plazo de estos dispositivos se debe principalmente a su incapacidad para incorporar suficientes medicamentos para un uso prolongado (Neuen, 2011). Además, los materiales existentes de prótesis anticandidales liberan los medicamentos impregnados de manera incontrolada. Específicamente, estas prótesis antimicrobianas liberan inicialmente altas concentraciones de fármacos antifúngicos independientemente de si existe una infección activa y esto es seguido por una disminución exponencial en la liberación del fármaco. Cuando ya no se alcanza la concentración inhibitoria mínima, se pierde la actividad anticandidal de estos dispositivos (Tosun, 2011).

Los acondicionadores de tejidos son materiales de revestimiento utilizados en pacientes portadores de prótesis removibles que requieren un ajuste en la distribución de las cargas de masticación debido a que son transferidas a los tejidos blandos durante el movimiento (Krishnamurthy & Hallikerimath, 2016) dichos materiales de revestimiento blando se contaminan fácilmente en el entorno oral y no es posible limpiarlos o cepillarlos de manera efectiva (Broek et al., 2011). Diversos estudios afirman que los acondicionadores de tejidos son colonizados con rapidez por hongos y bacterias, además, es difícil mantener una concentración eficaz del fármaco en las superficies y tejidos infectados debido al flujo salival, la lengua y los movimientos de deglución, que rápidamente disuelven y eliminan el fármaco de la cavidad bucal. La degradación gradual y el endurecimiento que muestran los materiales elásticos temporales requieren su reemplazo por materiales de rebase similares o de largo plazo, por no más de 14 días, que es similar al



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.

período de tratamiento de la estomatitis protésica con antifúngicos tópicos convencionales (Bueno et al., 2015) (Baygar et al., 2018) (Lee et al., 2018).

Actualmente, las terapias antimicóticas son escasas e incluyen solo cuatro agentes antifúngicos: polienos, triazoles, equinocandinas y flucitosa (Chowdhary et al., 2017). Además, el uso indiscriminado de agentes antifúngicos en las últimas dos décadas ha contribuido al desarrollo de resistencia antifúngica (Perlin et al., 2017).

Por otro lado, las nanopartículas son consideradas una alternativa a los antibióticos y parecen tener alto potencial como opción a la problemática de resistencia bacteriana (Rai et al., 2012) ya que muestran propiedades físicas y químicas específicas, que permiten la creación de nuevos materiales, herramientas y sistemas nanométricos con múltiples aplicaciones en biología y medicina, entre ellas, su aplicación en el control de proliferación de microorganismos interviniendo en los mecanismos de funcionamiento celular de bacterias y hongos (Salata, 2004).

Por otro lado, las nanopartículas de sulfuro de plata (Ag_2S) puede ser utilizado en biomedicina debido a sus propiedades antimicrobianas contra una amplia gama de microorganismos Gram positivos y Gram negativos (Zheng et al., 2018). El mecanismo de acción de las nanopartículas de sulfuro de plata no ha sido completamente dilucidado, sin embargo se sabe que los iones de plata se unen a proteínas y ácidos nucleicos que están cargados negativamente causando cambios estructurales y deformaciones en estructuras como la pared bacteriana debido a las especies reactivas de oxígeno foradas (Franci et al., 2015).

El objetivo de la presente investigación es estudiar el efecto antifúngico de las nanopartículas de sulfuro de plata (Ag_2S) en presencia de *Candida albicans*, así como evaluar su citotoxicidad como una alternativa de tratamiento para la estomatitis protésica en acondicionadores de tejido.

2. MARCO TEÓRICO

1.1 *Candida albicans* y Candidiasis oral

Las especies de *Candida* son los hongos predominantes aislados de dispositivos médicos infectados, *Candida albicans* (*C. albicans*) es la especie más comúnmente identificada en contextos clínicos y es una de las principales causas de infecciones intrahospitalarias; las infecciones producidas por *Candida albicans* van desde infecciones superficiales de la mucosa y dérmica hasta infecciones diseminadas en torrente sanguíneo, que representan el 40% de la mortalidad (Lohse et al., 2018).

C. albicans es un miembro de la microbiota humana sana, colonizando asintómicamente varios nichos en el cuerpo, incluidos entre otros, el tracto gastrointestinal, el tracto vaginal, la cavidad oral y la piel (Lohse et al., 2018). Entre el 30 y el 70% de los individuos sanos portan al menos una especie de *Candida* en su forma comensal que puede causar infecciones sistémicas invasivas y del torrente sanguíneo potencialmente mortales (Gow & Yadav, 2017).

C. albicans forma biopelículas (biofilms) altamente estructuradas, compuestas por múltiples tipos de células (células redondas en forma de levadura, células pseudohifales ovaladas y células hifas alargadas) encerradas en una matriz extracelular. Una vez que se logra el biofilm en un dispositivo médico implantado (dentaduras, lentes de contacto, marcapasos, etc.), este actúa como un reservorio de células patógenas y se vuelve altamente resistente a los medicamentos y al sistema inmunológico del huésped (Gulati & Nobile, 2017).

Las células dentro de los biofilms tienen propiedades que son distintas de sus contrapartes planctónicas (que flotan libremente). *Candida albicans* ha demostrado que el desarrollo del biofilm se ha dividido en cuatro etapas (Figura 1): I) adherencia a una superficie (Adherence), II) proliferación en la superficie (Initiation), III) maduración en un biofilm complejo (Maturation), y IV) dispersión de células (Dispersion) desde el biofilm para sembrar nuevos nichos (Lohse et al., 2018).



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.

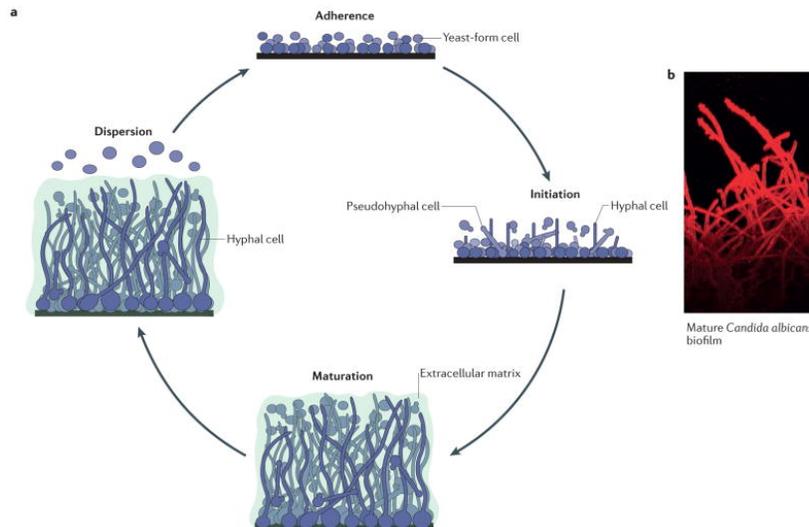


Figura 1. Etapas del desarrollo del biofilm (Lohse et al., 2018).

La cavidad oral es un hábitat excepcionalmente complejo que alberga comunidades microbianas únicas y diversas que coexisten en un equilibrio crucial para mantener la salud oral. Cualquier alteración en este ecosistema que resulte en el dominio de una especie patógena (disbiosis) puede conducir al desarrollo de una enfermedad oral (Duran-Pinedo & Frias-Lopez, 2015).

Dentro de las comunidades microbianas, se producen interacciones extensas entre especies que pueden ser sinérgicas, ya que la presencia de un organismo puede proporcionar un nicho para otros mejorando la colonización. Además, también se producen comunicaciones metabólicas entre los consorcios microbianos; por ejemplo, la excreción de un metabolito por un organismo puede ser utilizada como nutriente para otros organismos, además de funcionar como andamio estructural para lograr la entrada en el hospedador (O'Donnell et al., 2015).

En la cavidad oral, la coadhesión de *Candida albicans* con bacterias es esencial para la persistencia de esta y por lo tanto, dichas interacciones pueden mejorar la colonización en el huésped humano (Montelongo-Jauregui & Lopez-Ribot, 2018).

La Candidiasis oral es una infección micótica oportunista que comúnmente afecta la mucosa oral, siendo el principal agente causal, *Candida albicans*. Se caracteriza por el crecimiento excesivo de hongos y la invasión de tejidos superficiales, se le da el término coloquial de candidiasis por la formación de motas blancas (Vila et al., 2020). La transmisión de *Candida albicans* de un estado comensal inofensivo a un estado patogénico depende en gran medida de factores predisponentes, locales y sistémicos, por ejemplo; dentro de los factores locales se encuentran la disfunción salivar, el uso prolongado de las dentaduras aunado a una pobre higiene, las dentaduras mal ajustadas, las terapias con corticoesteroides tópicos y el tabaquismo, mientras que dentro de los factores sistémicos están la inmunosenescencia relacionada a la edad, la alteración en la flora local por

antibióticos de amplio espectro, las terapias inmunosupresoras, quimiorradiación, las deficiencias nutricionales y la disfunción endocrina (Williams & Lewis, 2011).

2.2. Estomatitis protésica y tratamiento con agentes antifúngicos antibióticos

El envejecimiento afecta los tejidos orales además de otras partes del cuerpo humano y la salud oral (incluida la mucosa oral, los labios, los dientes, las estructuras asociadas y su actividad funcional) la salud oral es un componente integral de la salud general; de hecho, la enfermedad oral puede causar dolor, dificultad para: hablar, masticar, tragar, mantener una dieta equilibrada, sin mencionar las consideraciones estéticas y las alteraciones faciales que conducen a la ansiedad y la depresión. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la adopción de ciertas estrategias para mejorar la salud bucal de los ancianos, incluido el manejo y mantenimiento de las afecciones orales que son necesarias para restablecer la función masticatoria efectiva. La salud bucal a menudo se descuida en los ancianos, y las enfermedades orales asociadas con el envejecimiento son complejas y afectan negativamente a la calidad de vida aunque los problemas de salud bucal no suelen asociarse con la muerte (Guiglia et al., 2010).

Un agente antifúngico está definido como cualquier sustancia capaz de producir una alteración de las estructuras de una célula fúngica, consiguiendo inhibir su desarrollo o alterando su viabilidad y capacidad de supervivencia, de manera directa o indirecta, ayudando a los sistemas de defensa del huésped (Valdés, 2005).

En comparación con los agentes antibacterianos, la disponibilidad de agentes antifúngicos es significativamente menor. La razón de esto se relaciona con el reconocimiento de la importancia de las infecciones fúngicas humanas y también con el hecho de que los organismos fúngicos son eucariotas y comparten muchas características con las células de mamíferos, por lo que la selección de objetivos adecuados para los agentes antifúngicos es problemática. La clasificación de los agentes antifúngicos (Tabla 1) se basa en el objetivo de la actividad, y en el tratamiento de la candidiasis (polienos, azoles, alilaminas, lipopéptidos, pirimidinas fluoradas) las dos clases más comúnmente utilizadas son los polienos y los azoles los cuales se enfocan en la inhibición del ergosterol (Figura 2) (Williams & Lewis, 2011).

Todas las infecciones fúngicas graves necesitan una terapia antimicótica adecuada para un resultado exitoso del paciente. Solo hay unas pocas clases de medicamentos antimicóticos disponibles, por lo que la aparición de resistencia a las clases de medicamentos individuales y ahora la resistencia a múltiples fármacos dificulta enormemente el manejo del paciente. La resistencia al azol entre las especies de *Candida* y *Aspergillus* es uno de los mayores desafíos para el

éxito clínico, seguida de la equinocandina y la resistencia a múltiples fármacos entre algunas especies de *Candida*, especialmente *Candida glabrata* (Perlin et al., 2017).

Tabla 1. Agentes antifúngicos basados en antibióticos, su mecanismo de acción y administración.

Agente antifúngico	Mecanismo de acción	Administración
Polienos		
<i>Nistatina</i>	Se une al ergosterol e interrumpe la membrana celular fúngica	Tópico/ sistémico
<i>Anfotericina B</i>	Se une al ergosterol e interrumpe la membrana celular fúngica	Tópico/ sistémico
Azoles		
<i>Fluconazol</i>	Inhibe la biosíntesis de ergosterol	Sistémico
<i>Miconazol</i>	Inhibe la biosíntesis de ergosterol	Tópico/ sistémico
<i>Ketoconazol</i>	Inhibe la biosíntesis de ergosterol	Tópico/ sistémico
<i>Clotrimazol</i>	Inhibe la biosíntesis de ergosterol	Tópico/ sistémico
<i>Itraconazol</i>	Inhibe la biosíntesis de ergosterol	Sistémico
<i>Voriconazol</i>	Inhibe la biosíntesis de ergosterol	Sistémico
<i>Posaconazol</i>	Inhibe la biosíntesis de ergosterol	Sistémico
<i>5-flucitosina</i>	Inhibición de la síntesis de ADN/ proteína	Sistémico, a menudo en terapia combinada con anfotericina.
<i>Equinocandinas</i>	Inhibe la síntesis de β 1, 3 D-glucano	Intravenoso

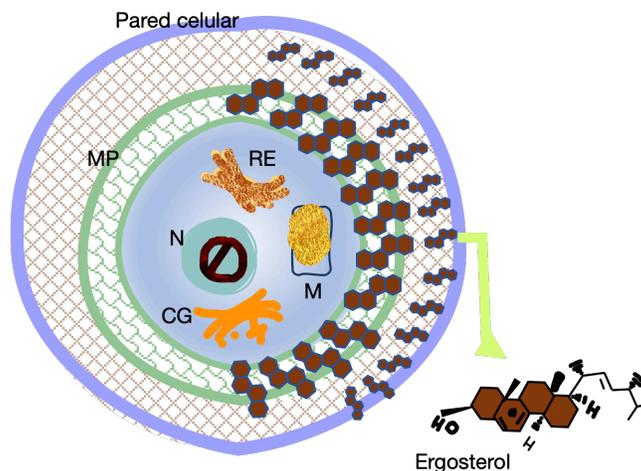


Figura 2. MP: membrana plasmática, RE: retículo endoplásmico, N: núcleo, M: mitocondria, G: Golgi. Mecanismos de acción en una célula fúngica con los antifúngicos más usados para la inhibición del ergosterol (Fuente propia).

2.3 Acondicionadores de tejidos adicionados con agentes antifúngicos

Los acondicionadores de tejidos son revestimientos blandos de corta duración, formados de manera *in situ* a partir de una mezcla de un polímero en polvo (polietilmetacrilato, PEMA) y un plastificante líquido (éster en una solución de alcohol etílico sin un monómero acrílico). La mezcla del polvo y el líquido da como resultado el entrelazamiento de la cadena del polímero y la formación de un gel viscoelástico (Dorocka-Bobkowska et al., 2017).

Actualmente, los acondicionadores de tejidos deben considerarse como recursos temporales debido a problemas durante el uso clínico como: pérdida de elasticidad, absorción de agua, soporte de bacterias, cambio de color y pérdida de adhesión entre el revestimiento y la base de la dentadura (Rodrigues et al., 2013).

Los acondicionadores de tejidos se utilizan para tratar la inflamación y las lesiones tisulares de la cavidad oral, generalmente se usan como material de revestimiento temporal, en la etapa de reparación de tejidos después de colocar implantes y en prótesis maxilofaciales. Estos materiales exhiben un efecto de amortiguación dependiente del tiempo y ayudan en la curación de tejidos traumatizados y en la retención de prótesis removibles intraorales y extraorales. Desafortunadamente, en algunos casos estos acondicionadores de tejidos proporcionan un ambiente adecuado para la proliferación y colonización de diferentes microorganismos, lo que puede agravar las complicaciones debido al uso de prótesis dentales (Li et al., 2016).

Varias técnicas se han sugerido para evitar la acumulación de placa y la proliferación de hongos como las especies de *Candida*, que incluyen la incorporación de diferentes tipos de agentes antifúngicos en los acondicionadores de tejidos, uso de barnices que contengan agentes antifúngicos o inmersión de la prótesis revestida con acondicionadores de tejidos en soluciones antisépticas (Czerninski et al., 2015).

La incorporación de agentes antifúngicos en los acondicionadores de tejidos podría ser una solución hipotética para este problema terapéutico. Las principales ventajas de incorporar agentes antimicóticos en los acondicionadores de tejidos pueden incluir una disminución en el costo, la necesidad de cooperación de los pacientes, el tratamiento simultáneo de las infecciones por *Candida albicans* y la mucosa lesionada debajo de la dentadura (Mousavi et al., 2019).

Se ha pensado en la adición de agentes antifúngicos a los acondicionadores de tejidos debido a que la sociedad envejece rápidamente y aunado a esto existen personas mayores con síndromes, lo que incrementan la incidencia para la estomatitis protésica (Lee et al., 2018).

Se han realizado varios estudios *in vitro* para investigar la eficacia de la incorporación de distintos agentes antifúngicos (antibióticos y agentes naturales) en acondicionadores de tejidos y a diferentes dosis. El microorganismo más estudiado es *Candida albicans* debido a que es el hongo principal causante de la estomatitis protésica (Baygar et al., 2018) (Neppelenbroek et al., 2018) (Muttagi & Subramanya, 2017)

En la Tabla 2 se muestran los agentes antifúngicos que se han utilizado para modificar acondicionadores de tejidos como GC Soft liner, UFI Gel, Softone, Trusoft, Durasoft liner, Coe soft y Visco Gel, con ellos se probaron distintas especies de *Candida* en estudios *in vitro*. La especie de *Candida* más utilizada fue *albicans* de distintas cepas y de un biofilm, también se utilizó *C. Glabrata*. Los estudios utilizaron en su mayoría las técnicas de microdilución y difusión en agar con distintos tipos de agentes antifúngicos en distintas concentraciones según el autor. Los agentes utilizados fueron Quitosano, Quitosano cuaternizado, Carvacrol, Nistatina, Clorhexidina, Ketoconazol, Miconazol, Itraconazol, Fluconazol, Ácido undecilénico y Nistatina con alginato a la inhibición fúngica los autores le dieron seguimiento en distintos días y obtuvieron zonas de mayor inhibición de hasta 38.33 mm \pm 1.15 mm en 3 días para el Carvacrol, mientras que las zonas de menor inhibición fueron de 0.2 mm para el Quitosano y ninguna inhibición para el diacetato de clorhexidina.

Tabla 2. Acondicionadores de tejidos modificados con agentes antibióticos (Fuente propia)

Autor y año	Acondicionador de tejidos	Especie de <i>Candida</i>	Técnica de evaluación	Tamaño de muestra	Agente antifúngico	Concentración de agente antifúngico	Resultados de efecto antifúngico
Lee et al., 2017	GC soft liner	<i>albicans ATCC 24433</i>	Diluciones seriadas en placa de agar (ensayo por triplicado)	No presente	Quitosano cuaternizado	5%	8 log CFU/mL/7 días
						7.5%	0 /7 días
						10%	0/mL/7 días
					Quitosano	5%	4.5 log CFU/mL/7 días
						7.5%	2.5 log CFU/mL/7 días
						10%	3 log CFU/mL/7 días
Baygar et al., 2017	UFI Gel P	<i>albicans ATCC 10239</i>	Difusión en agar (ensayo por triplicado)	No presente	Carvacrol	10 µL	38.33 mm ± 1.15 mm/3 días
Neppele nbroek et al., 2017	Softone	<i>albicans de un biofilm SC5314</i>	Microdilución	7	Nistatina	0.032 g	Inhibición de 90% para todos los agentes antifúngicos hasta 14 días
				7	Clorhexidina	0.064 g	
				7	Ketoconazol	0.128 g	
				7	Miconazol	0.256 g	
	7			Itraconazol	0.256 g		
Trusoft							
Bueno et al., 2015	Trusoft	<i>albicans SC5314</i>	Microdilución	6	Nistatina	0.032g	96.74 % /14 días
				6	Diacetato de Clorhexidina	0.064g	90.08 % / 14 días
				6	Ketoconazol	0.128g	89.57 % / 14 días
				6	Miconazol	0.256g	99.12 % / 14 días
				6	Itraconazol	0.256g	94.99 % / 14 días
Kim et al., 2018	Dura soft liner	<i>albicans ATCC 2876</i>	Difusión en agar por triplicado		Nistatina / alginato	20 mg / 1 g	Inhibición de 90 % de 3 a 4 días
Bertolini et al., 2014	Coe Soft	<i>albicans ATCC 10231</i>	Difusión en agar (ensayo por triplicado)	No presente	Diacetato de Clorhexidina	0.5%	0 mm/2 días
						1.0%	1.1 mm/2 días
						2.0 %	2.2 mm/2 días
	Trusoft					0.5%	0 mm/2 días
						1.0%	2.2 mm/2 días
						2.0%	3.3 mm/2 días
Gonçalves et al., 2012	Coe Soft	<i>albicans ATCC 90028 Glabrata ATCC 2001</i>	Microdilución (ensayo por triplicado)	400	Ácido undecilénico	0.25 mg/g	MIC: 256 µg/mL para ambas
				4	Nistatina	No lo menciona	10.42 mm ± 0.227 / 1 día

Chopde et al., 2012	GC soft liner	<i>albicans</i> ATCC 10231	Ensayo de difusión en agar	4	Miconazol		18.1 mm ± 0.272/ 1 día
	Visco-gel			4	Fluconazol		23.09 mm ± 0.376/ 1 día
				4	Nistatina		10.5 mm ± 0.223/ 1 día
				4	Miconazol		18.69 mm ± 0.363/ 1 día
				4	Fluconazol		24.11 mm ± 0.376 / 1 día
Radnai et al., 2009	Visco-gel	<i>albicans</i> NCYC 1467	Difusión en agar	6	Miconazol	5%	10.29 mm ± 1.09 /1 día
				6		10%	19.47 mm ± 1.17 /1 día
				6		15%	21.16 mm ± 0.54 /1 día
				6		20%	21.49 mm ± 0.64 /1 día
				6		25%	23.39 mm ± 0.47 /1 día
				6	Clorhexidina	20%	Sin inhibición

En la Tabla 3 se muestran los resultados de agentes antifúngicos naturales que se han agregado en acondicionadores de tejidos como Visco gel y COE- comfort para inhibir *Candida albicans* de distintas cepas en ensayos *in-vitro*; difusión en agar y microdilución, principalmente. Los agentes naturales fueron diversos aceites como aceite de neem, de coco, de té de árbol, esencia de limón, de malaleuca, de orégano, de *Linum usitatissimum*, *Centratherum anthelminticum* y *Ocimum sanctum*. Los autores Utilizaron distintas concentraciones y evaluaron la inhibición en distintos tiempos, la mayor zona de inhibición reportada fue de 31.66 mm para el aceite de *C. anthelminticum* y la menor zona de inhibición reportada fue por 7 mm para el aceite de orégano.

Tabla 3. Acondicionadores de tejidos modificados con agentes naturales (Fuente propia)

Autor y año	Acondicionador de tejidos	Especie de <i>Candida</i>	Técnica de evaluación	Tamaño de muestra	Agente natural antifúngico	Concentración de agente antifúngico	Resultados de efecto antifúngico
Kumar et al., 2020	Visco gel	<i>albicans</i> ATCC 24433	Difusión en agar/ Microdilución	20	Aceite de Neem	40 %	ZOI 19.15 mm/7 días MIC 15%
				20	Aceite de Coco	40 %	ZOI 16.2 mm/7 días MIC 20%
				20	Aceite de té de arbol	40 %	ZOI 14.75 mm/7 días MIC 25%
				20	Control	0 %	0 mm/ 7 días

Krishnamoorthy et al., 2019	Visco gel	<i>albicans</i> ATCC 24433	Difusión en agar	30	Aceite de coco	10%	100 %/5 días
Rawat et al., 2017	Visco Gel	<i>albicans</i> ATCC 24433	Difusión en agar	10	Aceite de orégano	60% v/v	7 mm/7 días
				10	Aceite de coco virgen	25% v/v	3 mm /7 días
				10	Control viscogel	0 %	0 mm/ 7 días
Muttagi et al., 2017	Visco gel	<i>albicans</i> ATCC 90028	Difusión en agar	5	Aceite de L. usitatissimum	800 µL	15.00 ±0.58 /2 días
				5	Aceite de C. anthelminticum	800 µL	31.66 ±1.20 /7 días
				5	Aceite de O. sanctum	800 µL	29.66 ±1.46 /7 días
Barua et al., 2017	Visco gel	<i>albicans</i> ATCC 10231	Difusión en pozo	108	Aceite de Neem	15%	MID: 17.75 (0.45) /7 días
Amornvit et al., 2014	COE-comfort	<i>albicans</i> ATCC 10231	Difusión en agar /Microdilución	10	Aceite esencial de limón	2.5 µL/mL	MIC: 0.625 µL/mL
Sharma et al., 2013	Visco gel	<i>albicans</i>	Difusión en pozo	9	Aceite de melaleuca	30%	MID: 20.56 mm ± 1.01 /7 días
Srivatstava et al., 2013	Visco gel	<i>albicans</i> ATCC 24433	Difusión en pozo	9	Aceite de orégano	60 vol%	MIZ: 3.44 ±0.88 mm /7 días

*MIC: Concentración mínima inhibitoria. MID: Diámetro medio de inhibición. ZOI: Zona de inhibición. MIZ: Zona de inhibición media

2.4 Nanopartículas de sulfuro de plata: Síntesis y propiedades antimicrobianas y citotóxicas

El sulfuro de plata presenta tres fases en su estado sólido natural de la siguiente manera: acantita monoclinica (fase α) estable por debajo de 179 °C, cúbica centrada en el cuerpo (bcc) denominada argentita (fase β) que es estable por encima de 180 °C, y una estructura cúbica centrada en las caras de alta

temperatura (fase γ) estable por encima de 586 °C. A temperaturas más altas, estas formas son conductores eléctricos (Argueta-Figueroa et al., 2017).

A continuación en la Tabla 4 se resumen métodos de síntesis de sulfuro de plata (Ag_2S), la fase en la que se obtiene la partícula, su tamaño y su aplicación potencial, además se enlistan las limitadas aplicaciones biológicas que se encontraron en la literatura, una de las más destacadas es su aplicación como bactericida contra *Escherichia coli*, *Shewanella oneidensis* y *Bacillus subtilis* con un tamaño de partícula de 9 nm.

Tabla 4 Resumen de los métodos de síntesis del sulfuro de plata (Argueta-Figueroa et al., 2017)

Autor	Método	Fase cristalina y morfología	Tamaño de partícula (nm)	Aplicación potencial
Jiang, 2011	Reducción química orgánica	Puntos cuánticos α - Ag_2S	1.5 ± 0.4	Imágenes nanodiagnósticas y multicolores <i>in vivo</i>
Hoacaoglu, 2012	Reducción química acuosa	Puntos cuánticos del ácido 2-mercaptopropiónico- α - Ag_2S	2.29	Imágenes <i>in vivo</i>
Suresh, 2011	Biosíntesis extracelular (γ -proteobacterium, <i>Shewanella oneidensis</i>)	Puntos cuánticos de proteína / péptido- α - Ag_2S desmontables	$9 \pm 3,5$	Actividad bactericida contra <i>E. coli</i> , <i>S. oneidensis</i> y <i>B. subtilis</i> , bioimagen, bioetiquetado
Du, 2010	Reducción química orgánica	Puntos cuánticos de proteína / péptido- α - Ag_2S desmontables	~ 10	Bioimagen <i>in vivo</i>
Tan, 2013	Reducción química acuosa	α - Ag_2S grupo funcional S-nitrosotiol basado en nanoesferas de puntos cuánticos de quitosano	117	Imágenes de fluorescencia celular para aplicaciones biomédicas
Dong, 2008	Síntesis acuosa por vía hidrotermal modulando la proporción de tiourea a AgNO_3	Nanocristales α - Ag_2S facetados y cúbicos	100-150	Potencial biocompatibilidad debido al medio acuoso
Hong, 2012	Método orgánico de química húmeda de un solo paso	Puntos cuánticos Ag_2S	5.4	Agente de contraste de imágenes <i>in vivo</i> para la detección rápida de tumores. Fluoróforos NIR-II para uso preclínico
Hu, 2015	Reducción química orgánica	Doxorrubicina @ PEG- Ag_2S puntos cuánticos	18	Diagnóstico, terapia e imágenes en tiempo real para el tratamiento personalizado de tumores
Ma, 2016	Método de química húmeda acuosa de un solo paso	Nanopartículas de Ag_2S	40	Agentes transductores fototérmicos para el tratamiento del cáncer

Kumari, 2014	Método simple de coprecipitación química	Nanopartículas esféricas de Ag ₂ S	30	Uso antibacteriano
Dasari, 2016	Síntesis acuosa mediante método de autoclave	<i>Cochlospermum gossypium</i> -Ag ₂ S nanopartículas esféricas	25	Uso antibacteriano

La resistencia a los medicamentos antimicrobianos ha impulsado el desarrollo de varias estrategias alternativas, entre ellas, los materiales a nanoescala o nanocompuestos como agentes antimicrobianos significativos y novedosos. Los nanomateriales, típicamente de 0.2 nm a 100 nm de tamaño, tienen una alta relación superficie-volumen (Bapat et al., 2018), la cual aumenta su interacción con los microorganismos, lo que a su vez mejora su actividad antimicrobiana. Las nanopartículas (NPs) se han utilizado en los campos óptico, químico y biológico. Sus aplicaciones potenciales incluyen muchas áreas específicas, tales como superconductores, dispositivos ópticos, catalizadores, celdas de combustible, suministro de genes y fármacos. Además, las NPs tienen propiedades antimicrobianas y tienen potencial uso en inmunoensayos de diagnóstico (Rudramurthy et al., 2016).

En un estudio realizado con nanopartículas de plata (Ag NP) se llegó a la conclusión de que inhiben el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas a 25 µM, mientras que para la inhibición del crecimiento bacteriano necesitaron 50 µM de Ag₂S NP. Así mismo concluyeron que el mecanismo de acción de las nanopartículas de plata incluye la permeabilidad de la membrana, la pérdida de la integridad de la membrana y la generación de un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por lo que aseveran que la actividad antimicrobiana de amplio espectro de las nanopartículas de sulfuro de plata Ag₂S se puede utilizar de manera similar a las Ag NP para combatir las bacterias patógenas. (Subramaniyan et al., 2019). Los sulfuros metálicos implican la unión química de uno o más átomos de azufre a un metal; son materiales semiconductores abundantes y baratos que se pueden usar para varias aplicaciones. Sin embargo, de acuerdo a una revisión sistemática un uso importante y emergente de sulfuros metálicos no tóxicos en aplicaciones biomédicas ha surgido en el campo de la medicina (Argueta-Figueroa et al., 2017).

Se ha demostrado que las nanopartículas exhiben potencia antimicrobiana y antifúngica, debido a la capacidad y tamaño que poseen para dañar las células a través de varios mecanismos. A diferencia de los antibióticos los nanomateriales brindan una interesante oportunidad para limitar el crecimiento microbiano antes de la infección humana. Asimismo, existe una discusión sobre los inconvenientes y lagunas de conocimiento en las soluciones de nanomateriales usadas en materiales antimicrobianos (Ogunsona et al., 2020). Uno de los mecanismos (Figura 3) de las nanopartículas y sus iones (titanio, plata y zinc) involucra la generación de radicales libres y conducen a la inducción de estrés oxidativo o generación de especies

reactivas de oxígeno (ROS), estos pueden dañar y destruir los componentes patógenos irreversiblemente; generan daño a la membrana, ADN, proteínas y mitocondrias, que conlleva a la muerte celular (Khezerlou et al., 2018).

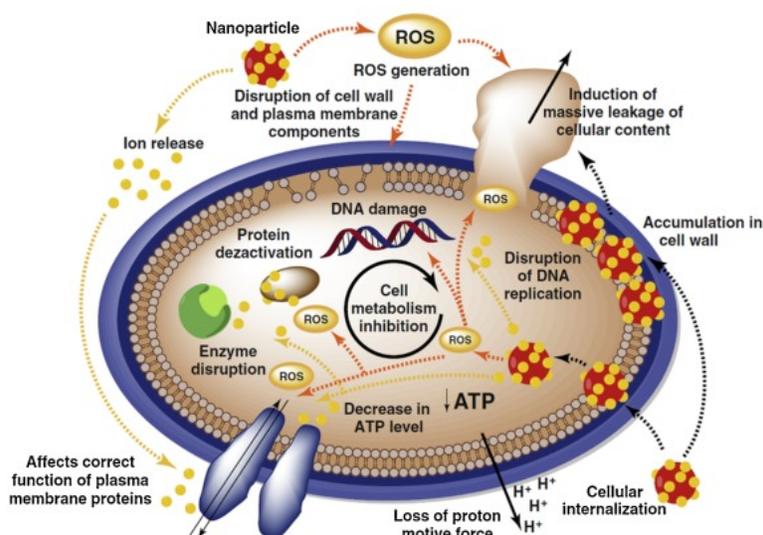


Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos antimicrobianos liberados por los iones de nanopartículas metálicas (Ogunsona et al., 2020).

En la Tabla 5 se muestra un resumen de los distintos tamaños de nanopartículas de sulfuro de plata y distintas nanoestructuras utilizadas en ensayos antimicrobianos. En los distintos estudios se puede observar que uno de los microorganismos tratados con nanopartículas de sulfuro de plata fue *E. coli* seguido de *S. aureus*, obteniendo zonas de inhibición de 11 mm hasta 39 mm.

Tabla 5 Actividad antimicrobiana del sulfuro de plata (Mendoza Avilés et al., 2021).

Referencia	Nanoestructuras Ag ₂ S / Agente o compuesto adicional	Tamaño o nanopartículas de Ag ₂ S (nm)	Método de ensayo antimicrobiano	Control Positivo	Microorganismos de estudio	Concentración de Ag ₂ S	Zona de Inhibición (mm)
Ayodhy et al., 2017	NPs esféricas/GK	25	Difusión de disco	Ampicilina	<i>E. coli</i> (Gram -)	10 µL	NPs = 10.34 mm NPs /GK= 22.38 mm
					<i>P. aeruginosa</i> (Gram -)		NPs = 13.68 mm NPs /GK= 28.82 mm
					<i>S. aureus</i> (Gram +)		NPs = 15.81 mm NPs /GK= 38.34 mm
					<i>B. thuringiensis</i> (Gram +)		NPs = 8.43 mm NPs /GK= 24.48 mm
	NPs/RHA-MCM-41	14			<i>E. coli</i> (Gram -)		11 mm

Jafari et al., 2017			Difusión de disco	Gentamicina	<i>S. aureus</i> (Gram +)	MIC= 15 µg/mL	11 mm
Huo et al., 2018	Ag/Ag ₂ S	Aglomerados con morfología irregular	Tubo de ensayo	No menciona	<i>E. coli</i> (Gram -)	100 µg/mL	86.14 %
	Ag ₂ S/rGO						79.12 %
	Ag/Ag ₂ S/rGO						97.76%
Delgado-Beleño et al., 2018	NPs cuasi-esféricas-zeolita A4	9	Difusión de disco	Gentamicina	<i>E. coli</i> (Gram -)	20,000 µg	9.5 mm
					<i>K. pseudomonas</i> (Gram -)		10 mm
					<i>S. aureus</i> (Gram +)		15 mm
					<i>S. agalactiae</i> (Gram +)		11 mm
Subramanian et al., 2018	NPs	8-30	Placa microtitulación de resazurina	No menciona	<i>E. coli</i> (Gram -)	MIC = 50 µM	~ 62% Fluorescencia (I _{ex} = 350 nm)
					<i>P. aeruginosa</i> (Gram -)		~ 65% Fluorescencia (I _{ex} = 350 nm)
					<i>S. aureus</i> (Gram +)		~ 65% Fluorescencia (I _{ex} = 543 nm)
					<i>B. subtilis</i> (Gram +)		~ 72% Fluorescencia (I _{ex} = 543 nm)
Iqbal et al., 2019	NPs/CdS	~ 50-100	Difusión en Agar	No menciona	<i>E. coli</i> (Gram -)	MIC=135 µg/mL	28.10 mm
						MIC=169 µg/mL	39.24 mm
					<i>P. aeruginosa</i> (Gram -)	MIC=69 µg/ml	25.10 mm
						MIC= 87 µg/mL	35.88 mm
					<i>S. aureus</i> (Gram +)	MIC=470 µg/mL	22.77 mm
						MIC=565 µg/mL	30.23 mm

NPs: Nanopartículas; GK: goma de kondagogu (*Cochlospermum gossypium*); RHA-MCM-41: Nanopartículas de la ceniza de cáscara de arroz; rGO: óxido de grafeno reducido.

La citotoxicidad se mide por medio del ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio (MTT). Los ensayos de viabilidad celular se dividen en dos categorías: ensayos que detectan directamente la muerte celular *genuina* con tintes vitales y ensayos que miden biomarcadores de viabilidad sustitutos, incluida la actividad mitocondrial, el metabolismo celular o la actividad de enzimas asociadas con la viabilidad de las células (Daniel E Shumer, 2017).

En la Tabla 6 se muestra la actividad citotóxica dependiendo del tamaño de partícula en diferentes líneas celulares, en donde se consideró una viabilidad celular superior

a 80%, basándose en la norma ISO 10993-5 para citotoxicidad. De esta manera podemos decir que algunos de los resultados más relevantes son los ensayos de puntos cuánticos (QDs) esféricos con compuestos adicionales en donde su tamaño de nanopartícula es menor a 5 nm, los cuales fueron probados por el método de ensayo MTT en distintos tipos de células obteniendo una viabilidad celular mayor al 90%.

Tabla 6. Citotoxicidad del sulfuro de plata (Mendoza Avilés et al., 2021).

Referencia	Tipo de Ag ₂ S/Compuesto adicional	Tamaño nanopartículas de Ag ₂ S (nm)	Método de ensayo	Células de estudio	Concentración (µg/mL)	Resultados de biocompatibilidad
Javidi et al., 2016	QDs esféricos/MAA	<5	MTT	HCL A549	6.25–200	~ 95-90%
				Hep G2		~ 80-100%
Vardar et al., 2018	QDs esféricos/2-MPA	3.74 ± 0.33	MTT	V79	IC ₅₀ =1361	80%-40% a 200-2000 µg/mL
			NRU			IC ₅₀ =1269
Xiong et al., 2019	NPs/NCs	15	MTT	NIH3T3	50-200	~ 68-78%
Wiercigroch- Walkosz et al., 2019	QDs esféricos/PhLd	<5	MTS	NIH3T3	1300	No cambió la morfología celular en la mayoría de las células tratadas, los cambios fueron visibles solo en las células NIH3T3.
				HCT116		
Vardar et al., 2019	QDs esféricos/DMSA	2.9	MTT	V79	5-2000	54.0 ± 4.8% a 2000 µg/ml
			NRU			65.7 ± 4.1% a 2000 µg/ml
Zhong et al., 2020	NDs/QE-PEG	20	MTT	HepG-2 HL-7702	10-300	~ 90%
Aydemir et al., 2020	QDs esféricos/GSH	3.16	MTT	293 T	0-300	~ 98-65 %
				CFPAC-1		~ 98-75%

Nota: Se considera la viabilidad superior al 80% como base no tóxica en ISO 10993-5. MTT: método colorimétrico que utiliza Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio; NRU: ensayos de captación de rojo neutro; MTS: ensayo de proliferación celular; CellTiter 96 AQueous One Solution. NIH3T3: línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón; HCT116: línea celular de carcinoma co- lorrectal humano; 293 T: células de riñón embrionario humano; CFPAC-1: células de adenocarcinoma ductal humano; HCL A549: células humanas A549 (lung carcinoma). QE-PEG: inhibidor de HSP70; GSH: *glutathion*; NC: nanocubos; PhLd: nanoestructuras de fosfolípidos.

2.5 Principios físicos de técnicas de caracterización de materiales

A continuación se describirán de manera breve los principios físicos de las técnicas de caracterización que se utilizaron en esta investigación.

Espectroscopia UV-Vis

Es uno de los primeros métodos físicos aplicados al análisis cuantitativo y a la determinación de estructuras moleculares.

La región espectral correspondiente al ultravioleta y visible va desde el ultravioleta UV lejano con longitud de onda entre 10 y 200 nm, el UV cercano entre 200 y 400 nm, y el UV-visible entre 400 y 800 nm. La radiación ultravioleta y visible se caracteriza por ser absorbida por electrones de valencia de moléculas y átomos, los cuales son excitados a niveles de energía superiores. La absorción de radiación UV-Vis por las moléculas y compuestos se debe a las transiciones electrónicas de ciertos grupos como se observa en la Fig. 4 (González, 2008).

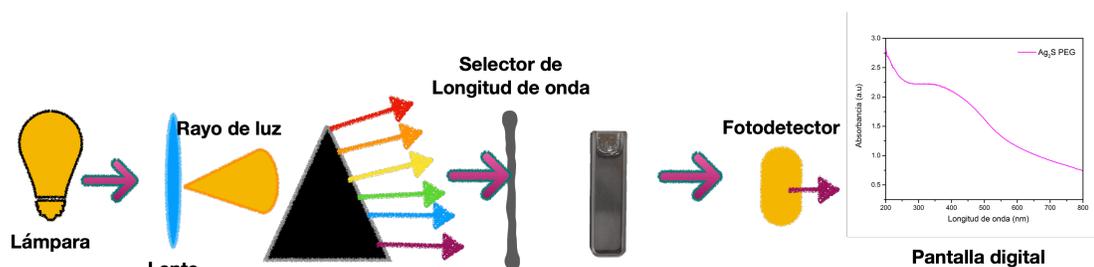


Figura 4 Espectroscopia UV-Vis (Fuente propia)

Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X (DRX) es una poderosa técnica no destructiva para caracterizar materiales cristalinos. Proporciona información sobre estructuras, fases, orientaciones preferidas de los cristales (textura) y otros parámetros estructurales, como el tamaño medio de grano, la cristalinidad, la deformación y los defectos del cristal. Los picos de difracción de rayos X se producen por interferencia constructiva de un haz monocromático de rayos X dispersos en ángulos específicos desde cada conjunto de planos de celosía en una muestra. Las intensidades máximas están determinadas por la distribución de átomos dentro de la red. En consecuencia, el patrón de difracción de rayos X es la huella digital de arreglos atómicos periódicos en un material dado como se observa en la Fig. 5 (Bunaciu et al., 2015).

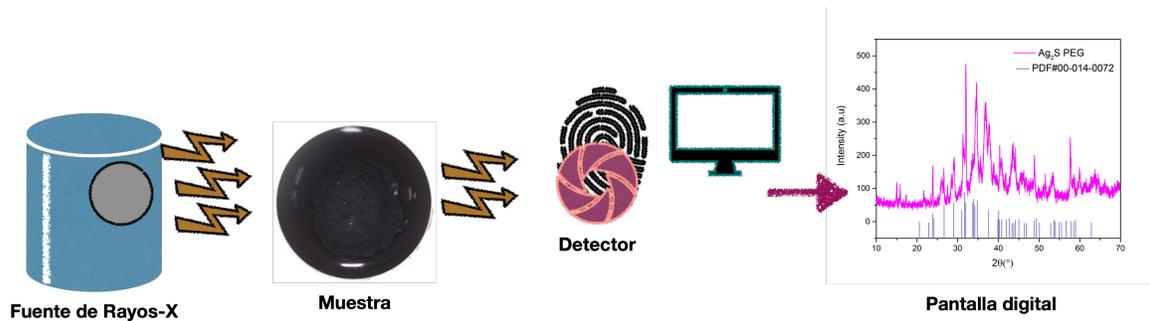


Figura 5 Difracción de rayos X (Fuente propia).

Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis térmico ha sido definido como un grupo de técnicas donde una propiedad de una muestra es monitoreada con relación al tiempo o temperatura, en una atmósfera específica, a un régimen programado de temperatura. En el análisis termogravimétrico se registra la pérdida de peso de una muestra en la medida en que se incrementa la temperatura hasta 1200 °C, bajo condiciones de un gas inerte, de velocidad de calentamiento y diferentes atmósferas de reacción; obteniéndose por esta vía las curvas denominadas termogramas, como se observa en la Fig. 6 (Manals et al., 2011).

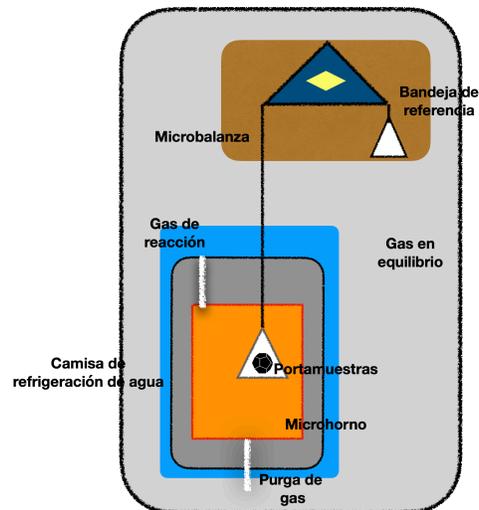


Figura 6 Función del análisis termogravimétrico (Fuente propia).

Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

Típicamente un análisis de microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) contiene tres conjuntos de lentes con muchas posibles variantes en la configuración de las lentes, en particular la de TEM con filtrado energético. Las lentes condensadoras se encargan de la formación inicial del haz tras la emisión de los electrones, las lentes de objetivo focalizan el haz sobre la muestra y finalmente las lentes de proyección se encargan de expandir el haz reflejado hacia una pantalla de fósforo u otro dispositivo de visualización tal como película. Los aumentos del TEM vienen dados por la razón de las distancias entre la muestra y el plano imagen del objetivo. La configuración de un TEM varía significativamente según su implementación, como se observa en la Fig. 7 (L. Wang et al., 2020).

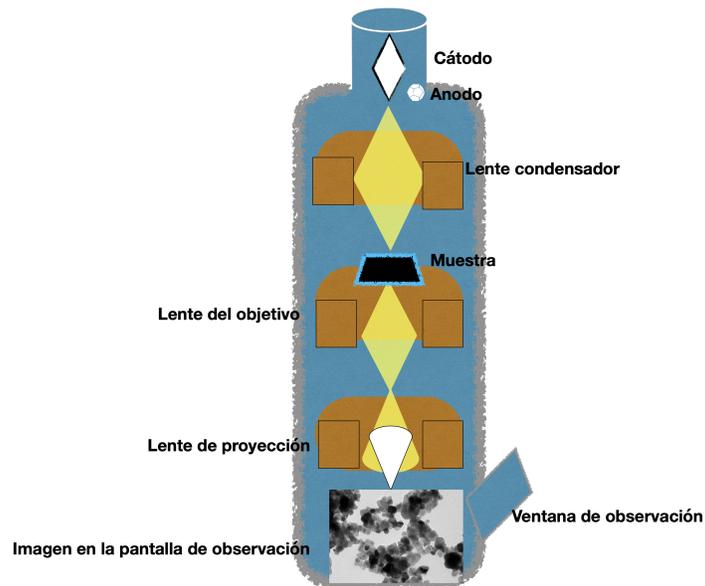


Figura 7 Función del microscopio de transmisión electrónica (TEM) (Fuente propia).

Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

El fundamento de la microscopia electrónica de barrido (MEB) radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una columna en la que ha hecho un vacío alrededor de 10^{-7} Torr. En ella, el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas en donde su diámetro va disminuyendo hasta hacerse casi puntual. Al mismo tiempo la intensidad de corriente se disminuye, el haz electrónico es desplazado sobre la superficie de la muestra a modo de un pincel que irá barriendo la muestra en un continuo ir y venir. En la interacción del haz electrónico con la superficie se producen electrones secundarios, que son captados por un detector e inciden sobre un centelleador donde cada electrón produce un fotón que se dirigen a un fotomultiplicador a través del cañón de luz en donde se producen fotoelectrones amplificando la corriente de la información sobre la muestra. Finalmente, los electrones secundarios son dirigidos a un tubo de rayos catódicos que llevan a un videoamplificador donde se produce la imagen, como se observa en la Fig 8 (Renau & Faura, 1965).

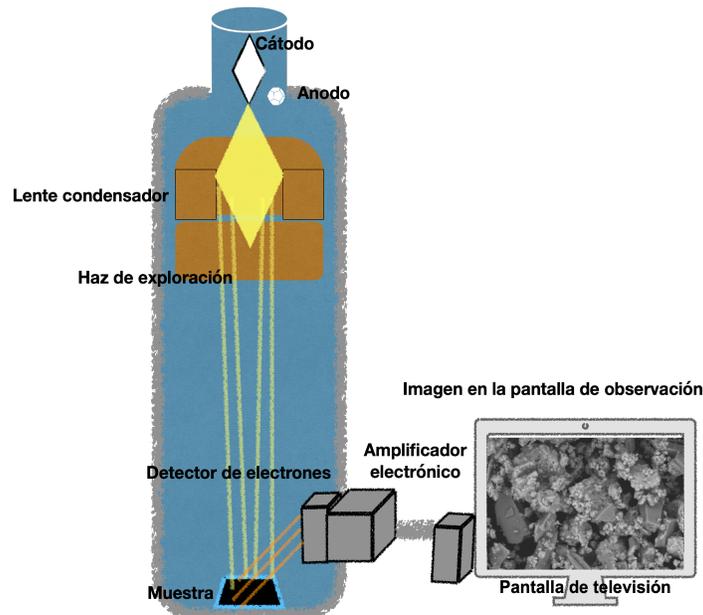


Figura 8 Función del microscopio electrónico de barrido (SEM) (Fuente propia).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Candida albicans es el principal agente causal de la candidiasis oral y representa un 95% de los casos. Se le considera un patógeno pero realmente es un organismo comensal (Williams & Lewis, 2011). Este organismo es excepcional, ya que tiene la capacidad de adaptarse bien al huésped humano y cualquier cambio en este favorece su proliferación y le brinda la oportunidad de invadir prácticamente cualquier sitio, desde infecciones superficiales de la mucosa a una enfermedad diseminada en múltiples órganos (Vila et al., 2020).

El tratamiento de la candidiasis se basa en un arsenal limitado de agentes antifúngicos, que a su vez comprenden tres clases principales: polienos, azoles y equinocandinas (Jensen, 2016). La escasez de clases de antifúngicos junto con las deficiencias de los agentes terapéuticos actuales dificulta la capacidad de combatir infecciones por hongos (Patil et al., 2015).

Los azoles, como el fluconazol, carecen de toxicidad para las células humanas; sin embargo, son fármacos fungistáticos, lo que provocó la aparición de resistencias. La clase más nueva de antifúngicos, y la primera en ser específica de hongos, está representada por las equinocandinas (caspofungina), que se dirigen a un componente clave en la pared celular de los hongos que no está presente en las células de mamíferos. Desafortunadamente, el uso clínico de las equinocandinas se limita al tratamiento de la candidiasis sistémica y la aparición de resistencias, particularmente en *C. glabrata*, se está convirtiendo en una preocupación (Vila et al., 2020). Por lo tanto, existe una necesidad crítica de identificar nuevos objetivos farmacológicos para sortear las deficiencias de los agentes antifúngicos actualmente disponibles. El mantenimiento de un estado comensal en lugar de la erradicación puede ser de hecho una estrategia más ventajosa, ya que reduce la propensión al desarrollo de la resistencia adquirida. En *C. albicans*, la filamentación y la formación de biopelículas son propiedades fundamentales para la patogénesis de este patógeno oportunista (Kadosh, 2019).

4. JUSTIFICACIÓN

El sulfuro de plata (Ag_2S) ha demostrado ser un agente antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus thuringensis*, *Streptococcus agalactiae* y *Bacillus subtilis*, así como especies de la familia de pseudomonas, comprobándose por diversos autores con ensayos antimicrobianos como la difusión en disco; la actividad antimicrobiana del sulfuro de plata se potencializa con agentes que actúan como estabilizadores o con compuestos adicionales para así formar nanocompuestos (Mendoza Avilés et al., 2021).



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Estudios preliminares del grupo de trabajo en colaboración con el área de ciencias agrogeonomicas de la ENES León de la UNAM muestran que el sulfuro de plata inhibe a dos fitopatogenos como; *Aspergillus sp* en el ajo y *Colletotricum gloeosporioides* causante de antracnosis en aguacate logrando inhibir su desarrollo en una concentración de 7.5 mg/mL.

Contando con este antecedente se pretende usar las nanopartículas de sulfuro de plata para inhibir de manera *in vitro* al hongo *Candida albicans*, el cual se encuentra presente en la cavidad oral.

A pesar de que hay muchos factores involucrados con las condiciones de la superficie de los acondicionadores de tejidos, incluidos los efectos de la saliva, los limpiadores de dentaduras postizas, los ciclos térmicos y la fuerza masticatoria, la pérdida de integridad y rugosidad de la superficie de los acondicionadores de tejidos puede comenzar en cuestión de 3 a 4 días por lo que varios estudios han evaluado métodos para mejorar la vida útil de los acondicionadores de tejidos, ya que estos están indicados por un periodo temporal de 7 a 14 días, así como la incorporación de componentes antimicrobianos en el material (Rodrigues et al., 2013).

Sin embargo, aún no existe conocimiento del sulfuro de plata aplicado a materiales dentales, por lo que es de suma importancia estudiar este tipo de nanopartícula en la inhibición *in vitro* de *Candida albicans* y así en un futuro se pueda utilizar en diversos materiales dentales; como en acondicionadores de tejidos como una alternativa terapéutica en la estomatitis protésica.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Presentan las nanopartículas de sulfuro de plata un efecto antifungico contra *Candida albicans*?

6. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de sulfuro de plata sí presentan un efecto antifúngico contra *Candida albicans*.

H1: Las nanopartículas de sulfuro de plata presentan un efecto antifúngico contra *Candida albicans* en una concentración de 7.5 mg/mL.



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.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar la susceptibilidad antifúngica de las nanopartículas de sulfuro de plata de manera *In vitro* en *Candida albicans* a través de ensayos de difusión en agar y ensayos de susceptibilidad antifúngica para posible aplicación en acondicionadores de tejidos.

7.1 Objetivos Específicos

- Obtener nanopartículas de sulfuro de plata con y sin de polietilenglicol (Ag₂S EX, Ag₂SPEG) a través de una síntesis química en medio acuoso asistida por ultrasonido.
- Evaluar el efecto de las nanopartículas de sulfuro de plata (Ag₂S EX), (Ag₂S PEG), así como de sulfuro de plata comercial marca Sigma Aldrich (Ag₂S COM).
- Determinar cristalinidad, morfología y tamaño de las nanopartículas de sulfuro de plata mediante Difracción de Rayos X, Espectroscopia Óptica UV-Vis, Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) y Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).
- Determinar la concentración mínima inhibitoria y concentración citotóxica media de sulfuro de plata por microdilución y bioensayo de MTT con base en la norma ISO-10993-5 e ISO-20776-1:2007, respectivamente.
- Evaluar el efecto antifúngico de nanopartículas de sulfuro de plata en *Candida albicans* con base en la norma ISO-7405:2008.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Tipo de Estudio

Experimental *in vitro*.

Diseño de estudio: puro, prospectivo y comparativo.

•Población: Nanopartículas de sulfuro de plata Experimentales (EX), recubiertas con Polietilenglicol (PEG) y Comerciales marca Sigma-Aldrich (COM).

•Muestreo: No probabilístico.

8.2 Criterios de Selección

Criterios de Inclusión

- Nanopartículas de sulfuro de plata semiesféricas o esféricas con un tamaño debajo de 50 nm.
- Microorganismo de *Candida albicans* ATCC 90028.



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.

- Fibroblastos gingivales humanos cultivados en la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León.

Criterios de Exclusión

- Nanopartículas diferentes a sulfuro de plata
- Especies de *Candida krusei*, *glabrata* y *tropicalis*.
- Fibroblastos con más de 10 divisiones celulares.

Criterios de Eliminación

- Cultivos contaminados.
- Cajas petri con superficies irregulares o áreas no sembradas en el agar.

8.3 Variables

Tabla 7 Variables independientes en el estudio.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Naturaleza y escala de medición
Concentración de nanopartículas	Cantidad o sustancia en un medio determinado (Auffan et al., 2009)	Concentración de sulfuro de plata para cultivos celulares y fúngicos de 7.5 mg/mL a 0.11 mg/mL	Cuantitativa continua, De razón
Nanopartículas de sulfuro de plata	Las nanopartículas para propósitos farmacéuticos se definen en el Handbook of Pharmaceutical Technology como las partículas coloidales sólidas con un rango de tamaño de 1 a 1,000 nm (Lee AT., et al 2010).	-Nanopartículas Comerciales Sigma Aldrich (Ag ₂ S COM) -Nanopartículas Experimentales (Ag ₂ S EX) obtenidas por síntesis química asistida por ultrasonido. -Nanopartículas con polietilenglicol (Ag ₂ S PEG) obtenidas por síntesis química asistida por ultrasonido.	Cualitativa Ordinal, Discreta

Tabla 8 Variables dependientes en el estudio.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Naturaleza y escala de medición
Actividad antifúngica	Capacidad de matar, destruir o inactivar microorganismos, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena (Tverde et al., 2016)	Zona de inhibición obtenida con la técnica de difusión en agar. CMI obtenida en ensayos de microdilución.	Cuantitativa De razón, Continua,
Citotoxicidad	La citotoxicidad es una propiedad crítica para determinar el destino de una pequeña molécula en el proceso de descubrimiento de fármacos (Sun et al., 2020).	De acuerdo a la Norma ISO 10993 para citotoxicidad 100-75 % → No citotóxico 74-50% → Ligeramente citotóxico 49-25% → Moderadamente citotóxico 24-0% → Severamente citotóxico	Cuantitativa De razón Continua,

8.4 Síntesis de nanopartículas de sulfuro de plata experimentales sin y con polietilenglicol.

Tabla 9. Reactivos utilizados para la síntesis de nanopartículas de sulfuro de plata (Ag₂S) experimental con y sin polietilenglicol en la presente investigación.

Nombre del reactivo	Fórmula	Número de lote	Marca
Citrato de sodio	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	19726	Karal
Nitrato de plata	AgNO ₃	V14C24	J.T. Baker
Sulfuro de sodio	Na ₂ S	68912	Fermont
Polietilenglicol	H(OCH ₂ CH ₂) _n OH	MKCJ2152	Aldrich

Las nanopartículas de sulfuro de plata se obtuvieron por síntesis química asistidas con ultrasonido. La síntesis se llevó a cabo bajo dos condiciones, es decir sin (Ag₂S EX) y con polietilenglicol (Ag₂S PEG).

En la primera condición de síntesis experimental se prepararon las siguientes soluciones con agua destilada en matraces para aforar como se ejemplifica en la (Fig. 9):

- 0.129 g de citrato de sodio (Na₃C₆H₅O₇) y se aforó en un matraz de 50 mL,
- 0.424 g de nitrato de plata (AgNO₃) y se aforó en un matraz de 50 mL,
- 0.195 g de sulfuro de sodio (Na₂S) y se aforó en un matraz de 100 mL,
- 0.0004 g de sulfuro de sodio excedente (Na₂S) y se aforó en un matraz de 25 mL.

Después en un matraz Erlenmeyer de 250 mL previamente recubierto con aluminio se mezclaron las soluciones:



El esquema de la figura 10 muestra las reacciones involucradas en la síntesis experimental.

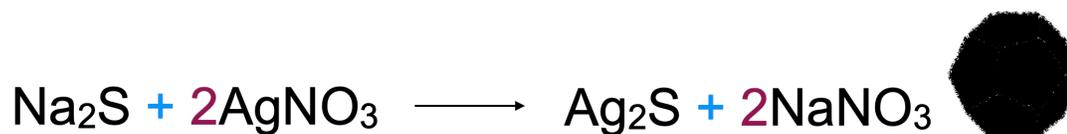


Figura 10 Reacciones en la síntesis experimental del sulfuro de plata (Fuente propia)

El matraz fue cubierto con un tapón de gases y cinta testigo. Posteriormente, se llevó al ultrasonido (Branson) a 42 KHz durante 2 h. Al finalizar este tiempo se retiró el matraz y se resguardo de la luz durante 12 h para evitar su oxidación, transcurrido el tiempo se realizó el lavado del producto obtenido de sulfuro de plata.

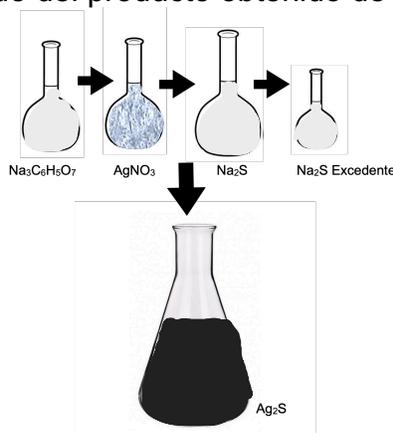


Figura 9 Representación de las soluciones usadas en el proceso de síntesis del sulfuro de plata experimental (Fuente propia)

En la segunda condición de síntesis experimental con polietilenglicol, se prepararon las mismas soluciones a), b), c), d) que se utilizaron para la síntesis de las nanopartículas experimentales, pero se agregaron 100 μ L polietilenglicol en el siguiente orden:



El esquema de la figura 11 muestra las reacciones involucradas en la síntesis experimental con PEG.



Figura 11 Reacciones en la síntesis experimental del sulfuro de plata (Fuente propia)

El matraz fue cubierto con un tapón de gases y cinta testigo. Posteriormente, se llevo al ultrasonido durante 2 h a 42 KHz. Al finalizar este tiempo se retiró el matraz y se resguardo de la luz durante 12 h para evitar su oxidación, transcurrido dicho tiempo se realizó el lavado del producto obtenido de sulfuro de plata.

8.5 Lavado y secado de nanopartículas de sulfuro de plata

Para la realización del lavado del producto se utilizaron 6 tubos de ensayo de plástico de 15 mL. El producto en solución obtenido de la síntesis se repartió en cantidades iguales en los tubos y se introdujeron a la centrifuga (Cole-Parmer) durante 10 minutos a 3400 rpm para realizar el pre-lavado. El sobrenadante se colocó en un vaso de precipitado, dejando únicamente en el fondo del tubo el precipitado de nanopartículas. Esta acción se repitió hasta terminar con la solución proveniente de la síntesis.

Después para el lavado se utilizó agua destilada para resuspender las nanopartículas y lograr eliminar los residuos, se colocaron los tubos en la centrifuga durante 10 veces, durante 10 min a 3400 rpm.

Después del lavado de nanopartículas de sulfuro de plata el contenido de los 6 tubos se lleva a una caja petri de vidrio para poder secar las nanopartículas obtenidas.

La parrilla se calienta a una temperatura de 60 °C y se coloca la caja petri durante 3 h, hasta que las nanopartículas se sequen por completo.

Una vez que las nanopartículas estaban secas se colocaron en el mortero de Agata en donde se pulverizaron con una presión manual en movimientos circulares durante 2 min por sección hasta obtener un fino polvo negro. El producto se resguardo en un tubo Eppendorf recubierto con papel aluminio.



Figura 12 Sulfuro de plata pulverizado en mortero de Agata (Fuente propia)

8.6 Esterilización de nanopartículas de sulfuro de plata

Las nanopartículas obtenidas se pesaron y se distribuyeron en varios tubos Eppendorf (dependiendo del número de ensayos a realizar). Cada tubo contenía 7.5 μg en su forma sólida.

En un tubo Falcon de 50 mL recubierto con aluminio se colocaron los tubos Eppendorf con las nanopartículas de sulfuro de plata, estos se colocaron abiertos dentro del tubo. El tubo Falcon no se cerró en su totalidad para evitar que estos explotaran con la presión y se colocó en un vaso de precipitado.

En un segundo tubo Falcon de 50 mL se colocaron 30 mL de agua destilada, este no se cerro en su totalidad para evitar que explotara con la presión, dicho tubo se colocó en un vaso de precipitado.

Después se llevaron a esterilizar en la autoclave (Tuttnauer 2340M) a una presión de 2.5 bar a 121 °C durante 20 min.

8.7 Caracterización de nanopartículas mediante UV-Vis, TEM, DRX, MEB, EDS y TGA

Espectroscopia de UV-Vis

Se sonicaron 200 μ L del sulfuro de plata sintetizado y 1800 μ L de agua destilada 1:9, en un vial durante 30 minutos para una mejor dispersión, después se colocaron en una celda de cuarzo. La dispersión se analizó en un espectrofotómetro de UV-Visible Multiskan TM GO (Thermo Scientific TM Finland) en un rango de 200 a 1000 nm.

Microscopía Electrónica de Transmisión

Se colocaron 7.5 μ g de nanopartículas de sulfuro de plata en viales de cristal con 3 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) y se llevaron al ultrasonido a sonicar durante 30 min.

Después se colocó la solución en un vidrio Corning, formando una gota grande en donde se sumergió la rejilla para microscopía (TED PELLA INC. De 400 mesh Cu), posteriormente, se colocó en una parrilla a 40 °C hasta que se secó la muestra y se llevó al porta muestras para TEM.

Difracción de rayos X

Las muestras en forma de polvo se midieron en un equipo Miniflex de Rigaku con radiación de cobre $K\alpha$ 1.5406Å generada a 30 kV y 30 mA, en un intervalo de 10 a 70 grados 2θ a un paso de 0.02 grados con un tiempo de conteo de 0.06 s por punto.

Microscopia Electrónica de barrido

Las nanopartículas de sulfuro de plata en polvo fueron observadas en un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), marca Hitachi TM 1000 en el Centro de Geociencias de la UNAM, utilizando un voltaje de aceleración de 15 kV y se tomaron imágenes a diversas magnificaciones con electrones retrodispersados. Para los análisis elementales se usó un equipo EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) Oxxford acoplado en microscopio.

8.8 Ensayos antifúngicos de nanopartículas de sulfuro de plata en *Candida albicans*.

El estudio antifúngico se realizó por dos métodos de ensayo, los cuales se presentan a continuación.

8.8.1. Ensayo de difusión en agar

Se preparó agar Dextrosa Sabouraud (Oxoid LTD) disolviendo 6.5 g de agar por cada 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer y se esterilizó en autoclave (134 °C, 2 atm de presión, 25 min). Se colocaron 20 mL en cajas Petri de plástico de 10 cm de diámetro.

Para el cultivo joven con un asa se tomó un inóculo de la levadura *C. albicans* ATCC 90028 y se sembró en una caja petri con agar Dextrosa Sabouraud, se incubó a 37 °C durante 24 h.

Después de las 24 h de incubación, se preparó una solución de cloruro de sodio (NaCl) con 1.7 g por 200 mL de agua destilada; se esterilizó en autoclave (134 °C, 2 atm de presión, 25 min) para la inocular la solución de la levadura, ajustada al patrón de turbidez 0.5 de McFarland (200 µL) y se sembró con la técnica de estriado con un hisopo estéril en cada caja petri. Posteriormente, se colocaron los discos de sensibilidad con un diámetro de 6 mm a distintas concentraciones de sulfuro de plata, de 7.5 µg/mL a 0.05 µg/mL, para esto en cada disco se colocó 20 µL de cada dilución en el centro del disco, los cuales fueron colocaron en las cajas previamente cultivadas.

En la figura 13 podemos observar las 8 concentraciones de sulfuro de plata con Polietilenglicol usadas en el ensayo. Se aprecian las zonas de inhibición obtenidas en cada concentración.

Se dejaron en incubación a 37 °C por 24 h. Se midieron las zonas de inhibición y se obtuvieron promedios y desviación estándar.



Figura 13 Ensayo de difusión en Agar del sulfuro de plata con polietilenglicol en *Candida albicans* (Fuente propia).

8.8.2 Ensayo de susceptibilidad antifúngica de nanopartículas de sulfuro de plata en *Candida albicans*.

Se preparó el medio RPMI 1640 (sin glutamina, con rojo fenol, tamponado a pH 7,0 usando MOPS). Después, se inoculó *Candida albicans* ATCC 90028 aeróbicamente a 37 °C en Agar Dextrosa Sabouraud durante 24 h.

Posteriormente, se cultivó una colonia en medio RPMI y se dejó incubando 36 h a 37 °C. Luego se preparó un inóculo equivalente a aproximadamente 1.8×10^7 CFU/mL; este inóculo se diluyó a 1:1000 obteniendo una concentración final de trabajo de 1×10^4 CFU/mL.

Se realizaron 6 diluciones de sulfuro de plata Ag_2S de 7.5 $\mu\text{g/mL}$ a 0.26 $\mu\text{g/mL}$ y en una placa de 96 pocillos, se añadieron 100 μL de cada concentración, por triplicado, seguido de 100 μL de inóculo de *Candida albicans*.

Los controles positivos se prepararon utilizando 100 μL de medio RPMI 1640 y 100 μL del inóculo. Para el control negativo se colocaron 200 μL de medio RPMI 1640.

Para corregir los cambios en la densidad óptica debido a las suspensiones del sulfuro de plata, se añadieron diluciones en serie de sulfuro de plata a un volumen igual de medio RPMI 1640. Las cajas se incubaron por 24 h a 37 °C, 70 RPM.

En la Figura 14 se observa uno de los pasos a seguir para la determinación de la concentración mínima inhibitoria del sulfuro de plata experimental, en donde se realizó un sembrado de cada concentración.



Figura 14 Sembrado de concentraciones para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del sulfuro de plata experimental (Fuente propia)

8.9 Ensayo de citotoxicidad de nanopartículas de sulfuro de plata (Ag_2S) en Fibroblastos Gingivales Humanos (FGH).

Mediante el ensayo, la reducción de la sal de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma-Aldrich) se determinó la actividad citotóxica de las nanopartículas de sulfuro de plata en Fibroblastos Gingivales Humanos de la línea celular ATCC CRL2014 (FGH ATCC) y de cultivo primario (FGH).

Se colocaron 100 μL con una densidad equivalente a 100×10^5 cel/mL en una placa de 96 pocillos en medio de cultivo DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino 4%, glutamina al 1% y 2% de antibiótico estreptomina. Se incubaron por 48 h en condiciones de 5% CO_2 a 37°C.

Luego se retiró el medio de cultivo transcurridas las 48 h y se hicieron diluciones seriales de las nanopartículas de sulfuro de plata (Ag_2S) partiendo de una concentración de 7.5 mg/mL y se incubaron a condiciones de 5% CO_2 por 24 h, las nanopartículas antes de este proceso se sonicaron en 100 μL de medio durante 30 minutos, obteniendo una buena dispersión de nanopartículas Ag_2S EX y Ag_2S PEG, pero no de Ag_2S COM.

Transcurridas las 24 h se preparó la sal de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.2 mg/mL en medio de cultivo DMEM suplementado. Se retiró el medio de todos los pocillos y se colocó la sal MTT. Las células se incubaron por 4 h en condiciones de 5% CO_2 a 37°C.

Posteriormente, al finalizar las 4 h se retiró el MTT y se colocó 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro Multiskan™ GO (Thermo Scientific™) a una longitud de onda de 570 nm.

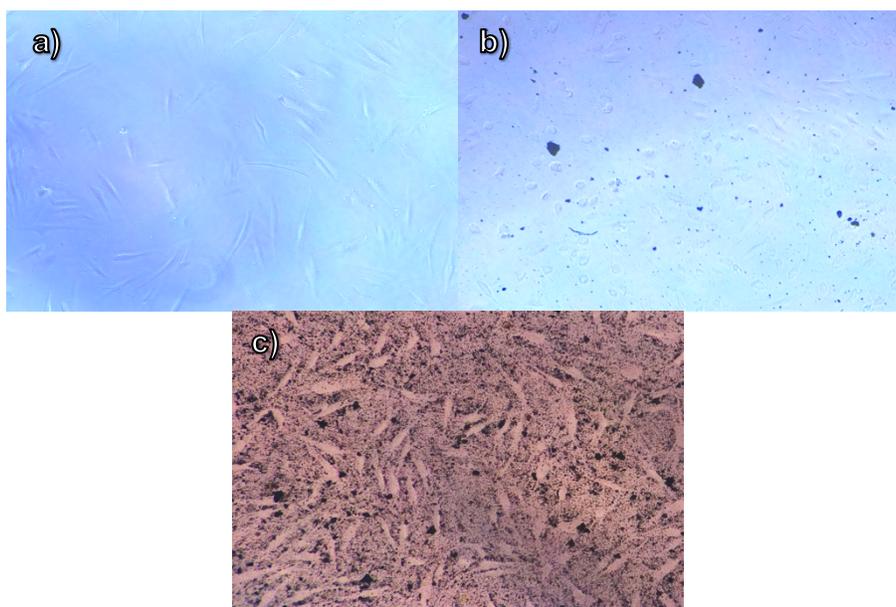


Figura 15 Micrografías de los cultivos de fibroblastos gingivales en distintas concentraciones de sulfuro de plata experimental a) grupo control sin nanopartículas, b) 0.011 mg/mL c) 7.5 mg/mL. (Fuente propia).

9. RESULTADOS

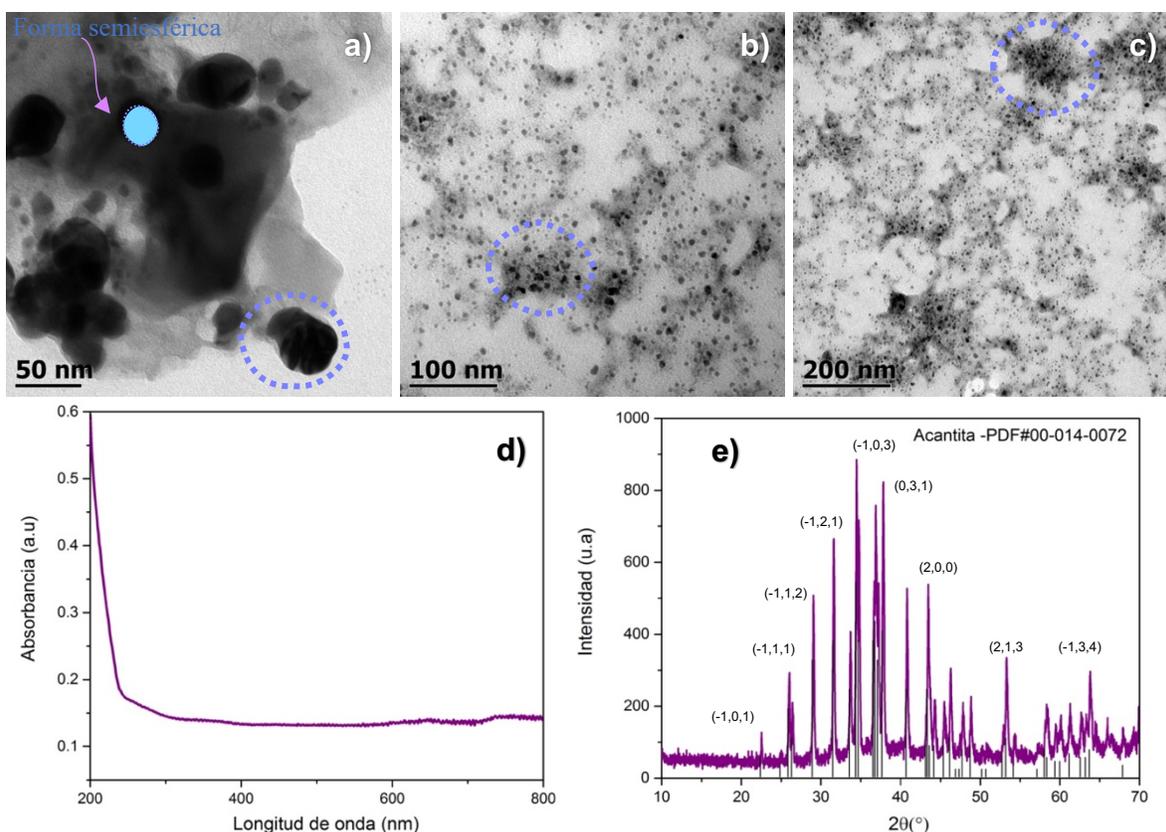
9.1 Propiedades morfológicas, ópticas y estructurales de sulfuro de plata

En este apartado se presentan los resultados de la caracterización por Espectroscopia óptica UV-Vis, Microscopia de Transmisión Electrónica (TEM), Difracción de rayos X (DRX) y Termogramas (TGA) del sulfuro de plata comercial marca Sigma Aldrich (Ag_2S COM), sulfuro de plata experimental (Ag_2S EX) y experimental con polietilenglicol (Ag_2S PEG).

Las imágenes TEM (Fig.16 a), b), c)) se muestran en distintas escalas en donde se puede observar el sulfuro de plata en las tres micrografías se observan aglomeraciones (señaladas por los círculos punteados) y una forma semiesférica con una media de $2.64 \text{ nm} \pm 1.37 \text{ nm}$.

En el espectro de absorbancia óptica (Fig. 16 d) en donde la banda de absorbancia no se observa como la característica del sulfuro de plata por la aglomeración de este tipo de nanopartículas.

En el patrón de difracción de rayos X se puede obtener información de la estructura cristalina de un material, en esta investigación se obtuvo información del sulfuro de plata. En donde se pudo observar una banda definida y una total relación en la comparación con la carta cristalográfica PDF#00-014-0072 correspondiente a la estructura acantita (Fig. 16 e).





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Figura 16 a), b), c) Imágenes TEM, d) espectro de absorbancia óptica y e) patrón de difracción de rayos X de sulfuro de plata comercial ($\text{Ag}_2\text{S COM}$)

Se obtuvieron nanopartículas de sulfuro de plata experimentales ($\text{Ag}_2\text{S EX}$) en su fase acantita a partir del equipo de ultrasonido a 42 kHz en las imágenes TEM (Fig. 17 a), b), c)) se puede observar una morfología semiesférica y con apariencia aglomerada en algunas regiones; con una media de $2.28\text{nm} \pm 1.82\text{nm}$.

En el espectro de absorbancia óptica (Fig. 17 d)) en donde se muestra mayor absorción en la banda.

En el patrón de difracción de rayos X se puede obtener información de la estructura cristalina de un material y se pudo observar una banda definida y una pequeña banda que no corresponde en la comparación con la carta cristalográfica PDF#00-014-0072 (Fig. 17 e).

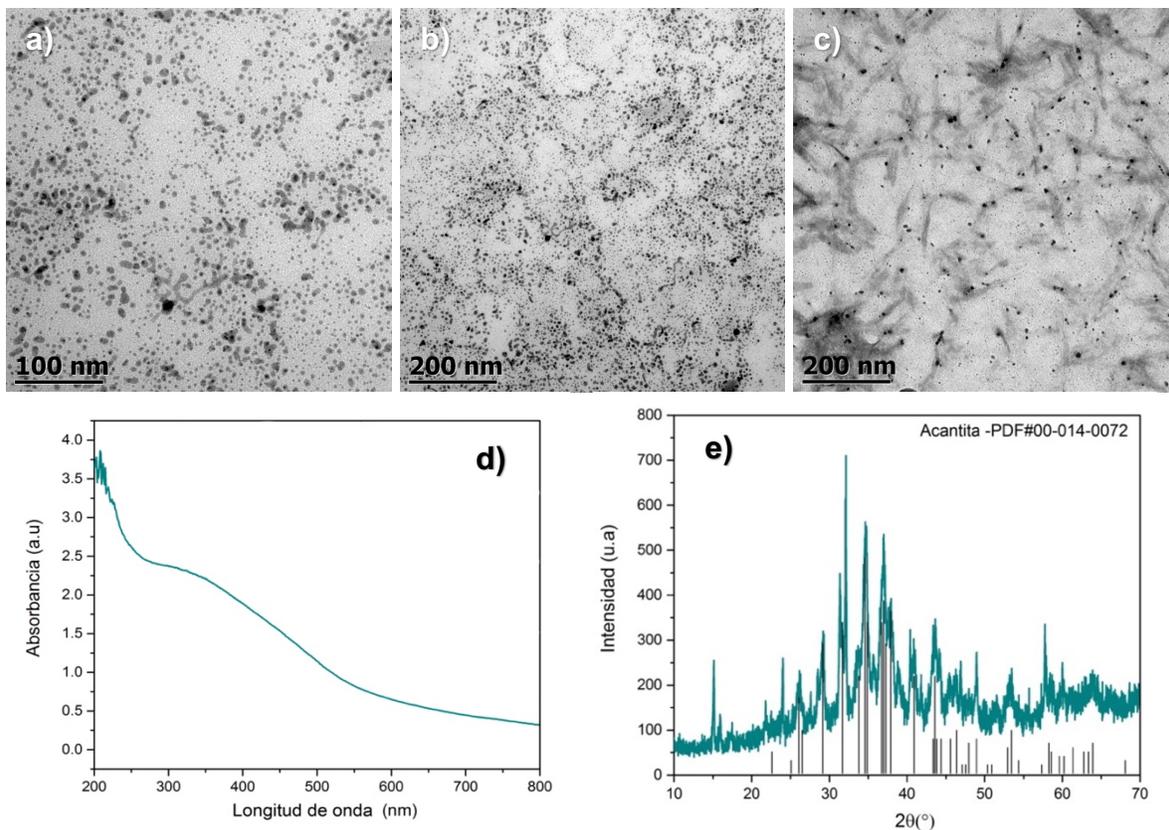


Figura 17. a), b) y c) Imágenes TEM, d) espectro de absorbancia óptica y e) patrón de difracción de rayos X de sulfuro de plata experimental ($\text{Ag}_2\text{S EX}$).

Las nanopartículas de sulfuro de plata con polietilenglicol (Ag_2S PEG) en la (Fig. 18 a), b), c)) se pueden observar más dispersas con una morfología semiesférica y con apariencia aglomerada en algunas regiones, con una media de $2.88 \text{ nm} \pm 1.86$.

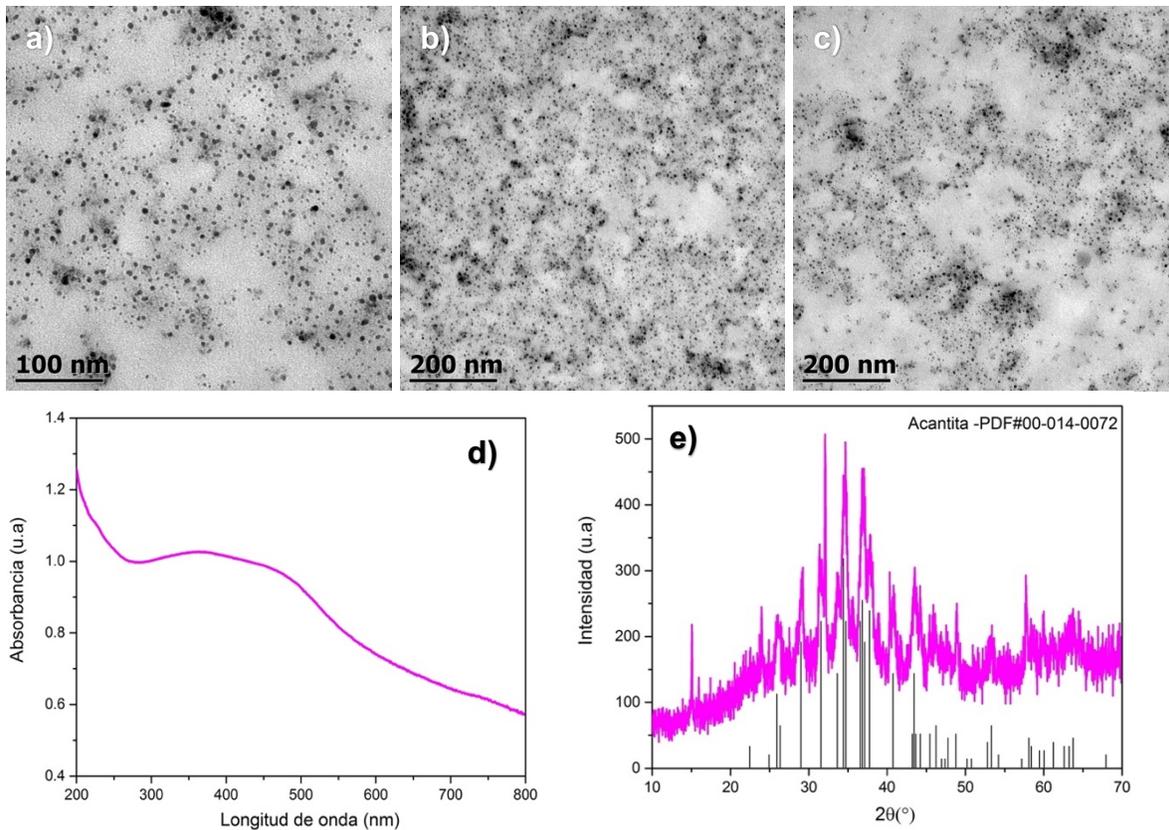
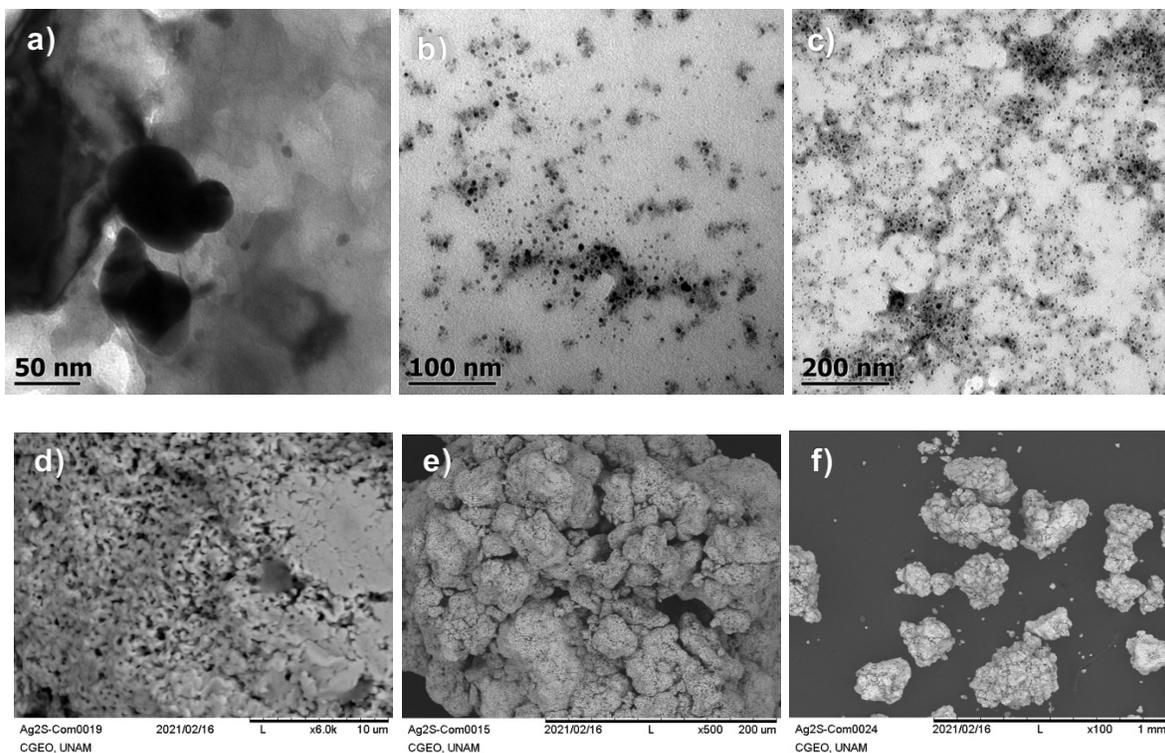


Figura 18. a), b) y c) Imágenes TEM, d) espectro de absorción óptica y e) patrón de difracción de rayos X de sulfuro de plata experimental con polietilenglicol (Ag_2S PEG).

9.2. Efecto del proceso de esterilización en las propiedades ópticas y estructurales del sulfuro de plata.

Se realizó el protocolo de esterilización en autoclave durante 20 minutos a 121°C y se realizó una nueva caracterización de las tres muestras de sulfuro de plata Ag₂S COM, Ag₂S EX y Ag₂S PEG. Además, se realizó la caracterización de los tres grupos de sulfuro de plata mediante Microscopio electrónico de barrido (MEB).

En la Fig. 19 d), e), y f), se pueden observar micrografías de MEB a distintas escalas observando d) una microestructura porosa y con aspecto de roca, e) se observa una forma de una roca irregular, semiesférica, f) se observan múltiples microestructuras con forma de roseta de maíz y la misma estructura porosa.



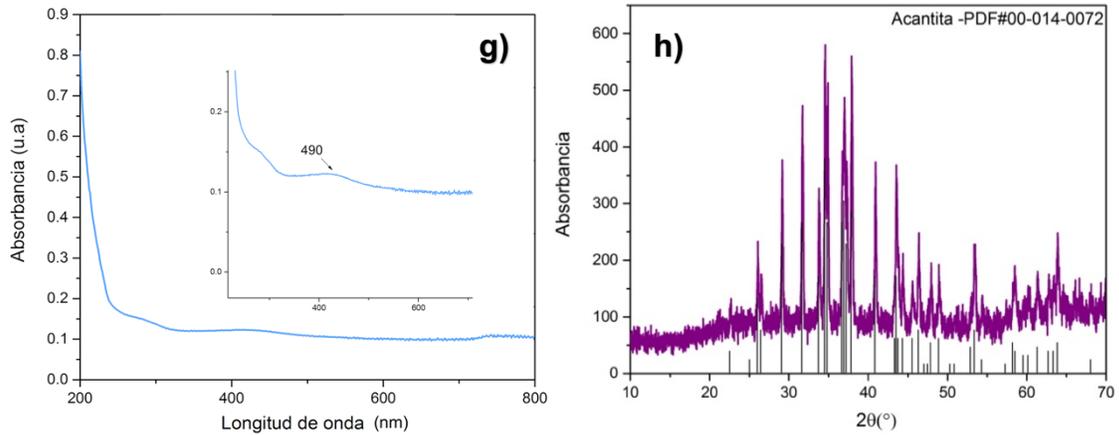


Figura 19 a) b) y c) microfotografías TEM, d), e) y f) Microfotografía SEM, g) espectro de absorción óptica y h) patrón de difracción de rayos X de sulfuro de plata comercial (Ag₂S COM).

En la Fig. 20 podemos observar el termograma del sulfuro de plata comercial en donde se observa un monitoreo de la pérdida de masa ante la temperatura que se mantiene constante hasta los 600 °C.

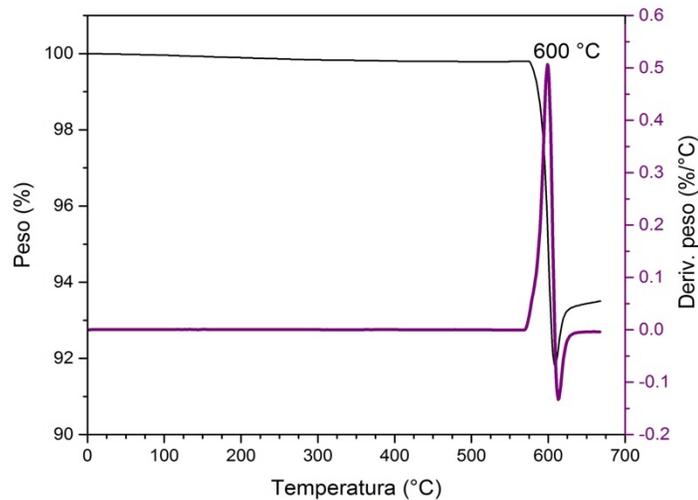


Figura 20 Termograma de sulfuro de plata comercial (Ag₂S COM)

En la Fig 21 a), b), c) en las microfotografías TEM se observa la apariencia característica aglomerada del sulfuro de plata y la distribución de este en distintas escalas. Las microfotografías MEB d), e) y f) nos muestran dos microestructuras diferentes, una con bordes irregulares y porosa y la segunda con bordes regulares y asemejando a un cristal, sin poros.

La imagen de la Fig. 21 g) nos muestra el espectro de absorbancia del sulfuro de plata experimental con una banda de absorción de 460 nm y h) la difracción de rayos X comparandose con su carta cristalográfica coincidiendo con una estructura acantita por la difracción de los planos cristalográficos.

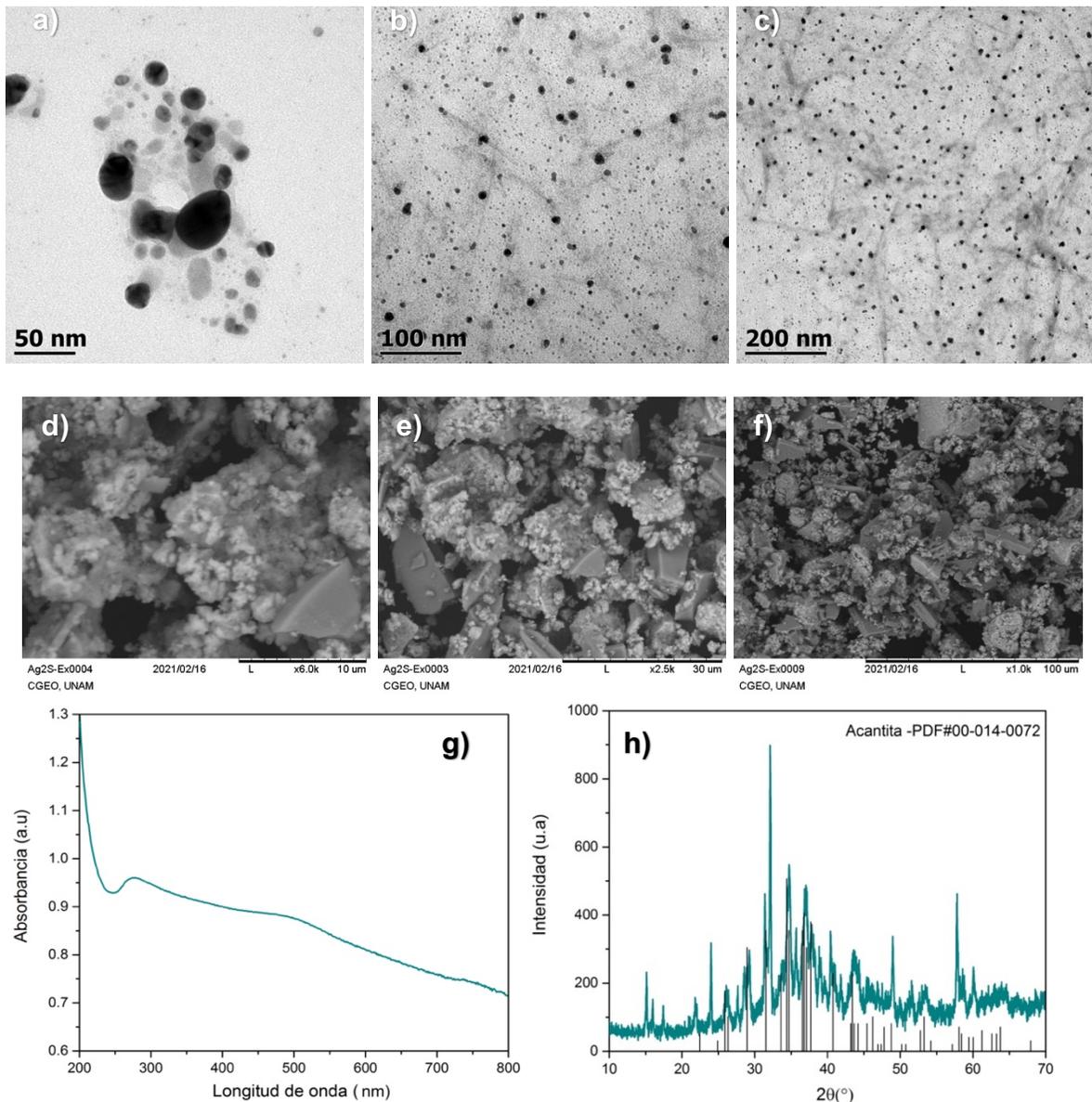


Figura 21 a),b),c) microfotografías TEM, d),e),f) Microfotografías SEM, g) espectro de absorbancia óptica y h) patrón de difracción de rayos X de sulfuro de plata experimental (Ag₂S EX).

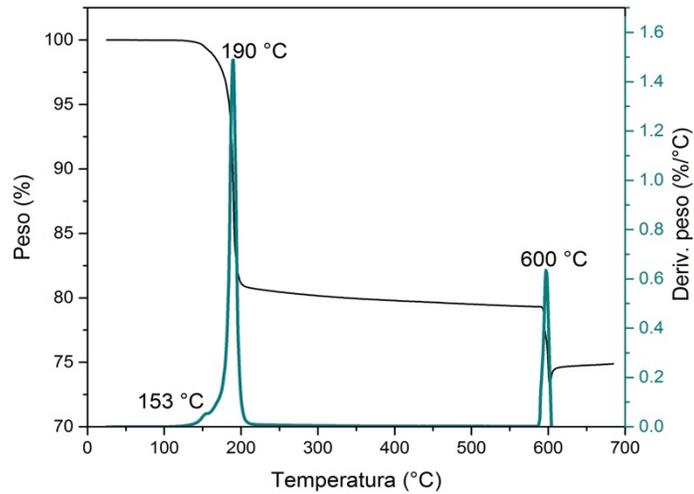
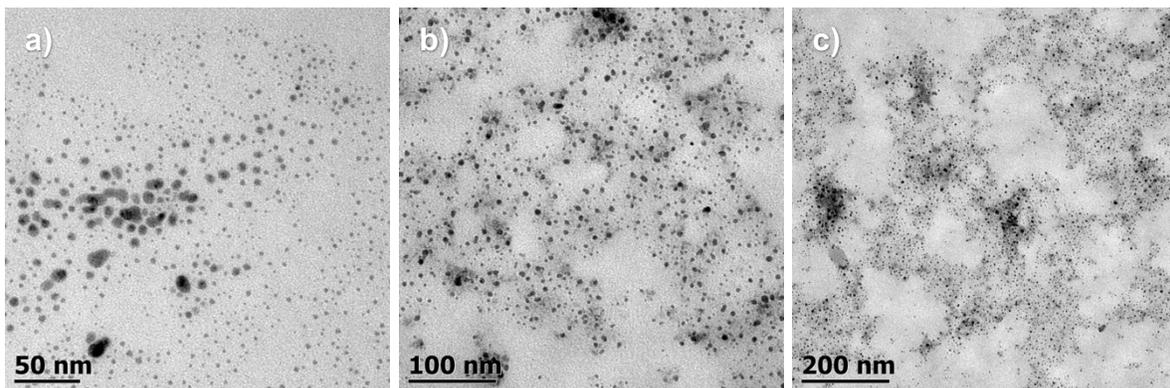


Figura 22 Termograma de sulfuro de plata experimental (Ag₂S EX)

En la Fig. 22 se puede observar una termografía del sulfuro de plata experimental en donde se observa un monitoreo de la pérdida de masa ante la temperatura, en donde se pueden observar tres variaciones de pérdida de masa, la primera a 153 °C, la segunda a 190 °C, manteniéndose constante hasta 600 °C.

En la Fig. 23 podemos encontrar en las micrografías TEM y SEM, condiciones parecidas al sulfuro de plata experimental con polietilenglicol, mostrando la aparición de dos microestructuras en las micrografías MEB.



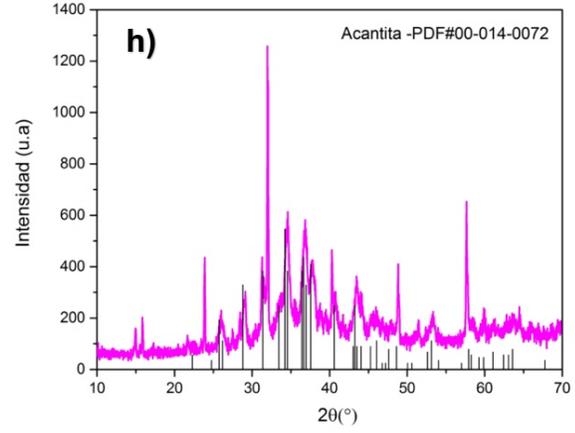
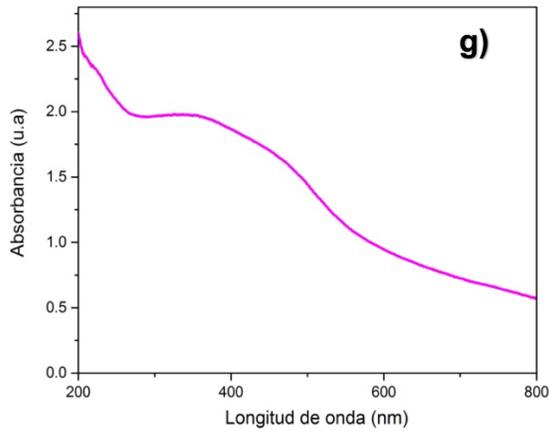
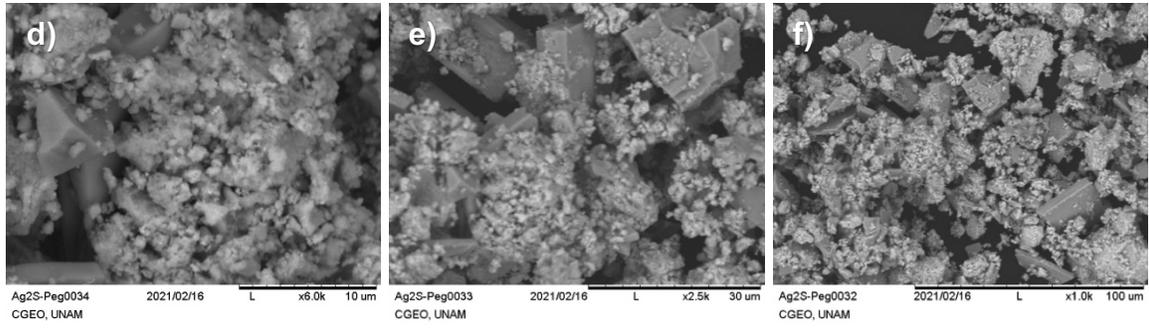


Figura 23 a), b) y c) microfotografías TEM, d), e) y f) Microfotografía SEM, g) espectro de absorción óptica y h) patrón de difracción de rayos X de sulfuro de plata experimental con polietilenglicol (Ag₂S PEG).

En la Fig. 24 se puede observar una termografía del sulfuro de plata experimental con polietilenglicol en donde la pérdida de masa ante la temperatura está en tres etapas, la primera a 154 °C, la segunda a 190 °C, manteniéndose constante hasta 600 °C.

Las primeras pérdidas pueden asociarse a cuestiones en el lavado de las nanopartículas relacionándose con impurezas dentro de la muestra.

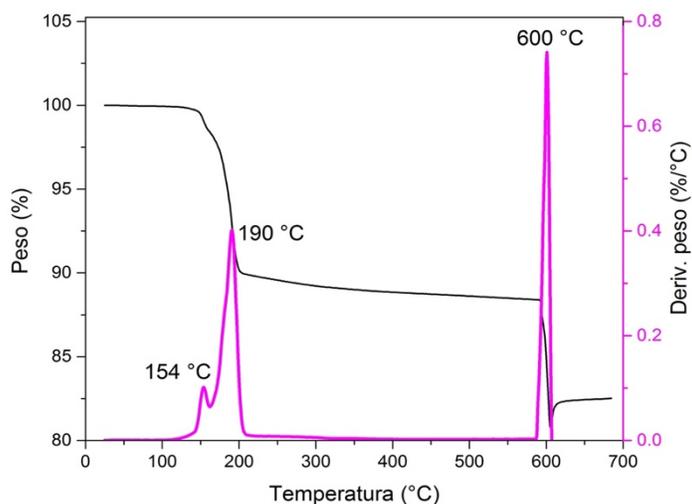


Figura 24 Termograma de sulfuro de plata experimental con polietilenglicol (Ag₂S PEG)

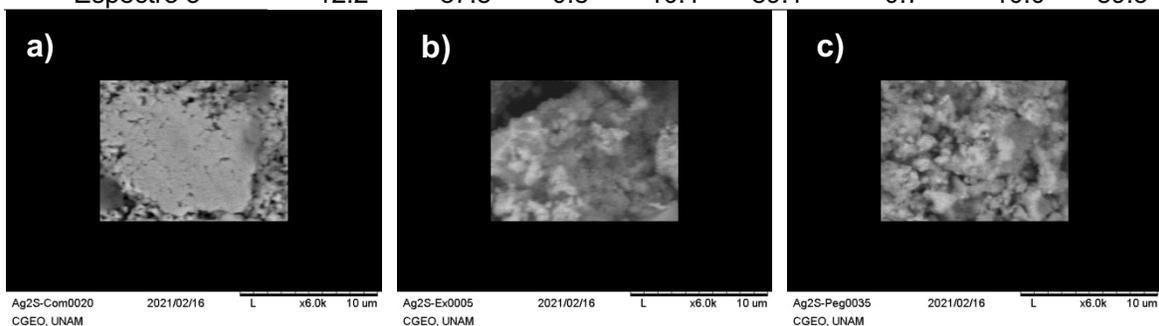
En la caracterización por morfología MEB, las nanopartículas de sulfuro de plata se muestran como aglomerados con apariencia granular concordando con las micrografías TEM.

Después de observar las micrografías SEM de las tres muestras de sulfuro de plata Ag₂S COM, Ag₂S EX y Ag₂S PEG se realizó un análisis de Energía Dispersiva (EDS) para determinar la composición química de algunas zonas en donde se observaban estructuras cuadradas, después de la cuantificación de los elementos presentes en dichas muestras se encontró (Al) aluminio en las nanopartículas experimentales (Ag₂S EX) al igual que en el sulfuro de plata experimental con polietilenglicol (Ag₂S PEG) (tabla 10) lo cual puede concordar con la presencia de pérdida de masa en dichas muestras.

En la tabla 10 se presenta la determinación de los elementos presentes en cada muestra por EDS y sus micrografías de la zona medida por muestra, los espectros fueron tomados de diversas zonas para la reproducibilidad del método.

Tabla 10 Determinación de elementos presentes en las muestras de sulfuro de plata.

	Micrografía a) Ag ₂ S COM		Micrografía b) Ag ₂ S EX			Micrografía c) Ag ₂ S PEG		
Zona medida	Elementos % en peso		Elementos % en peso			Elementos % en peso		
	S	Ag	Al	S	Ag	Al	S	Ag
Espectro 1	11.6	88.4	6.3	7.4	86.3	1.8	6.8	91.4
Espectro 2	18.5	81.5	6.5	9.7	86.3	2.2	2.9	94.9
Espectro 3	12.2	87.8	0.8	10.1	89.1	0.7	10.0	89.3



9.3 Propiedades antifúngicas de sulfuro de plata en *Candida albicans*

Por el método de difusión en agar se obtuvieron zonas de inhibición de hasta 14mm para el sulfuro de plata experimental (Ag_2S EX), mientras que en sulfuro de plata experimental con polietilenglicol (Ag_2S PEG) de hasta 11 mm, en comparación con el grupo control, en el cual se utilizó el antifúngico Anfotericina B, zona de inhibición de 17mm. Se observa un patrón dosis-dependiente, es decir a mayores concentraciones mayor es el efecto antifúngico.

Se calcularon promedios y desviaciones estándar, se aplicó el análisis estadístico ANOVA de Una Vía y pos-hoc Tukey test para determinar diferencia estadísticamente significativa a $p < 0.05$, se utilizó el software GraphPad Prism 6.

En el análisis del sulfuro de plata experimental (Ag_2S EX) (Figura 23, inciso a) se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los grupos, excepto en los siguientes grupos de dosis utilizados 3.5 mg/mL vs. 1.87 mg/mL, 1.87 mg/mL vs. 0.93 mg/mL, 0.93 mg/mL vs. 0.46 mg/mL, 0.93 mg/mL vs. 0.23 mg/mL, 0.46 mg/mL vs. 0.23 mg/mL.

Para el análisis del sulfuro de plata experimental con polietilenglicol (Ag_2S PEG) (Figura 23, inciso b) se encontraron diferencias significativas en algunos grupos de dosis utilizados, a excepción del grupo de dosis 0.46 mg/mL vs. 0.23 mg/mL, 0.23 mg/mL vs. 0.11 mg/mL, 0.23 mg/mL vs. 0.05 mg/mL y 0.11 mg/mL vs. 0.05 mg/mL los cuales no mostraron diferencia estadísticamente significativa.

El sulfuro de plata comercial no mostró zonas de inhibición en ninguna de sus dosis.

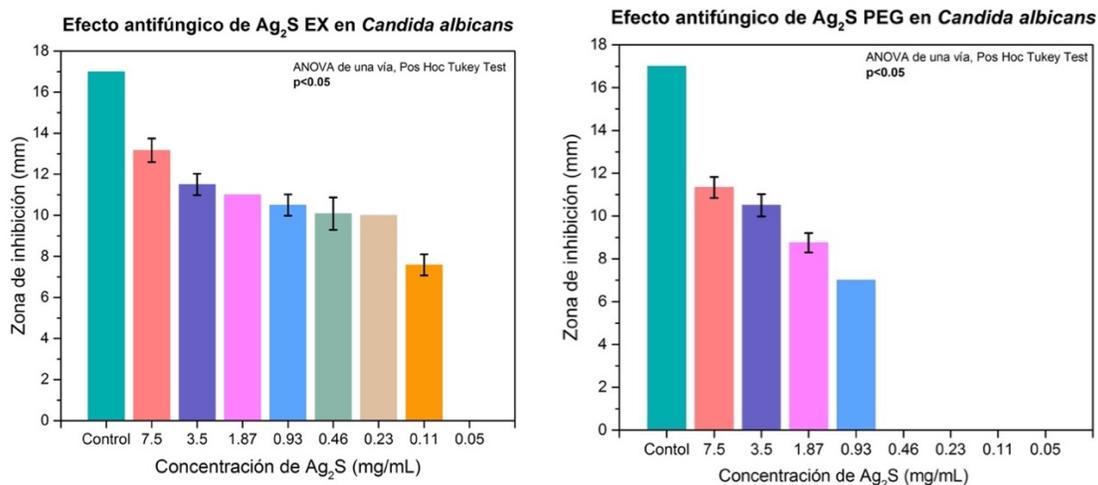


Figura 25 Efecto antifúngico por difusión en agar de nanopartículas en *C. albicans* a) Experimentales (Ag_2S EX) y b) recubiertas con polietilenglicol (Ag_2S PEG).

La concentración mínima inhibitoria obtenida por el ensayo de microdilución concuerda con la Figura 26 en donde se pueden observar las placas de 96 pocillos con las respondientes concentraciones. En el inciso a) se puede observar el sulfuro de plata comercial la dosis mínima inhibitoria de 3.75 mg/mL, en el inciso b) el sulfuro de plata experimental la dosis mínima inhibitoria de 0.23 mg/mL al igual que para el sulfuro de plata experimental con polietilenglicol (inciso c)).

a) **mg/mL** Ag₂S COM en *Candida albicans*

7.5
3.75
 1.87
 0.93
 0.46
 0.23
 Control (+)
 Control (-)



b) **mg/mL** Ag₂S EX en *Candida albicans*

7.5
 3.75
 1.87
 0.93
 0.46
0.23
 Control (+)
 Control (-)



c) **mg/mL** Ag₂S PEG en *Candida albicans*

7.5
 3.75
 1.87
 0.93
 0.46
0.23
 Control (+)
 Control (-)



Figura 26. Placas de ensayo de microdilución en donde se puede observar la concordancia de la concentración mínima inhibitoria obtenida en cada muestra de sulfuro de plata a) sulfuro de plata comercial (Ag₂S COM), b) Sulfuro de plata experimental (Ag₂S EX) y c) Sulfuro de plata experimental con polietilenglicol (Ag₂S PEG).

La Tabla 11 muestra un resumen de los resultados obtenidos de los ensayos de microdilución del sulfuro de plata. Las concentraciones utilizadas en el presente estudio fueron de 7.5 mg/mL a 0.23 mg/mL.

Tabla 11 Concentración mínima inhibitoria (MIC) de Ag₂S en *Candida albicans* ATCC 90028.

Nanopartículas	Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)
Ag ₂ S COM	3.75 mg/mL
Ag ₂ S EX	0.23 mg/mL
Ag ₂ S PEG	0.23 mg/mL

9.4 Citotoxicidad de sulfuro de plata en FGH

Las gráficas de la figura 27 corresponden a la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos (FGH) en contacto con diferentes concentraciones de sulfuro de plata; sulfuro de plata comerciales ($\text{Ag}_2\text{S COM}$), sulfuro de plata experimentales ($\text{Ag}_2\text{S EX}$) y sulfuro de plata experimentales con polietilenglicol ($\text{Ag}_2\text{S PEG}$). En las tres muestras se observa un comportamiento distinto.

En el sulfuro de plata comercial ($\text{Ag}_2\text{S COM}$) se puede observar un incremento en la proliferación celular de forma dosis-dependiente, por lo que según la norma internacional para citotoxicidad (ISO 10993) se considera no citotóxico (Tabla 12).

El sulfuro de plata experimental ($\text{Ag}_2\text{S EX}$) tiene un efecto citotóxico dosis-dependiente, en este se puede observar que, en las concentraciones de 0.011, 0.023, 0.046 y 0.093 mg/mL la viabilidad celular se mantiene y aumenta, pero a partir de la dosis de 0.187 mg/mL esta disminuye bruscamente y según la norma internacional de citotoxicidad se clasifica como ligeramente citotóxico, mientras que en la concentración más alta de 0.75 mg/mL cambia nuevamente a no citotóxico al recuperar la viabilidad celular (Tabla 12). La dosis citotóxica media CC_{50} es de 0.22 mg/mL, lo cual habla de que a esta concentración el 50% de nuestras células ya no son viables (tabla 13).

El sulfuro de plata experimental con polietilenglicol ($\text{Ag}_2\text{S PEG}$) tiene un efecto de hormesis a las primeras 3 dosis bajas lo que propicia una proliferación celular, y una disminución de la viabilidad celular irreversible dosis-dependiente en el cual a mayor concentración de sulfuro de plata menor viabilidad celular de FGH (Tabla 12). La dosis citotóxica media CC_{50} es de 0.099 mg/mL (Tabla 13), lo cual habla de que a esta concentración el 50% de nuestras células ya no son viables.

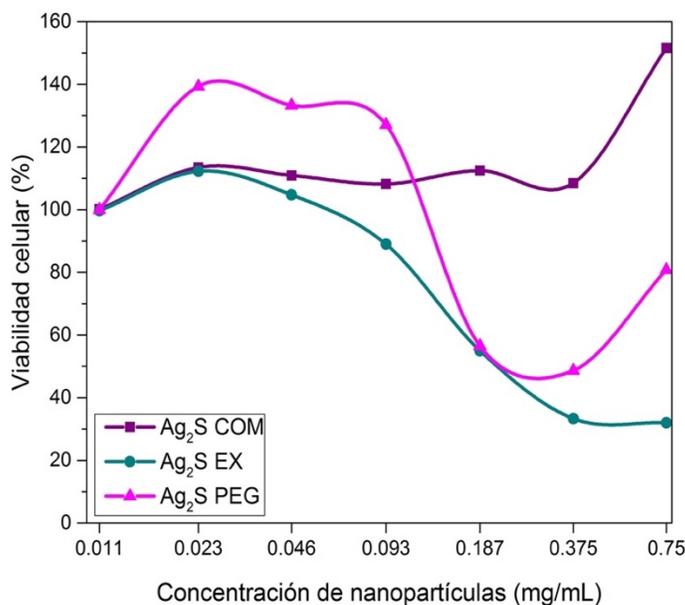


Figura 27 Ensayo de MTT de sulfuro de plata con FGH.

Tabla 12 Porcentajes de viabilidad celular obtenidas en el presente estudio, de acuerdo a las norma internacional ISO 10993 para citotoxicidad.

Porcentaje de viabilidad celular	Nivel de citotoxicidad	Ag₂S COM	Ag₂S EXP	Ag₂S PEG
100 - 75 %	No citotóxico	>100% (0-0.75 mg/mL)	>100% (0-0.093 mg/mL y 0.75 mg/mL)	<100% (0-0.093 mg/mL)
74 – 50 %.	Ligeramente citotóxico		50% (0.093-0.375 mg/mL)	
49 – 25 %	Moderadamente citotóxico			<40% (0.093-0.75 mg/mL)
24 – 0 %	Severamente citotóxico			

Tabla 13 Dosis citotóxica media C₅₀ de las nanopartículas de sulfuro de plata

Nanopartículas	Dosis citotóxica media C₅₀
Ag₂S EXP	0.22 mg/mL
Ag₂S PEG	0.099 mg/mL

10. DISCUSIÓN

Después de la síntesis química asistida por ultrasonido a 42 KHz durante dos horas, se obtuvieron dos tipos de nanopartículas de sulfuro de plata en síntesis separadas. Ambas síntesis (Ag_2S EX y Ag_2S PEG) muestran una morfología semiesférica o semiesférica con un tamaño aproximado de 1-10 nm. Los métodos de síntesis son muy importantes en las aplicaciones biológicas que se les pueda dar, aunque la literatura aún es limitada (Argueta-Figueroa et al., 2017), también en las micrografías TEM se puede observar aglomeración de las nanopartículas de sulfuro de plata como se reporta para las nanopartículas metálicas semiconductoras en soluciones coloidales (Delgado-Beleño et al., 2018).

Como se ha visto en diferentes métodos de síntesis para obtener las nanopartículas de sulfuro de plata (Mendoza Avilés et al., 2021) no muestran una modificación en la inhibición bacteriana y viabilidad celular, pero si muestran un importante cambio en el tamaño del sulfuro de plata. El tamaño de nanopartícula que se obtuvieron en este trabajo de tesis se encuentra en un rango de 1 a 10 nm lo que indica que tienen una distribución de tamaño similar entre si.

Los espectros UV-vis indican que las nanopartículas Ag_2S PEG se encuentran en una banda de absorción de 427 nm mientras que las nanopartículas Ag_2S EX se encuentran en una banda de 490 nm lo cual coincide con las bandas reportadas en una biosíntesis de nanopartículas de sulfuro de plata con un rango de 410 a 440 nm (Suresh et al., 2011).

En estudios realizados examinaron la actividad antimicrobiana del sulfuro de plata sintetizado con otros agentes o compuestos adicionales, uno de los microorganismos utilizado fue *S. aureus* analizado en difusión en agar y obteniendo una zona de inhibición de 11 a 38 mm, para *E. coli* se reporta una inhibición de 11 mm a 22,38 mm (Jafari et al., 2017). En el ensayo de difusión en agar, según los puntos de corte del documento M44-A CLSI de la Clinical and Laboratorio Standard Institute demostraron que las nanopartículas experimentales se encuentran en el punto resistente ya que según los resultados su dosis máxima de 7.5 mg/mL se encuentra en 14 mm y las nanopartículas con polietilenglicol como Resistentes al encontrarse con una inhibición en su dosis máxima de 13 mm (Tapia, 2009).

Se cree que por la aglomeración que presentan las nanopartículas comerciales tienden a perder estabilidad, esto puede reflejarse en la modificación de sus propiedades ópticas y la reducción de su actividad antibacteriana (Delgado-Beleño et al., 2018).

Se sabe que la hormesis proporciona un marco de modelo de respuesta a la dosis para ayudar en la selección del número de dosis y el espaciamiento entre estas (Calabrese, 2018). Por lo cual, a partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se puede determinar que las mejores dosis a ser empleadas se encuentran entre 0.187 a 0.023 mg/mL. Por otro lado, el estudio de la citotoxicidad de nanopartículas de sulfuro de plata se ha estudiado en ratones y se han encontrado daños menores en los órganos de los ratones tratados de 28 a 60 días. Además,



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

los resultados también demuestran que las nanopartículas son secretadas por el excremento y la orina (Delgado-Beleño et al., 2018). Si las nanopartículas aplicadas a materiales dentales llegaran a ser ingeridas éstas podrían considerarse como un riesgo mínimo a la salud ya que se plantea su uso en materiales de uso transitorio. En algunos estudios también se pudo observar que el tamaño de nanopartícula influye en la viabilidad celular aunque por la falta de evidencia no hay una dependencia clara aún (Mendoza Avilés et al., 2021). Los mecanismos exactos de toxicidad de las nanopartículas no se comprenden bien, pero sus efectos genotóxicos y apoptóticos se informan con frecuencia. La toxicidad de las nanopartículas puede estar relacionada con el desequilibrio redox que conduce a importantes daños oxidativos en el ADN a través del estrés oxidativo (Ozkan Vardar et al., 2018). Además en un estudio realizado con plantas se infiere que la toxicidad del sulfuro de plata proviene de la plata, ya que una vez que el sulfuro de plata se acumulaba en los tejidos de la planta se liberaban pequeñas cantidades de iones de plata (P. Wang et al., 2017). Por otra parte, el polietilenglicol es un polímero anfifílico sensible al pH, que se utiliza para encapsular fármacos hidrófobos bajo pH fisiológico y liberar el fármaco por debajo de un pH 6.5, esto le confiere una rápida entrada a las células y una acumulación en los lisosomas celulares lo cual se ha observado en células tumorales generando una interrupción en las vías de señalización celular (Zhong et al., 2020). Además, las nanopartículas se recubren con frecuencia con polietilenglicol (PEG) para evitar el sistema reticuloendotelial y aumentar la vida media de la circulación sanguínea. El recubrimiento de PEG hace que la nanopartícula sea más hidrófila y neutra, lo que les permite evitar el sistema inmunológico más fácilmente; sin embargo, el PEG afecta poco a la captación celular y la liberación del fármaco (Hoshyar et al., 2016). Esto puede explicar que las nanopartículas sintetizadas con polietilenglicol en este estudio, posean una mayor actividad citotóxica en contacto con los fibroblastos gingivales humanos y que su dosis citotóxica media sea mayor a menores concentraciones que las experimentales.

11. CONCLUSIÓN

Se acepta la hipótesis enunciada ya que las nanopartículas de sulfuro de plata Ag_2S EX y PEG fueron efectivas en la inhibición de *Candida albicans* ATCC 92800, sin embargo, resultaron tener un ligero efecto citotóxico en los cultivos con fibroblastos gingivales humanos FGH, mientras que las nanopartículas COM de Sigma Aldrich no tuvieron inhibición.

El presente estudio permitió conocer el efecto del polietilenglicol en los ensayos de susceptibilidad antifúngica de las nanopartículas de sulfuro de plata sintetizadas mediante la técnica de ultrasonido, mostrándonos efectos similares a las nanopartículas sin recubrimiento con polietilenglicol.



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.

El ensayo de difusión en agar se utilizó de manera cualitativa para mostrar si el efecto era nulo o positivo, obteniendo un efecto positivo para las nanopartículas experimentales con y sin polietilenglicol, y nulo en las nanopartículas comerciales. En el ensayo de microdilución demostró que a concentraciones de 0.93 a 3.75 mg/mL se muestra un efecto fungistático, mientras que se necesita una mayor concentración de 3.75 mg/mL para demostrar un efecto fungicida.

El ensayo de citotoxicidad reveló que hay un efecto que responde a las dosis utilizadas y que existen dosis que son viables para su uso, las cuales fueron 0.0 a 0.093 mg/mL para los tres grupos de nanopartículas de sulfuro de plata y 0.75 mg/mL para nanopartículas comerciales.

Limitaciones

Las limitaciones del estudio fueron los aglomerados que se formaban por las nanopartículas de sulfuro de plata (Ag_2S) además de su difícil dispersión en los medios acuosos como los medios de cultivo, sobre todo en las nanopartículas comerciales, lo cuál dificultaba su manipulación.

Además del tiempo que se redujo para este proyecto por la pandemia.

Trabajo futuro

C. albicans no se encuentra de manera aislada en cavidad oral por lo que es de suma importancia en trabajos futuros realizar un estudio en biopelículas para determinar qué concentraciones de nanopartículas de sulfuro de plata son viables.

Realizar pruebas más específicas como por ejemplo colocar marcadores para poder observar en donde es que se encuentra la nanopartícula en cada parte del ciclo celular; sería de gran utilidad para profundizar en los mecanismos de acción, así como para conocer más de los efectos del sulfuro de plata con otros microorganismos y su comportamiento aplicado en materiales dentales.

Evaluar el efecto antifúngico de las nanopartículas de sulfuro de plata en un acondicionador de tejidos.

Plantear un sistema de cultivo combinado de fibroblastos y *C. albicans*.

12. REFERENCIAS

- Argueta-Figueroa, L., Martínez-Alvarez, O., Santos-Cruz, J., Garcia-Contreras, R., Acosta-Torres, L. S., de la Fuente-Hernández, J., & Arenas-Arrocena, M. C. (2017). Nanomaterials made of non-toxic metallic sulfides: A systematic review of their potential biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*, 76, 1305–1315. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.120>
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., & Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology*, 4(10), 634–641. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.242>
- Bapat, R. A., Chaulal, T. V., Joshi, C. P., Bapat, P. R., Choudhury, H., Pandey, M., Gorain, B., & Kesharwani, P. (2018). An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. *Materials Science and Engineering C*, 91(September 2017), 881–898. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.069>
- Baygar, T., Ugur, A., Sarac, N., Balci, U., & Ergun, G. (2018). Functional denture soft liner with antimicrobial and antibiofilm properties. *Journal of Dental Sciences*, 13(3), 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2017.10.002>
- Broek, R., Koczorowski, R., Rogalewicz, R., Voelkel, A., Czarnecka, B., & Nicholson, J. W. (2011). Effect of denture cleansers on chemical and mechanical behavior of selected soft lining materials. *Dental Materials*, 27(3), 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.11.003>
- Bueno, M. G., Urban, V. M., Barbério, G. S., da Silva, W. J., Porto, V. C., Pinto, L., & Neppelenbroek, K. H. (2015). Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. *Oral Diseases*, 21(1), 57–65. <https://doi.org/10.1111/odi.12207>
- Bunaciu, A. A., Udriștiou, E. gabriela, & Aboul-Enein, H. Y. (2015). X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45(4), 289–299. <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.949616>
- Calabrese, E. J. (2018). Hormesis: Path and progression to significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19102871>
- Czerninski, R., Pikovsky, A., Gati, I., Friedman, M., & Steinberg, D. (2015). Comparison of the efficacy of a novel sustained release clotrimazole varnish and clotrimazole troches for the treatment of oral candidiasis. *Clinical Oral Investigations*, 19(2), 467–473. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1259-5>
- Daniel E Shumer, N. J. N. N. P. S. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(12), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115422>. Predictive
- Delgado-Beleño, Y., Martínez-Nuñez, C. E., Cortez-Valadez, M., Flores-López, N. S., & Flores-Acosta, M. (2018). Optical properties of silver, silver sulfide and silver selenide nanoparticles and antibacterial applications. *Materials Research Bulletin*, 99(June 2017), 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2017.11.015>
- Dorocka-Bobkowska, B., Medyński, D., & Pryliński, M. (2017). Recent advances in tissue conditioners for prosthetic treatment: A review. *Advances in Clinical and*



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

- Experimental Medicine*, 26(4), 723–728. <https://doi.org/10.17219/acem/62634>
- Duran-Pinedo, A. E., & Frias-Lopez, J. (2015). Beyond microbial community composition: Functional activities of the oral microbiome in health and disease. *Microbes and Infection*, 17(7), 505–516. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.03.014>
- González, R. (2008). Fotodegradación de productos plásticos elaborados con polietileno lineal de baja densidad. *Centro de Investigaciones En Óptica A.C.*, 1–135. <http://biblioteca.cio.mx/tesis/13072.pdf>
- Gow, N. A. R., & Yadav, B. (2017). Microbe profile: *Candida albicans*: A shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiology (United Kingdom)*, 163(8), 1145–1147. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000499>
- Guiglia, R., Musciotto, A., Compilato, D., Procaccini, M., Russo, L., Ciavarella, D., Muzio, L., Cannone, V., Pepe, I., D'Angelo, M., & Campisi, G. (2010). Aging and Oral Health: Effects in Hard and Soft Tissues. *Current Pharmaceutical Design*, 16(6), 619–630. <https://doi.org/10.2174/138161210790883813>
- Gulati, M., & Nobile, C. J. (2017). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*, 18(5), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002.Candida>
- Hoshyar, N., Gray, S., Han, H., & Bao, G. (2016). The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction Nanoparticle-based. *Nanomedicine*, 11(6), 673–692. <https://doi.org/10.2217/nnm.16.5>
- Jafari, L., Pourahmad, A., & Asadpour, L. (2017). Rice husk based MCM-41 nanoparticles loaded with Ag₂S nanostructures by a green and room temperature method and its antimicrobial property. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 47(11), 1552–1559. <https://doi.org/10.1080/24701556.2017.1357609>
- Jensen, R. H. (2016). Resistance in human pathogenic yeasts and filamentous fungi: prevalence, underlying molecular mechanisms and link to the use of antifungals in humans and the environment. *Danish Medical Journal*, 63(10), 1–34.
- Kadosh, D. (2019). Regulatory mechanisms controlling morphology and pathogenesis in *Candida albicans*. *Physiology & Behavior*, 52(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.04.005.Regulatory>
- Khezerlou, A., Alizadeh-Sani, M., Azizi-Lalabadi, M., & Ehsani, A. (2018). Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses. *Microbial Pathogenesis*, 123(February), 505–526. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.008>
- Krishnamurthy, S., & Hallikerimath, R. B. (2016). An in-vitro evaluation of retention, colonization and penetration of commonly used denture lining materials by *Candida albicans*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(10), ZC84–ZC88. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/20892.8665>
- Lee, H. L., Wang, R. S., Hsu, Y. C., Chuang, C. C., Chan, H. R., Chiu, H. C., Wang, Y. B., Chen, K. Y., & Fu, E. (2018). Antifungal effect of tissue conditioners containing poly(acryloyloxyethyltrimethyl ammonium chloride)-grafted chitosan on *Candida albicans* growth in vitro. *Journal of Dental Sciences*, 13(2), 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2017.06.004>
- Li, Z., Sun, J., Lan, J., & Qi, Q. (2016). Effect of a denture base acrylic resin

- containing silver nanoparticles on *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. *Gerodontology*, 33(2), 209–216. <https://doi.org/10.1111/ger.12142>
- Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D., & Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 19–31. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>
- Manals, E., Penedo, M., & Ortega, G. (2011). Thermogravimetric and Thermal Analysis Differential Different Vegetable Biomasses. *Chemical Technology*, 31, 180–190.
- Mendoza Avilés, A. M., Mendoza Ornelas, M. G., Andrade Martínez, L. M., Miranda Fernández, H. J., Mares Muñoz, S. S., Vilchis Valadez, E. P., Castañeda Cisneros, J. E., & Arenas-Arocena, M. C. (2021). Biocompatibilidad y actividad microbiana de sulfuro de plata nanoestructurado para aplicación en biomateriales: revisión sistemática. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 14(27), 1e-14e. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2021.27.69666>
- Montelongo-Jauregui, D., & Lopez-Ribot, J. L. (2018). *Candida* interactions with the oral bacterial microbiota. *Journal of Fungi*, 4(4). <https://doi.org/10.3390/jof4040122>
- Mousavi, S. A., Ghotaslou, R., Akbarzadeh, A., Azima, N., Aeinfar, A., & Khorramdel, A. (2019). Evaluation of antibacterial and antifungal properties of a tissue conditioner used in complete dentures after incorporation of ZnO–Ag nanoparticles. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, 13(1), 11–18. <https://doi.org/10.15171/joddd.2019.002>
- Muttagi, S., & Subramanya, J. K. (2017). Effect of incorporating seed oils on the antifungal property, surface roughness, wettability, weight change, and glucose sorption of a soft liner. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 117(1), 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2016.05.010>
- Neppelenbroek, K. H., Lima, J. F. M., Hotta, J., Galitesi, L. L., Almeida, A. L. P. F., & Urban, V. M. (2018). Effect of Incorporation of Antifungal Agents on the Ultimate Tensile Strength of Temporary Soft Denture Liners. *Journal of Prosthodontics*, 27(2), 177–181. <https://doi.org/10.1111/jopr.12660>
- O'Donnell, L. E., Millhouse, E., Sherry, L., Kean, R., Malcolm, J., Nile, C. J., & Ramage, G. (2015). Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity. *FEMS Yeast Research*, 15(7), 1–14. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov077>
- Ogunsona, E. O., Muthuraj, R., Ojogbo, E., Valerio, O., & Mekonnen, T. H. (2020). Engineered nanomaterials for antimicrobial applications: A review. *Applied Materials Today*, 18(xxxx), 100473. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.100473>
- Ozkan Vardar, D., Aydin, S., Hocaoglu, I., Yagci Acar, F. H., & Basaran, N. (2018). Effects of silver sulfide quantum dots coated with 2-mercaptopropionic acid on genotoxic and apoptotic pathways in vitro. *Chemico-Biological Interactions*, 291(March), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.032>
- Patil, S., Rao, R. S., Majumdar, B., & Anil, S. (2015). Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01391>
- Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., & Alastruey-Izquierdo, A. (2017). The

- global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(12), e383–e392.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30316-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30316-X)
- Renau-piqueras, J., & Faura, M. (1965). *Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido*. 73–92.
- Rodrigues, S., Shenoy, V., & Shetty, T. (2013). Resilient liners: A review. *Journal of Indian Prosthodontist Society*, 13(3), 155–164.
<https://doi.org/10.1007/s13191-012-0143-8>
- Rudramurthy, G. R., Swamy, M. K., Sinniah, U. R., & Ghasemzadeh, A. (2016). Nanoparticles: Alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. *Molecules*, 21(7), 1–30. <https://doi.org/10.3390/molecules21070836>
- Salata, O. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 6(3), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-12>
- Subramaniyan, S. B., Megarajan, S., Vijayakumar, S., Mariappan, M., & Anbazhagan, V. (2019). Evaluation of the toxicities of silver and silver sulfide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *IET Nanobiotechnology*, 13(3), 326–331. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5221>
- Suresh, A. K., Doktycz, M. J., Wang, W., Moon, J. W., Gu, B., Meyer, H. M., Hensley, D. K., Allison, D. P., Phelps, T. J., & Pelletier, D. A. (2011). Monodispersed biocompatible silver sulfide nanoparticles: Facile extracellular biosynthesis using the γ -proteobacterium, *Shewanella oneidensis*. *Acta Biomaterialia*, 7(12), 4253–4258. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.07.007>
- Tapia, C. V. (2009). Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Revista Chilena de Infectología*, 26(2), 144–150.
- Tverdek, F. P., Kofteridis, D., & Kontoyiannis, D. P. (2016). Antifungal agents and liver toxicity: a complex interaction. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 14(8), 765–776. <https://doi.org/10.1080/14787210.2016.1199272>
- Valdés, B. S. G. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2), 1–15.
- Vila, T., Sultan, A. S., Montelongo-Jauregui, D., & Jabra-Rizk, M. A. (2020). Oral candidiasis: A disease of opportunity. *Journal of Fungi*, 6(1), 1–28.
<https://doi.org/10.3390/jof6010015>
- Wang, L., Shi, R., Lu, Y., & Yu, Y. (2020). Rapid defect characterization: The efficiency of diffraction contrast-scanning transmission electron microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 83(12), 1604–1609.
<https://doi.org/10.1002/jemt.23556>
- Wang, P., Lombi, E., Sun, S., Scheckel, K. G., Malysheva, A., McKenna, B. A., Menzies, N. W., Zhao, F. J., & Kopittke, P. M. (2017). Characterizing the uptake, accumulation and toxicity of silver sulfide nanoparticles in plants. *Environmental Science: Nano*, 4(2), 448–460.
<https://doi.org/10.1039/c6en00489j>
- Williams, D., & Lewis, M. (2011). Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *Journal of Oral Microbiology*, 3(2011), 1–11.
<https://doi.org/10.3402/jom.v3i0.5771>
- Zheng, K., Setyawati, M. I., Leong, D. T., Xie, J., Khezerlou, A., Alizadeh-Sani, M., Azizi-Lalabadi, M., Ehsani, A., Ogunsona, E. O., Muthuraj, R., Ojogbo, E., Valerio, O., Mekonnen, T. H., Garcia-Contreras, R., Sugimoto, M., Umemura,

- N., Kaneko, M., Hatakeyama, Y., Soga, T., ... Anbazhagan, V. (2018). Antimicrobial silver nanomaterials. *Microbial Pathogenesis*, 123(xxxx), 100473. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.11.019>
- Zhong, Y., Zou, Y., Liu, L., Li, R., Xue, F., & Yi, T. (2020). pH-responsive Ag₂S nanodots loaded with heat shock protein 70 inhibitor for photoacoustic imaging-guided photothermal cancer therapy. *Acta Biomaterialia*, 115, 358–370. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.08.007>

ANEXOS

1. Artículos en proceso

Terapia antifúngica en acondicionadores de tejidos para prótesis dentales: Revisión sistemática

Antifungal therapy in soft liners for dentures: A systematic review

Edna Pamela Vilchis-Valadez,¹ Andrea Lucia Macias-Jacobo,² Alonso Alejandro Mariaud-Landa,² Laura Susana Acosta-Torres,³ Genoveva Hernández-Padrón,⁴ Ma. Concepción Arenas-Arrocena^{3*}

¹ Maestría en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, León Guanajuato, México.

² Licenciatura en Odontología, Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, León Guanajuato, México.

³ Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria, Nanoestructuras y Biomateriales, Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, León Guanajuato, México.

⁴ Departamento de Nanotecnología, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Juriquilla, Querétaro, México.

|

Corresponding author:

* Ma. Concepción Arenas-Arrocena, e-mail: carenas@enes.unam.mx

Resumen

Los acondicionadores de tejidos se usan de manera constante en pacientes con mucosas atrofiadas para limitar el efecto traumático de las prótesis removibles totales, proporcionando un efecto de amortiguación y distribuyendo las cargas de la masticación durante el movimiento. En la actualidad, existen diversos informes que sugieren que la mayoría de los pacientes que usan prótesis removibles totales pueden sufrir estomatitis protésica causada por *Candida albicans*, lo cual incrementa cuando se utiliza un acondicionador de tejidos por la estructura física del material que actúa como reservorio de



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

2. Publicación de un artículo de revisión

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

www.mundonano.unam.mx | **Mundo Nano**
https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2021.27.69666 | 14(27), 1e-14e, julio-diciembre 2021

Biocompatibilidad y actividad microbiana de sulfuro de plata nanoestructurado para aplicación en biomateriales: revisión sistemática[◇]

Biocompatibility and microbial activity of silver sulfide nanostructured for application in biomaterials: a systematic review

Aimee Marlene Mendoza Avilés,* Mercedes Guadalupe Mendoza Ornelas,* Lilia Michelle Andrade Martínez,* Héctor Javier Miranda Fernández,* Sayra Susana Mares Muñoz,* Edna Pamela Vilchis Valadez,** Jesús Enrique Castañeda Cisneros,*** María Concepción Arenas-Arrocena[†]

ABSTRACT: We are currently facing a difficult outlook due to the marked antibiotic resistance to existing antimicrobial agents. Microbial infections represent an important clinical threat, which is why it is necessary to look for alternatives for new agents, carrying out tests for microbial sensitivity and biocompatibility. The aim of this review is to do a systematic search about the microbial activity and the biocompatibility of silver sulfide nanostructured for biomaterial applications. The search was carried out in October 2020 in the ScienceDirect, Web of science y PubMed databases by using the keywords, biocompatibility, cell viability, antimicrobial activity or antifungal effect. The PRISMA recommendations for systematic reviews were used. From thirteen full-text articles included about *in vitro* or *in vivo* studies shown that silver sulfide nanostructures inhibited Gram (+) and Gram (-) microorganisms such as, *S. aureus* and *E. coli*, respectively, regardless of size of nanoparticles. Quantum dots smaller than 5 nm of silver sulfide presented over 65% cell viability with fibroblasts or human cells. It is concluded that the antimicrobial activity and cell viability exhibited by the silver sulfide nanostructures do not show a dependence with size and concentration, but it could be used in biomaterials.

KEYWORDS: biocompatibility, metallic chalcogenide, microbial inhibition, silver sulfide.

RESUMEN: Actualmente nos enfrentamos a un panorama difícil por la marcada resistencia antibiótica a los agentes antimicrobianos existentes. Las infecciones microbianas representan una importante amenaza clínica por lo que es necesario buscar alternativas de nuevos agentes, realizando pruebas de sensibilidad microbiana y de biocompatibilidad. El objetivo de esta revisión es realizar una búsqueda sistemática sobre la actividad microbiana y la biocompatibilidad de

Recibido: 28 de diciembre de 2020.

Aceptado: 2 de febrero 2021.

[◇] Agradecimientos: a los proyectos PAPIIT-DGAPA IN115018 y PAPIIT-DGAPA IN112921.

* Universidad Nacional Autónoma de México, licenciatura en odontología, Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, León, Guanajuato, México.

** Universidad Nacional Autónoma de México, Posgrado en Ciencias Odontológicas, Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, León, Guanajuato, México.

*** Universidad Politécnica de Sinaloa, Unidad Académica de Ingeniería en Nanotecnología, Mazatlán, Sinaloa, México.

[†] Universidad Nacional Autónoma de México, Nanoestructuras y Biomateriales, Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León, León, Guanajuato, México.

Autora de correspondencia: carenas@enes.unam.mx



3. Participación en congresos



Escuela Nacional de Estudios Superiores
Unidad León



LABORATORIO DE Desarrollo de Biomateriales – y Servicios – Biotecnológicos



Campus León | División de Ciencias e Ingenierías

OTORGAN LA PRESENTE

CONSTANCIA

A:

**Edna Pamela Vilchis Valadez,
Ma. Concepción Arenas Arrocena**

Por su participación en el

SIMPOSIO DE BIOMATERIALES

2020 VIRTUAL

con el trabajo:

EFFECTO ANTIFÚNGICO DE UN MATERIAL ELÁSTICO TEMPORAL ENRIQUECIDO CON NANOPARTÍCULAS DE SULFURO DE PLATA EN CULTIVO CON CANDIDA ALBICANS

realizado el 11 de noviembre de 2020



DRA. LAURA SUSANA ACOSTA TORRES
Directora de la ENES
Unidad León.



DR. BIRZABITH MENDOZA NOVELO
Director del Departamento de Ingenierías Química,
Electrónica y Biomédica, UG.



La Sociedad Nacional de Investigadores en
Odontología A.C. y la Universidad Autónoma
del Estado de México

A través de la
Facultad de Odontología

OTORGA EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

A

Edna Pamela Vilchis Valadez, Paloma Netzayeli Serrano Díaz, Laura
Susana Acosta Torres, René García Contreras, Ma. Concepción
Arenas Arrocena.

por su **presentación oral** del tema:

EFFECTO ANTIFÚNGICOS Y CITOTÓXICO DE NANOPARTÍCULAS DE SULFURO DE
PLATA EN CULTIVO CON CANDIDA ALBICANS Y FIBROBLASTOS GINGIVALES
HUMANOS.

Durante el marco del XXVIII Encuentro Nacional y XIX
Iberoamericano de Investigación en Odontología.

Celebrado los días 18, 19 y 20 de noviembre de 2020.



DRA. EN C.S. EDITH LARA CARRILLO
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE ODONTOLÓGIA

CDR. AMAURY DE JESÚS POZOS GUILLEN
PRESIDENTE DE SNIO



Otorgan la presente

Constancia

A

Edna Pamela Vilchis Valadez

Por su Asistencia al

XXXII CONGRESO NACIONAL E INTERNACIONAL DE

Posgrado e
Investigación
EN ODONTOLOGIA | 2021

efectuado del 24 al 26 de mayo de 2021.

Valor Curricular de 15 horas crédito de Educación Continua, FO, UNAM

Folio 421240521229

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, 26 de mayo de 2021.


Dra. Elba Rosa Leyva Huerta
Directora
Facultad de Odontología, UNAM


Dr. Luis Pablo Cruz Hervert
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado e Investigación