



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---



## **FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

EFFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIVIRAL DE UN  
NANORECUBRIMIENTO DE ÓXIDO DE ZINC DEPOSITADO  
SOBRE TEXTILES DE POLIPROPILENO UTILIZADOS  
PARA LA FABRICACIÓN DE BARRERAS DE PROTECCIÓN  
PERSONAL.

### **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N A D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

ESMERALDA DE JESUS CASTILLO

TUTORA: Dra. ARGELIA ALMAGUER FLORES

ASESORA: Mtra. LORENA REYES CARMONA



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 y a la Facultad de Odontología.*

*A la Dra. Argelia Almaguer Flores por darme la oportunidad de trabajar con ella, por haber creído en mí para realizar este proyecto, por brindarme su tiempo y dedicación para la culminación del mismo.*

*A la Mtra. Lorena Reyes Carmona por dedicar su tiempo y confianza en mí, gracias por todos los consejos y por la asesoría en el laboratorio.*

*A la Dra. Sandra E. Rodill del Instituto de Investigación en Materiales (IIM) responsable del depósito del nanorecubrimiento de ZnO al textil de polipropileno, material utilizado para este trabajo.*

*El presente proyecto de investigación fue realizado gracias a los recursos otorgados por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, Clave IT201121*

## DEDICATORIAS

*A mis padres, gracias por su cariño y apoyo incondicional, sin ustedes esto no habría sido posible.*

*A mi hermana, por apoyarme cuando lo necesité. Este logro también es tuyo.*

*A Charly, tío gracias por tus consejos y por darme la oportunidad de dejarme adquirir experiencia en el consultorio.*

*A mis amigos Ariane, Ismael, Jimena, Karen, Karina, Paola. Gracias por haber hecho que mis días en la Facultad fueran maravillosos, sin duda ustedes forman parte de una de las etapas más bonitas de mi vida. Los quiero.*

.

*Orgullosamente UNAM.*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1. Control de infecciones en Odontología.....	2
2. Generación de aerosoles en la práctica odontológica.....	2
3. Microorganismos asociados a infecciones cruzadas o adquiridas en el consultorio dental.....	3
3.1 Bacterias.....	4
3.2 Hongos.....	7
3.3 Virus.....	7
4. Equipo de protección personal (EPP).....	9
5. Materiales con propiedades antimicrobianas.....	12
5.1 Óxido de zinc.....	13
6. Nanorecubrimientos.....	15
6.1 Aplicaciones en el área médica y odontológica.....	16
7. Bacteriófagos como surrogantes virales.....	16
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	19
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
<b>V. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	20
Evaluaciones antimicrobianas del nanorecubrimiento de ZnO.....	20
a. Ensayos antibacterianos.....	20
b. Ensayos antivirales.....	23
Análisis estadístico.....	25
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	25
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	29
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	32
<b>IX. REFERENCIAS</b> .....	33

## RESUMEN

**Introducción.** El equipo de protección personal (EPP) se creó principalmente para prevenir la transmisión de enfermedades infecciosas. Actualmente, los EPP carecen de actividad antimicrobiana por sí mismos, por lo que la contaminación con microorganismos patógenos como bacterias, hongos y virus continúa siendo un problema en hospitales y consultorios debido a la posible transmisión de estos microorganismos entre el personal de la salud y los pacientes.

**Objetivo.** El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto antibacteriano y antiviral del nanorecubrimiento de ZnO depositado sobre un textil de polipropileno (PP) mediante la técnica de contacto directo sobre dos bacterias aerobias y dos bacterias anaerobias y la técnica de filtrado de aerosoles sobre un surrogante viral.

**Materiales y métodos.** La evaluación antibacteriana se realizó mediante la técnica de contacto directo, utilizando las cepas aerobias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 43636) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y las cepas anaerobias *Actinomyces israelii* (ATCC 12102) y *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277). Se colocó una gota de la suspensión de cada una de las especies bacterianas sobre muestras de PP con y sin el nanorecubrimiento y se incubaron durante 24 h en condiciones aerobias o anaerobias según la especie. La viabilidad bacteriana se midió mediante el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFCs). Mientras que la evaluación antiviral se realizó utilizando el fago PaMx60 y la técnica de filtrado de aerosoles, donde se generó un aerosol contaminado con el bacteriófago que se hizo pasar a través del textil de PP con y sin el nanorecubrimiento. La evaluación de la capacidad infectiva del fago a su célula huésped se midió mediante el conteo de las unidades formadoras de placas líticas (UFPs) de su célula huésped *P. aeruginosa* 33 (ATCC 10752).

**Resultados.** Los resultados obtenidos en la técnica de contacto directo mostraron una inhibición de las bacterias aerobias del 77% en el caso de *P. aeruginosa* y del 99.3% en el caso de *S. aureus*. Mientras que las bacterias anaerobias presentaron una inhibición en su crecimiento del 70% para *A. israelii* y del 93% para *P. gingivalis*. Respecto a los resultados antivirales usando el bacteriófago PaMx60 encontramos que hubo una inactivación del virus de aproximadamente el 60% cuando el virus fue filtrado a través del polipropileno con el nanorecubrimiento.

**Conclusiones.** El nanorecubrimiento de ZnO depositado sobre textiles de PP fue efectivo para inhibir el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias tanto Gram positivas como Gram negativas. También mostró efectividad para disminuir la capacidad infectiva del bacteriófago PaMx60. Con estos resultados podemos considerar que tiene el potencial de ser utilizado como recubrimiento antimicrobiano para algunos EPP como cubrebocas, batas y gorros, para que la contaminación de estos equipos ayude a disminuir el riesgo de transmisión de enfermedades entre el odontólogo y los pacientes.

# **I. INTRODUCCIÓN.**

## **1. Control de infecciones en Odontología.**

Durante la práctica odontológica, el cirujano dentista y el paciente se exponen al contacto con microorganismos provenientes de los fluidos y aerosoles generados durante la consulta.

Los objetivos de un adecuado control de infecciones de acuerdo con organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1), Organización Panamericana de la Salud (OPS) (2), Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) (por sus siglas en inglés, Centers for Disease Control and Prevention) (3) y la Asociación Dental Americana (ADA) (4) son:

- Garantizar una práctica segura tanto para los trabajadores de la salud como para los pacientes.
- Evitar la transmisión de microorganismos potencialmente infecciosos dentro del consultorio odontológico.
- Disminuir los riesgos de infección y accidentes en la consulta.
- Cumplir con los requisitos legales, éticos y morales la práctica dental.

En los procedimientos dentales, la transmisión de patógenos depende principalmente de cuatro aspectos: a) el foco infeccioso (paciente/operador), b) forma de transmisión (sangre, saliva), c) vía de entrada del agente infeccioso (contacto directo con la sustancia infectada o con objetos contaminados sobre la piel o mucosa sana o erosionada y contaminación por aerosoles infectados) y d) susceptibilidad individual (estado nutricional, enfermedad, medicación, herencia, etc.) (5).

## **2. Generación de aerosoles en la práctica odontológica.**

Diversos procedimientos odontológicos producen aerosoles y gotitas que pueden contener diversos microorganismos como bacterias, hongos y virus provenientes de los fluidos del paciente, como saliva, sangre y otras secreciones, lo que representa un riesgo potencial para el odontólogo y el paciente (6, 7).

Los aerosoles se pueden definir como partículas húmedas que permanecen en el ambiente durante minutos, horas o días y que son capaces de causar infecciones de manera directa (cuando son inhalados), o de manera indirecta (cuando las partículas contaminadas quedan sobre las superficies). La distancia a la que pueden llegar y el

tiempo que pueden permanecer los aerosoles en el aire variará de su tamaño, la humedad del ambiente, así como la velocidad y el flujo del aire (8).

Por ejemplo, al producirse gotas grandes ( $>5 \mu\text{m}$ ), éstas serán las primeras en depositarse en una superficie y pueden alcanzar hasta 1 metro de distancia. Mientras que los aerosoles que involucran partículas más pequeñas de  $5 \mu\text{m}$ , pueden llegar a más de 1 metro de distancia y pueden permanecer suspendidas en el ambiente durante horas (9).

El control de la generación de aerosoles es disminuir la concentración de gotas infecciosas y evitar su transmisión aérea, esto es particularmente importante en ambientes cerrados y sin buena ventilación (10). El odontólogo enfrenta un riesgo particular de infección, ya sea por la contaminación de superficies con saliva que podrían ocasionar una posible infección cruzada y por el contacto con gotitas contaminadas y aerosoles generados durante los procedimientos de atención dental (11).

### **3. Microorganismos asociados a infecciones cruzadas o adquiridas en el consultorio dental.**

La cavidad oral es un ecosistema complejo, donde habitan una gran cantidad de microorganismos como bacterias, hongos y virus tanto en las superficies bucales (encía, dientes, paladar, lengua, carrillos) como en los fluidos como la saliva y el fluido crevicular. Cualquier procedimiento dental que tenga el potencial para producir aerosoles que provengan de la cavidad oral, tiene el potencial de ocasionar la transmisión de alguno de estos microorganismos e incluso causar infecciones cruzadas (12, 13).

Se ha reportado con mayor frecuencia en la literatura científica, la transmisión de enfermedades de origen viral; por ejemplo, en el año 2002, se reportó en Nuevo México un caso de transmisión de hepatitis B entre dos pacientes a los que se les realizó una cirugía oral. Al consultorio llegó una paciente con hepatitis B crónica quien fue atendida en las primeras horas de la mañana y de alguna manera, otra paciente atendida 2 horas después, adquirió esta infección al tener algún contacto con la sangre o fluidos de la paciente anterior (14).

En un artículo se reporta que un cirujano dentista con VIH transmitió el virus a 5 pacientes que se sometieron a procedimientos odontológicos realizados por él. Los análisis moleculares del virus que presentaban estos cinco pacientes infectados, mostraron secuencias de nucleótidos y patrones característicos de aminoácidos relacionados con el virus que tenía el dentista. Por lo que la epidemiología y los datos de laboratorio, indicaron



que estos cinco pacientes se habían infectado durante su atención dental (15). El modo preciso de transmisión del VIH a estos pacientes no pudo ser identificado; sin embargo, los pacientes podrían haber sido directamente expuestos a la sangre del dentista como resultado de lesiones percutáneas sufridas por el dentista durante la realización de procedimientos los dentales, como ha sido documentado (16).

Aunque la transmisión o contaminación de otros microorganismos que pueden estar presentes en el consultorio dental como bacterias y hongos, no ha sido muy documentada, a continuación se describen algunos de los microorganismos más relevantes que pueden ocasionar infecciones cruzadas en el consultorio dental.

### **3.1 Bacterias.**

Las bacterias son microorganismos procariontes unicelulares que tienen un tamaño variable entre 0.5 a 5  $\mu\text{m}$ . Tienen diversas morfologías como esferas ó cocos, bastones ó bacilos y espirales ó espiroquetas y algunos con morfologías pleomórficas. Algunas bacterias pueden tener movilidad y otras no (17). Son los organismos más abundantes del planeta, ya que se estima que puede haber hasta 40,000,000 de ellas en un gramo de tierra y 1,000,000 de bacterias en un mililitro de agua dulce (18, 19).

La cavidad oral es un ecosistema dinámico que comprende una variedad de comunidades microbianas, incluidas muchas especies patógenas u oportunistas (20). La microbiota oral comprende el conjunto de microorganismos que se encuentran en la cavidad oral y zonas contiguas, es la segunda microbiota con mayor diversidad en el cuerpo humano, albergando a más de 700 especies diferentes de bacterias reconocidas hasta ahora que en condiciones normales de salud se encuentran en un estado simbiótico. Cuando se rompe este equilibrio, se produce la disbiosis lo cual posibilita que las bacterias que provocan enfermedades se manifiesten y causen enfermedades como caries, gingivitis y periodontitis (21).

Algunos de los géneros bacterianos de importancia médica y odontológica son:

#### *Streptococcus.*

Son bacterias Gram positivas de forma esférica con dimensiones de 0.5 a 2  $\mu\text{m}$ . Son células esféricas u ovoides que se encuentran en parejas o en cadenas, no tienen

motilidad, son homofermentadoras (produce fundamentalmente lactato), no esporuladas y su requerimiento de oxígeno es facultativo (17).

Son clasificadas, típicamente, de acuerdo a sus capacidades de hemólisis como  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  y mediante los antígenos que presentan en su pared celular (clasificación de Lancefield) (22).

Muchas especies de *Streptococcus* son parte de la microbiota comensal presente en las superficies mucosas de humanos y animales, las cuales generalmente no causan ningún daño, pero prácticamente todas las especies comensales de *Streptococcus* son patógenos oportunistas, principalmente si logran tener acceso al flujo sanguíneo desde la cavidad oral o los intestinos (23). Algunas especies pueden causar infecciones como escarlatina, algunos tipos de neumonía y faringitis, y se transmiten por vía aérea en hospitales, escuelas y lugares públicos donde pueda haber grandes aglomeraciones (24).

#### *Staphylococcus aureus.*

Es una de las tres especies más importantes del género *Staphylococcus* y uno de los principales patógenos que infectan al ser humano. Son microorganismos Gram positivos de forma esférica, aproximadamente de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro que tienden a agruparse en forma de racimos de uvas y cuyas colonias presentan típicamente una coloración amarillenta o dorada (25). Son aerobios, catalasa positivos, oxidasa negativos y fermentan carbohidratos. Se localizan en la piel y las mucosas del ser humano, aunque también se ha detectado en animales, alimentos contaminados, superficies de objetos inocuos, en el suelo, agua y también se pueden encontrar suspendidos en el aire (26). Las infecciones asociadas a *S. aureus* en el ser humano pueden ocasionar infecciones piógenas en piel y otros padecimientos como osteomielitis y artritis séptica. La transmisión de esta bacteria se produce por contacto directo y puede causar una gran diversidad de enfermedades a nivel hospitalario como abscesos, neumonía, empiema, endocarditis, pericarditis y meningitis (27).

#### *Pseudomonas aeruginosa.*

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo aerobio Gram negativo. No requiere de muchos nutrientes y puede crecer en rangos de temperatura de 4 hasta 42°C (28). Es considerada una bacteria oportunista y letal que prolifera en personas inmunocomprometidas; causante de infecciones a nivel sistémico, que a menudo resultan en hospitalización, y más frecuentemente, ponen en peligro la vida. *P. aeruginosa* se

puede aislar de una variedad de fuentes como equipo de terapia respiratoria, fregaderos, trapeadores, y piscinas de fisioterapia (29).

### *Actinomyces.*

Son bacilos Gram positivos que presentan un lento crecimiento (4 a 10 días) bajo condiciones microaerófilas o estrictamente anaerobias y que miden de 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$ .

Diversas especies del género *Actinomyces* son habitantes normales en áreas del tracto intestinal desde la bucofaringe hasta el colon. Están bien adaptados a las superficies mucosas y no producen enfermedad a menos que traspasen la barrera epitelial (17).

Los *Actinomyces* comprenden el grupo más abundante de especies presentes en la biopelícula dental y se han identificado tanto en la placa supragingival como en la subgingival (30).

### *Porphyromonas gingivalis.*

Pertenece al género bacteriano *Porphyromonas* que incluye a las especies *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas assacharolytica* y *Porphyromonas endodontalis*.

*P. gingivalis* es un bacilo corto Gram negativo, mide de 0.5-0.8  $\mu\text{m}$  x 1-3.5  $\mu\text{m}$ , posee abundantes fimbrias, no tiene flagelos y no es esporulado. Es anaerobio facultativo por lo que puede tolerar altos niveles de oxígeno disuelto, siempre y cuando posea las enzimas necesarias para la desintoxicación de radicales de oxígeno. Estas enzimas, superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasa, son capaces de proporcionar esta protección. Las colonias son inicialmente de color blanco a color crema. Con el tiempo (4-8 días), se oscurecen del borde hacia el centro y una de color rojo oscuro a negro (31, 32).

Es una bacteria periodontopatógena, localizada principalmente en el surco gingival y de forma específica cuando hay lesiones periodontales avanzadas; pero puede encontrarse en el dorso de la lengua, amígdalas y saliva. Es considerado un patógeno que se encuentra presente en: gingivitis, pulpitis, abscesos periodontales y periapicales. Su principal acción es la degradación de los tejidos periodontales y la progresión de algunos tipos de periodontitis (33).

### **3.2 Hongos.**

Los hongos son células eucariontes, de respiración aerobia. Tienen la capacidad de vivir en diferentes ambientes; ya que se pueden establecer en la tierra, agua y también pueden estar presentes en el aire. Se consideran organismos heterótrofos ya que dependen de la materia orgánica sintetizada por otros organismos ricos en energía y producen enzimas para absorberlos. Su forma de reproducción es sexuada y asexuada y producen estructuras reproductivas denominadas esporas y conidios (esto es importante para identificar la morfología de los hongos) (34). El género de hongos de mayor importancia odontológica es el género *Candida*.

#### *Candida albicans.*

Es el hongo más común en la cavidad oral. Es un hongo dimórfico, es decir, bajo ciertas circunstancias puede presentar una estructura de forma ovoidal llamada levadura, mientras que en otras condiciones, forma estructuras filamentosas denominadas hifas o pseudohifas.

*C. albicans* forma conidias con capacidad infectiva, las cuales son como esporas sostenidas en la punta de la hifa, que pueden diseminarse por agua y (35).

Esta especie se considera parte de la microbiota normal de los seres humanos, sin embargo, cuando ocurre un cambio en la homeostasis del hospedero, se convierte en un patógeno oportunista causando candidiasis ya sea oral o en el sitio anatómico donde se encuentre proliferando (36).

### **3.3 Virus.**

Un virus es una partícula infecciosa que consta de un núcleo o core que contiene un ácido nucleico (DNA o RNA) empacado en un recubrimiento hecho de proteínas llamado cápside. Se sabe que algunos virus tienen una membrana lipídica de doble capa externa a la cápside llamada envoltura. Los virus son aproximadamente 100 a 1000 veces más pequeños que las células a las que infectan, y varían en tamaño de 20 a 300 nm de diámetro (37).

Para replicarse, un virus debe infectar a una célula para poder usar sus componentes y fabricar copias de sí mismo, lo que causa daño en el organismo hospedero. Los virus son diversos, y tiene la capacidad de infectar arqueas, bacterias, hongos, plantas y animales, incluyendo a los seres humanos (38).

Algunos de los virus más relevantes en el área odontológica son:

*Virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (VIH/SIDA).*

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece a la familia *retroviridae* (retrovirus). Es el virus causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (39). El VIH es un virus con un RNA de cadena sencilla, que tiene la capacidad de transcribir su genoma a DNA en la célula hospedera, mediante una enzima llamada transcriptasa inversa que permite que el virus se integre al material genético de las células infectadas (40).

El VIH puede transmitirse de diversas maneras, ya sea por vía sexual, contacto con sangre, o transmitirse de madre a hijo a través de la placenta o de la leche materna (38). Una persona con VIH tiene SIDA cuando desarrolla infecciones y enfermedades oportunistas como: sarcoma de Kaposi, candidiasis traqueal, bronquial o pulmonar, ciertos tipos de linfomas, tuberculosis pulmonar e infección por micobacterias, entre otras (40).

*Coronavirus.*

El virus del síndrome respiratorio agudo severo tipo-2 (SARS-CoV-2), causante de COVID-19, se encuentra taxonómicamente en la familia *Coronaviridae*. Los coronavirus suelen causar enfermedades respiratorias leves (entre el 10 - 30% de los casos de resfriado común).

La morfología de los coronavirus es esférica irregular y tienen un tamaño aproximado de 125 nm. Tienen una envoltura lipídica con tres proteínas ancladas a ella denominadas E (envoltura), M (membrana) y S (del inglés, spike, o espícula). Esta última proteína, es la que le da al virus la apariencia de una corona, y es la proteína que media la unión al receptor y facilita su fusión con la membrana celular (41).

El virus causante de la COVID-19 se puede transmitir por contacto directo y, de forma indirecta, por contacto con objetos, materiales y superficies contaminadas. Su transmisión aérea es posible cuando se efectúan procedimientos o tratamientos que pueden generar aerosoles (42).

Los síntomas de personas con COVID-19 varían desde leves (fiebre, tos, fatiga, dolor de cabeza y garganta, entre otros), hasta quienes se enferman gravemente (dificultad para respirar y pérdida de la oxigenación). Estos síntomas pueden surgir de 2 a 14 días después estar expuesto al virus (43).

### *Virus del herpes simple (HSV).*

El virus del herpes simple (HSV) es un virus cuyo huésped natural es el ser humano. El HSV pertenece a la familia de virus *herpesviridae*. Se divide en dos tipos: virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) asociado a lesiones faciales y bucales, virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2) asociado principalmente a lesiones genitales, es uno de los agentes transmitidos por vía sexual más frecuentes. Posee una cápside icosaédrica de 162 capsómeros, el genoma del virus es de 120 a 250kbp y está constituido por DNA bicatenario y lineal, la envoltura está construida por una membrana lipídica con espículas de glicoproteínas (44).

Los pacientes infectados con virus de herpes simple tipo 1 y 2 experimentan una infección primaria inicial seguida por un estado de latencia. La mayoría de los casos de infección inicial por herpes no producen lesiones clínicas evidentes, por ello la mayoría de los pacientes desconocen que el virus ha entrado a su organismo. El virus atraviesa la barrera mucosa y debido a que el virus es neurotrópico, infecta los nervios periféricos donde puede permanecer latente y pueden pasar años antes de ser diagnosticado (45).

### *Virus de la hepatitis B (HBV).*

La hepatitis B (HBV) es causada por un virus del género *Orthohepadnavirus* que pertenece a la familia *Hepadnaviridae*, el cual comprende varios virus que ocasionan infecciones hepáticas persistentes y cáncer hepático. Su virión denominado partícula Dane, es esférico de un tamaño aproximado de 40 nanómetros (nm), con una envoltura o cubierta lipídica que contiene diferentes proteínas víricas (lipoproteica). El HBV puede causar una enfermedad aguda que puede durar varias semanas y cuyos síntomas son: ictericia, orina oscura, dolor abdominal, náuseas, vómitos y fatiga extrema (33).

El virus de la hepatitis puede estar presente en todos los fluidos corporales del paciente infectado y su transmisión está relacionada con una alta concentración de partículas virales. Un ejemplo es el contacto con sangre o saliva contaminada con el virus en escenarios de atención médica y odontológica (46).

## **4. Equipo de protección personal (EPP).**

En el área de la salud el EPP es el equipo destinado a ser llevado o sujetado por el personal médico u odontológico para protegerse durante un procedimiento médico o dental. Este equipo de protección personal está conformado principalmente por (47, 48):

- Bata impermeable o repelente. Este tipo de bata debe ser resistente a los líquidos y de manera ideal debe contar con un nivel 4 de protección. Esto significa que debe resistir la penetración de virus y de líquidos con presión hidrostática. Debe tener un ajuste elástico en las muñecas y una longitud que cubra por debajo de las rodillas y la parte posterior del usuario.



**Figura 1.** Bata quirúrgica. (<https://goo.su/uUBhG>)

- Cubre bocas quirúrgico de triple capa. Está elaborado con dos capas externas de tela, tiene un filtro intermedio de polipropileno y un ajuste nasal moldeable. Debe ser desechable, hipoalergénico y resistente a fluidos.



**Figura 2.** Cubrebocas quirúrgico. (<https://goo.su/23RRxz9>)

- Respirador N95. Debe cumplir con eficiencia de filtración mínima de 95% y debe tener protección contra bioaerosoles y partículas menores a 0.3  $\mu\text{m}$ . Debe ser hipoalergénico, resistente a fluidos y antiestático, con un ajuste nasal que impida el paso del aire alrededor de toda la mascarilla, y ajuste elástico a la cabeza.



**Figura 3.** Cubrebocas KN95. (<https://goo.su/EEW0>)

- Gorro. Debe ser impermeable a la penetración de aerosoles y fluidos, también debe ser resistente a la tensión. Debe contar con un elástico para ajustar alrededor de la cabeza. Este aditamento es importante para proteger el cabello y evita que se enrede en los equipos médicos y odontológicos como motores eléctricos, piezas de mano u otros.



**Figura 4.** Gorro quirúrgico. (<https://goo.su/zn6d>)

- Guantes. Los guantes deben contar con acabado liso y debe estar libre de irregularidades. Los más comunes están hechos de látex o de nitrilo para la exploración. Deben ser desechables y cubrir mínimo cinco centímetros por debajo de la muñeca.



**Figura 5.** Guantes desechables. (<https://goo.su/knMG>)

- Gafas de seguridad. Tienen la función de proteger párpados y ojos de salpicaduras y objetos punzocortantes. Deben de ser ergonómicas, con armazón de vinil, lente transparente, con un puente nasal de silicona.



**Figura 6.** Gafas de seguridad. (<https://goo.su/Xmf1sJ>)



El utilizar correctamente el equipo de protección personal es un punto importante para evitar la contaminación microbiana dentro de hospitales y el consultorio dental, ya que la contaminación puede darse entre colegas, pacientes y población en general.

## **5. Materiales con propiedades antimicrobianas.**

Los agentes antibacterianos de origen inorgánico tales como metales y óxidos metálicos, presentan diversas ventajas debido bioseguridad y estabilidad . De los materiales que han demostrado tener propiedades antimicrobianas podemos encontrar a la plata (Ag), el cobre (Cu), y óxidos metálicos como, el óxido de zinc (ZnO), dióxido titanio (TiO<sub>2</sub>) y óxido de hierro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (49).

Plata (Ag). La plata es un metal de transición brillante, resistente, dúctil y maleable, de todos los metales tiene la conductividad térmica y eléctrica más alta. Tiene múltiples aplicaciones en diversas áreas, siendo la actividad antimicrobiana una de las más importantes en el área médica. Presenta un buen efecto antibacteriano en contra de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y Gram positivas como *S. aureus* (50). Por otra parte, se ha estudiado que cuando la plata se encuentra en tamaños nanométricos (ej. nanopartículas de plata), aumenta su efecto bactericida sobre los microorganismos (51).

Cobre (Cu). Es un metal de transición de color anaranjado de brillo metálico. Además de ser un micronutriente esencial importante en la salud y nutrición de las plantas, el cobre fue reconocido en 2008 por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) (por sus siglas en inglés, Environmental Protection Agency), como el primer agente antimicrobiano metálico. Esto llevó a muchas investigaciones sobre las diversas propiedades del cobre y sus compuestos como agentes antibacterianos, antifúngicos y antivirales. Se ha reportado que las propiedades antimicrobianas del Cu en tamaño nanométrico, son más eficientes que las exhibidas por las partículas de Cu de tamaño micrométrico. Además, existen reportes que los nanomateriales de cobre causan el efecto denominado "muerte por contacto o contact killing" en diversas especies bacterianas. Se ha probado que tiene efecto antimicrobiano en contra de *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, y *S. aureus* y (52, 53).

Óxido de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). Es un óxido muy estable, que se encuentra en la naturaleza como el mineral hematita  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Puede tener diferentes tonalidades de color las cuales van desde el amarillo, ocre y marrón. El óxido de hierro puede también ser usado en la industria de la construcción, ya que se utiliza para darle color al cemento. Es un componente fundamental en la fabricación de pinturas e impermeabilizantes decorativas y diferentes tipos de recubrimientos. Las nanoestructuras de este óxido adoptan diferentes formas como son; nanoalambres, nanotubos, nanoesferas, entre otros (54).

Se ha reportado su efecto bactericida contra *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, entre otras especies. Debido a los diferentes estudios de citotoxicidad, se ha propuesto su probable uso en la bioremediación del ambiente y la limpieza del agua, así como su uso en el área biomédica (55).

Dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ). Es un compuesto mineral que se encuentra en la naturaleza en tres diferentes estructuras cristalinas polimórficas: brookita, rutilo y anatasa. Su punto de fusión y de ebullición son extremadamente altos, de tal manera que se encuentra en estado sólido y es insoluble en agua. El  $\text{TiO}_2$  también es un semiconductor. Su color es de un blanco puro gracias a su manera de absorber los rayos ultravioleta. Debido a su coloración, tanto el material en bulto como en tamaño nanométrico se utilizan en pigmentos farmacéuticos, cosméticos y productos para el cuidado de la piel como protectores solares y pastas dentales (56).

El  $\text{TiO}_2$  aporta a la superficie características fotocatalíticas en presencia de radiación UV, en el que se desarrollan radicales de oxígeno y moléculas de oxígeno monoatómicas y triatómicas, que se convierten en promotores de la acción antibacteriana. Esta propiedad fotocatalítica ha sido bien estudiada en contra de microorganismos como *E. coli* (57).

## **5.1 Óxido de zinc.**

El óxido de zinc es un compuesto de color blanco, sedoso que posee una densidad de  $5.60 \text{ gr/cm}^3$  y un peso molecular de 81.4. Es insoluble en agua y es soluble en ciertas disoluciones de bases fuertes y ácidas. Tiene un diámetro de partícula entre 0.5 y 0.6 micras.

Desde la vista estructural, el ZnO está formado por un átomo de zinc y uno de oxígeno. Se obtiene por oxidación de vapor de zinc metálico a elevadas temperaturas (58).

El óxido de zinc tiene una elevada conductividad térmica, bajo coeficiente de dilatación y un alto punto de fusión, lo que permite su uso para ciertas aplicaciones industriales como la industria del caucho en donde grandes masas de caucho se someten a condiciones extremas de calor en la que implican flexiones y distorsiones. También se utiliza en la industria cerámica, específicamente en la fabricación del vidrio, en esmaltes de porcelana y en cristales ya que las propiedades térmicas de estos productos proporcionan una buena conductividad calorífica, reduciendo las roturas gracias a su bajo coeficiente de dilatación (58). En agricultura, el óxido de zinc se utiliza para el tratamiento de muchas enfermedades que afectan a las plantas, y se adiciona en cantidades considerables a fertilizantes comerciales.

En el área de cosméticos y productos farmacéuticos, el ZnO se encuentra en cremas contra las quemaduras, polvos faciales, esmalte de uñas, polvos higiénicos entre otros. La presencia del óxido de zinc en productos cosméticos tiene efectos protectores sobre los rayos del sol, prolonga la eficacia de los perfumes y desodorantes (59).

En odontología, los cementos que contienen óxido de zinc son utilizados como base de cavidades, recubrimientos pulpares, cementación de prótesis y material de restauración. El uso del ZnO se debe a su bajo costo, fácil manipulación y remoción, así como, a sus propiedades antibacterianas y sedantes (60).

El óxido de zinc es blanco a la luz visible pero negro a la luz ultravioleta. Esta característica es importante en las propiedades fotoquímicas, fotoconductoras y luminiscentes lo que lo hace adecuado para ser utilizado en una amplia gama de dispositivos, como: sensores de gases, fotocatalizadores, celdas solares, y espejos térmicos, entre otras (61).

La actividad antimicrobiana de ZnO es una consecuencia de su contacto directo con la pared celular de los microorganismos. El daño se genera cuando se adhiere electrostáticamente a la envoltura bacteriana, ya que su carga positiva facilita la unión a la superficie de las bacterias cargada negativamente. Una vez unido, la integridad de la membrana bacteriana es afectada debido a un cambio del potencial y despolarización de los lípidos de la membrana (62). Otro mecanismo, es la inhibición del transporte activo y la afectación del metabolismo de los aminoácidos y del sistema enzimático por la liberación de iones  $Zn^{2+}$ . Por último, la generación de especies reactivas de oxígeno o ROS (63). El efecto antimicrobiano del óxido de zinc en su tamaño nanométrico suele mostrarse significativamente más pronunciado en bacterias Gram positivas que sobre las Gram negativas. Varios estudios han demostrado la actividad antimicrobiana contra los

microorganismos como; *S. aureus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Shigella flexneri* (64).

## 6. Nanorecubrimientos.

Un nanorecubrimiento es una película delgada de dos dimensiones y su tamaño es menor a 100 nm. Estos nanorecubrimientos pueden exhibir propiedades como; resistencia a la corrosión, aislamiento térmico, eléctrico, cambios en la hidrofobicidad de la superficie que recubren, así como también cambios en la conductividad eléctrica, entre otras. Esto se debe al confinamiento de los electrones en un volumen limitado, pero también a que en los materiales nanoestructurados la relación superficie-volumen se incrementa exponencialmente con la disminución del tamaño de partícula (65).

Los nanorecubrimientos tienen aplicación en diversas industrias (66), la **tabla 1** muestra algunos ejemplos de esto.

**Tabla 1.** Aplicación industrial de los nanorecubrimientos.

Industria	Ejemplos
Cosmética	Cremas solares, lentes de contacto.
Automotriz	Revestimientos exteriores de automóviles para mejorar la resistencia a los arañazos y a la abrasión.
Médica y farmacéutica	Liberación controlada de fármacos, sustitutos óseos, medicamentos, medicina regenerativa, implantes de rodilla y cadera.
Textil	Tejidos con superficie nanoestructurada repelente, productos textiles antimicrobianos.
Construcción	Modificación de pinturas y barnices con nanopartículas, pegamentos rápidos basados en nanopartículas de ferrita, nanocompuestos poliméricos de arcilla para el reciclaje de PET.
Energía	Baterías de ion-litio, células solares flexibles, pilas de combustible.

## **6.1 Aplicaciones en el área médica y odontológica.**

En el área médica y odontológica la utilización de los nanorecubrimientos representa un campo potencial para el desarrollo de nuevos revestimientos de superficies que eviten la adhesión microbiana y así poder reducir la formación de biopelícula en dispositivos médicos, ortopédicos y aditamentos para el tratamiento de heridas, entre otros (67). Por ejemplo, implantes de titanio con nanorecubrimientos y superficies nanoestructuradas que favorecen la unión del tejido óseo a la superficie del implante (osteointegración) (68).

Respecto a su potencial para eliminar o disminuir la presencia de microorganismos sobre las superficies de aditamentos de uso médico y odontológico, los nanorecubrimientos han demostrado tener una gran efectividad contra diversas especies de bacterias, hongos y virus (69).

Los nanorecubrimientos tienen mecanismos de acción antimicrobiana diferentes a los antibióticos tradicionales, lo que los hace una alternativa ante la creciente resistencia a los agentes antimicrobianos tradicionales. Diferentes estudios han llevado a proponer que estos materiales en forma nanométrica destruyen los microorganismos principalmente por tres mecanismos (70).

El primer mecanismo tiene que ver con la liberación gradual de iones metálicos los cuales inhiben la producción de ATP (adenosín trifosfato) y la duplicación del DNA (71).

En el segundo mecanismo, los iones metálicos presentes en los nanorecubrimientos son liberados y absorbidos a través de la membrana, alterando el pH. Esto genera daños fisiológicos, afectaciones en la estructura celular y en la actividad enzimática (72).

En el tercer mecanismo, está involucrada la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales generan estrés oxidativo y muerte celular (73).

## **7. Bacteriófagos como surrogantes virales.**

Los bacteriófagos o fagos, son virus que infectan específicamente a bacterias, además de ser las entidades biológicas más abundantes en el planeta Tierra y encontrarse en diversos sitios como; heces fecales, animales, suelo y agua, entre otro. Como todos los virus, los bacteriófagos carecen de metabolismo propio y tienen la capacidad de replicarse dentro de su célula huésped; debido a estas características, pueden ser utilizados como modelos surrogantes de los virus que infectan células eucariontes (74).

### *Estructura y morfología.*

Los fagos pueden contener DNA o RNA, pero no ambos. Estos ácidos nucleicos pueden contener bases modificadas, las cuales sirven para protegerlos de las endonucleasas (enzimas que cortan los ácidos nucleicos de la célula hospedera durante la infección). Los fagos más simples contienen un material genético más corto (aprox. de 3-5 productos génicos), mientras que el material genético de los fagos más complejos, puede codificar para más de 100 productos génicos (33, 75).

### Características morfológicas de los bacteriófagos.

**Tamaño.** La mayoría de los fagos tienen un tamaño de entre 24-200 nm.

**Cabeza o Cápside.** En general, los fagos poseen una estructura a manera de cabeza con diferentes tamaños y formas. La cabeza o cápside está compuesta de muchas copias de una o más proteínas diferentes. Al interior de la cabeza se encuentra el ácido nucleico. La cabeza actúa como una cubierta protectora para el ácido nucleico.

**Cola.** La cola de los fagos es una estructura tubular hueca a través de la cual el ácido nucleico pasa durante la infección. Su tamaño de la cola puede variar e incluso estar ausente en algunos fagos. Esta cola está involucrada en la unión de los fagos a su célula huésped bacteriana.

**Forma.** Algunos fagos se encuentran en forma icosaédrica (20 caras) otros son filamentosos (76).

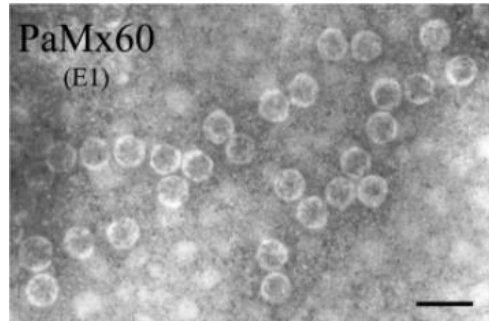
Los ciclos replicativos de los bacteriófagos al igual que los demás virus pueden dividirse en; ciclo lítico y ciclo lisogénico.

**Ciclo lítico del fago.** El bacteriófago toma el control de la célula, reproduce nuevos fagos y destruye la célula. Después de la adhesión del bacteriófago a la célula huésped, el material genético del fago ingresa a ella, posteriormente iniciando su proceso de multiplicación. Pasado un tiempo, la bacteria se rompe (lisis) liberando los fagos al medio (77).

Por otra parte, en el ciclo lisogénico los fagos en lugar de matar al huésped, el genoma del fago se integra en el cromosoma bacteriano. El genoma integrado del fago se llama profago (por que posee el potencial para producir fagos). A medida que la bacteria replica su cromosoma, también replica el DNA del fago y lo transmite a nuevas células hijas durante la reproducción con la posibilidad de poder alterar el fenotipo de la bacteria (78).

### Bacteriófago PaMx60.

El bacteriófago PaMx60 es un fago de RNA monocatenario icosaédrico, perteneciente a la familia *Leviviridae* con un diámetro de 25-27 nm. Cabe mencionar que, comparte muchas características con el bacteriófago MS2, como morfología, tamaño y tipo de ácido nucleico, entre otras. Por ello, PaMx60 puede ser utilizado como un sustituto del surrogante viral MS2 para representar un modelo de virus respiratorio (79) (**Figura 7**).



**Figura 7.** Microfotografía del fago PaMx60.

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.**

A lo largo de los años, los EPP se han optimizado para prevenir la transmisión de diversas enfermedades infecciosas. Sin embargo hasta la fecha, los EPP no tienen propiedades antimicrobianas por sí mismos, por lo que la contaminación de estos equipos con microorganismos patógenos como bacterias, hongos y virus continúa siendo un problema importante de salud pública.

En este proyecto, se propone evaluar la capacidad antibacteriana y antiviral de un nanorecubrimiento de ZnO depositado sobre un textil de polipropileno, con el que se elaboran cubrebocas de uso quirúrgico. La finalidad de este estudio, es que el nanorecubrimiento de ZnO pudiera colocarse en EPP como cubrebocas, gorros y batas, entre otros, y que no solo actúe de protección como barrera física, sino que también tenga la capacidad de eliminar los microorganismos que puedan estar presentes cuando se realicen procedimientos dentales que involucren fluidos y aerosoles.

## **III. HIPÓTESIS.**

El nanorecubrimiento de ZnO depositado sobre un textil de polipropileno tiene capacidad antibacteriana y antiviral.

## **IV. OBJETIVOS.**

Evaluar el efecto antibacteriano y antiviral del nanorecubrimiento de ZnO depositado sobre un textil de polipropileno (PP-ZnO).

### **Objetivos específicos.**

1. Evaluar el efecto antibacteriano del nanorecubrimiento PP-ZnO sobre dos bacterias aerobias (*P. aeruginosa*, *S. aureus*) y dos bacterias anaerobias (*A. israelii*, *P. gingivalis*), utilizando la técnica por contacto directo.
2. Evaluar el efecto antiviral del nanorecubrimiento PP-ZnO contra un surrogante viral (bacteriófago PaMx60), utilizando la técnica de filtrado de aerosoles.



## V. DISEÑO EXPERIMENTAL.

El presente proyecto de investigación fue un estudio experimental *in vitro* donde se evaluó la capacidad antibacteriana y antiviral de un nanorecubrimiento de ZnO depositado mediante la técnica de magnetron sputtering, proporcionado por el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM (IIM, UNAM). Los ensayos biológicos que se realizaron para la evaluación antibacteriana y antiviral del nanorecubrimiento de ZnO se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biointerfases de la DEPeI, FO, UNAM.

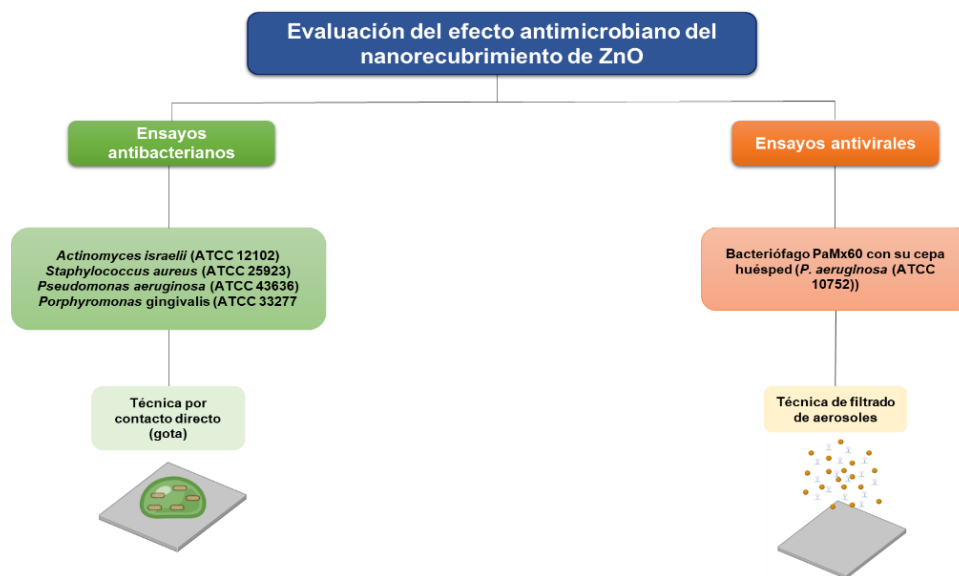


Figura 8. Secuencia experimental del estudio.

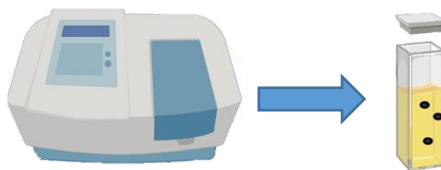
### Evaluaciones antimicrobianas del nanorecubrimiento de ZnO.

#### a) Ensayos antibacterianos.

Se utilizaron dos especies bacterianas aerobias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) y dos especies bacterias anaerobias (*Actinomyces israelii*, *Porphyromonas gingivalis*).

Las bacterias aerobias se cultivaron individualmente en placas de Petri con agar TSA (Trypticase Soy Agar (BBL, Becton-Dickinson) y se incubaron a 37 °C, durante 24 h. Mientras que las bacterias anaerobias se cultivaron en placas de agar HK enriquecido (Brain Heart Infusion Agar (BBL, Becton-Dickinson), Trypticase Soy Agar (BBL, Becton, Dickinson), Yeast extract (BBL, Becton, Dickinson), suplementadas con 5 µg/mL de hemina (Sigma-Aldrich), 0.3 µg/mL de Menadiona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y 5% de

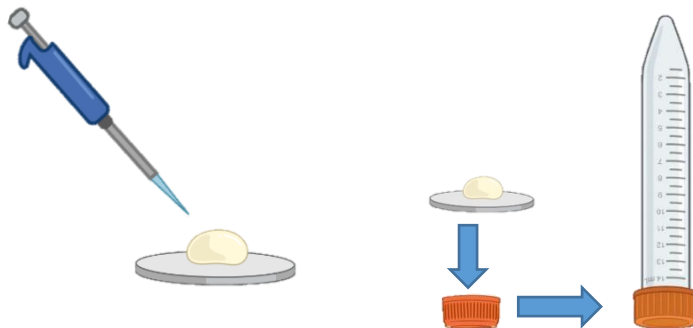
sangre de cordero desfibrinada (Microlab)) y se incubaron durante 7 días a 35 °C en condiciones anaerobias. Tras el periodo de incubación y una vez que se confirmó la pureza de cada una de las cepas bacterianas, éstas fueron recolectadas en tubos individuales con caldo de cultivo TSB (Trypticase Soy Broth (BBL, Becton-Dickinson) o caldo de *Mycoplasma* enriquecido (Brain Heart Infusion Agar (BBL, Becton-Dickinson), suplementado con 10 µg/mL de peptona (Sigma-Aldrich), 5 µg/mL de cloruro de sodio (Sigma-Aldrich)), dependiendo de las cepas. Posteriormente, se realizó la medición de la densidad óptica (OD) de cada cepa y se ajustó a 1 a  $\lambda = 600$  nm en un espectrofotómetro (BioPhotometer D30, Eppendorf), para obtener una suspensión bacteriana con  $1 \times 10^9$  células/mL (**Figura 9**).



**Figura 9.** Ajuste de densidad óptica (OD) de cada bacteria.

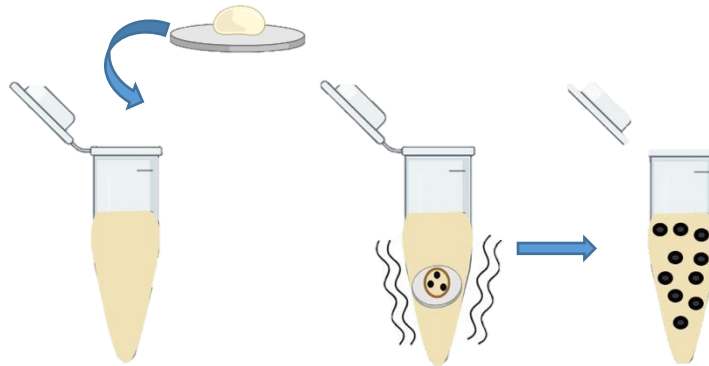
#### *Evaluación por contacto directo (gota).*

Para la evaluación de la efectividad antibacteriana del nanorecubrimiento de ZnO por medio de contacto directo, se sembró una gota de 40 µL ( $4 \times 10^7$  UFCs/mL) de cada bacteria sobre discos de 1 cm de diámetro de polipropileno (PP) y discos de polipropileno con el nanorecubrimiento de ZnO (PP-ZnO). Una vez colocadas las gotas sobre los discos, éstos se incubaron a 35 °C durante 24 h en condiciones aeróbicas o anaeróbicas (**Figura 10**).



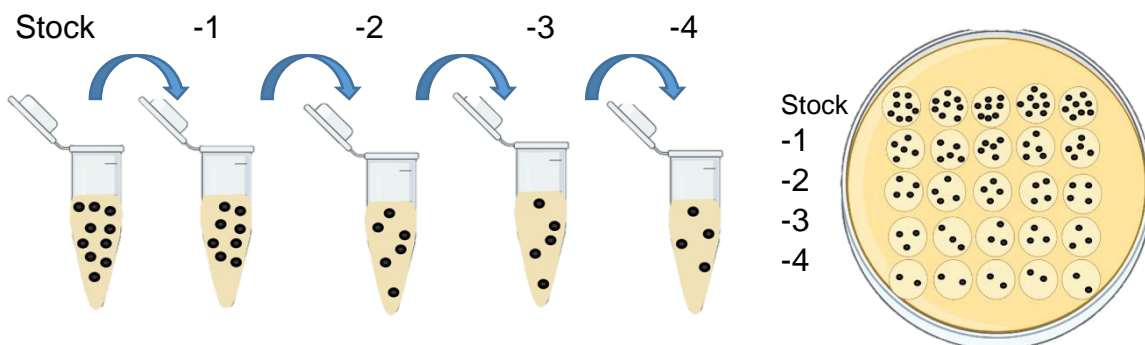
**Figura 10.** Sembrado e incubación bacteriana sobre los discos de PP con y sin nanorecubrimiento de ZnO.

Después del periodo de incubación, se recuperaron los discos y se colocaron en un tubo estéril con 500  $\mu\text{L}$  de caldo de cultivo. Se realizó una agitación vigorosa (vortex) durante 5 segundos y se repitió tres veces, con el objetivo de desprender las bacterias que se encontraban viables sobre cada uno de los discos (**Figura 11**).



**Figura 11.** Recuperación de gota, agitación y obtención de solución stock.

Se retiró el disco del tubo y de la solución “stock” resultante, se realizaron cuatro diluciones seriadas (1:100) y se sembraron 5  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones bacterianas en placas de Petri con agar TSA o HK y se incubaron a 35  $^{\circ}\text{C}$  en condiciones aerobias (24 h) o anaerobias (5 días) dependiendo de la cepa bacteriana (**Figura 12**). Se midió la viabilidad bacteriana mediante el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFCs).



**Figura 12.** Diluciones seriadas y sembrado en placas Petri.

Para obtener el porcentaje de inhibición bacteriana se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{C - T}{C} \times 100 = \% \text{ inhibición bacteriana}$$

Donde:

C = UFCs del control (PP).

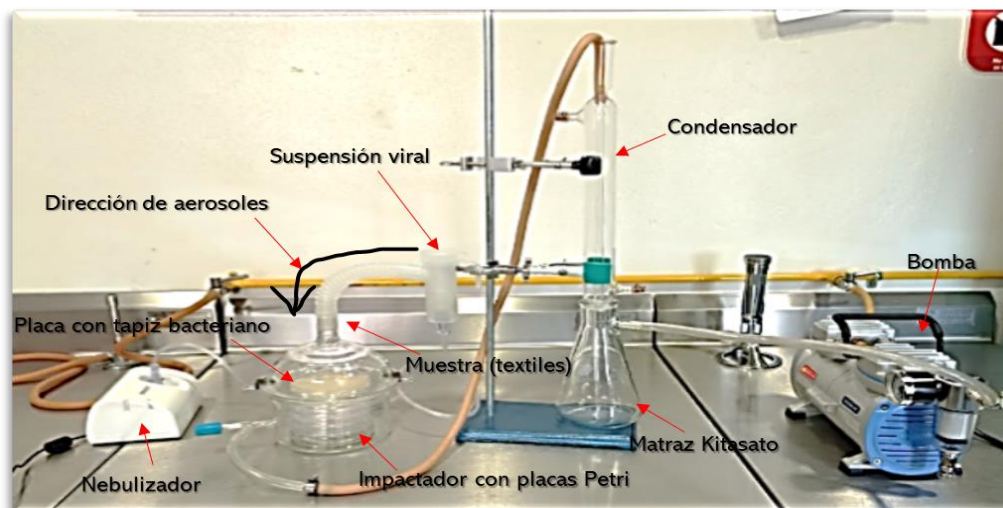
T = UFCs de la muestra experimental (ZnO).

### b) Ensayos antivirales.

Para llevar a cabo la evaluación antiviral del nanorecubrimiento de ZnO se utilizó el bacteriófago PaMx60, considerado un surrogante viral de virus respiratorios de RNA.

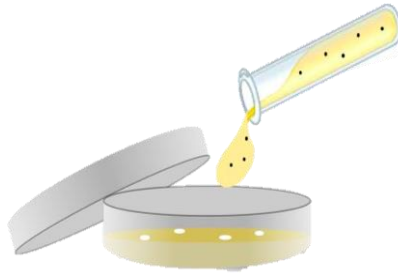
#### *Evaluación por filtrado de aerosoles.*

Para la evaluación de la efectividad antiviral mediante la técnica de filtrado por aerosoles, se realizó el montaje del equipo de filtrado del laboratorio de Biointerfases. El cual está adaptado con base en la norma ASTM-F2101 con algunas modificaciones (Figura 13).



**Figura 13.** Equipo de filtrado adaptado de la norma ASTM-F2101

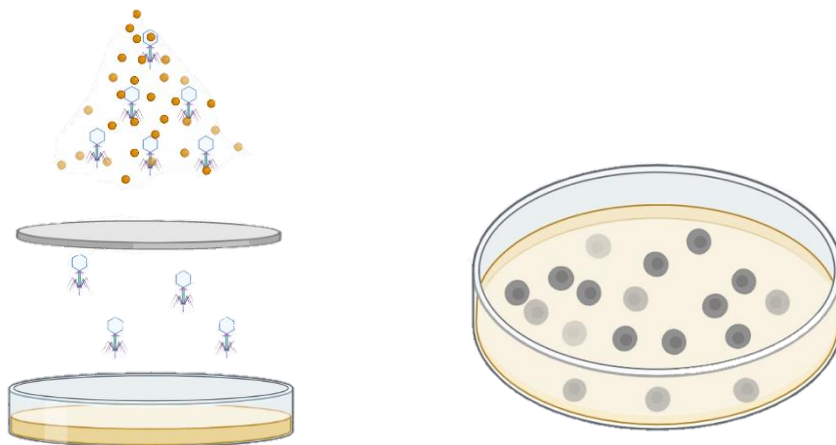
Previo a realizar el experimento, se prepararon cajas Petri con tapices bacterianos de la cepa huésped *Pseudomonas aeruginosa* 33 (PS33), utilizando la técnica del agar suave de doble capa (79, 80).



**Figura 14.** Tapices bacterianos de la cepa huésped.

Los parámetros para el ensayo de filtrado fueron los siguientes:

- Tiempo de filtrado: 1.5 min (bomba y nebulizador).
- Volumen del medio de cultivo en el vaso nebulizador: (6 mL de medio SM y 600  $\mu$ L del fago PaMx61  $1 \times 10^9$  UFP/mL)
- Se trabajó con controles (ambiente y medio) y todas las conexiones del equipo de filtrado fueron selladas con parafilm.
- Incubación a 35 °C por 24 h.
- El experimento se realizó por triplicado y se cambió el textil y la caja de Petri con tapiz bacteriano por cada filtrado.
- Se evaluó la capacidad infectiva del fago sobre su célula huésped, mediante la formación de unidades formadoras de placas líticas (UFPs).



**Figura 15. A)** Filtrado del aerosol con el bacteriófago. **B)** Formación de UFPs.

Para obtener el porcentaje de inactivación viral del textil con el nanorecubrimiento de ZnO, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{C - T}{C} \times 100 = \% \text{ inactivación viral}$$

Donde:

C = UFPs del control (PP).

T = UFPs de la muestra experimental (ZnO).

### **Análisis estadístico.**

Los experimentos antibacterianos y antivirales se realizaron por triplicado y los resultados de los conteos de las unidades formadoras de colonias (UFCs) de cada bacteria y las unidades formadoras de placas líticas (UFPs) del bacteriófago se expresaron como valores media (ME)  $\pm$  error estándar de la media (EEM).

Los análisis para determinar las diferencias entre el polipropileno (PP) y polipropileno con el nanorecubrimiento de ZnO (PP-ZnO) se llevaron a cabo usando la prueba T-Student. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a partir de una  $p < 0.05$ .

## **VI. RESULTADOS.**

### **Evaluaciones antimicrobianas del nanorecubrimiento de ZnO.**

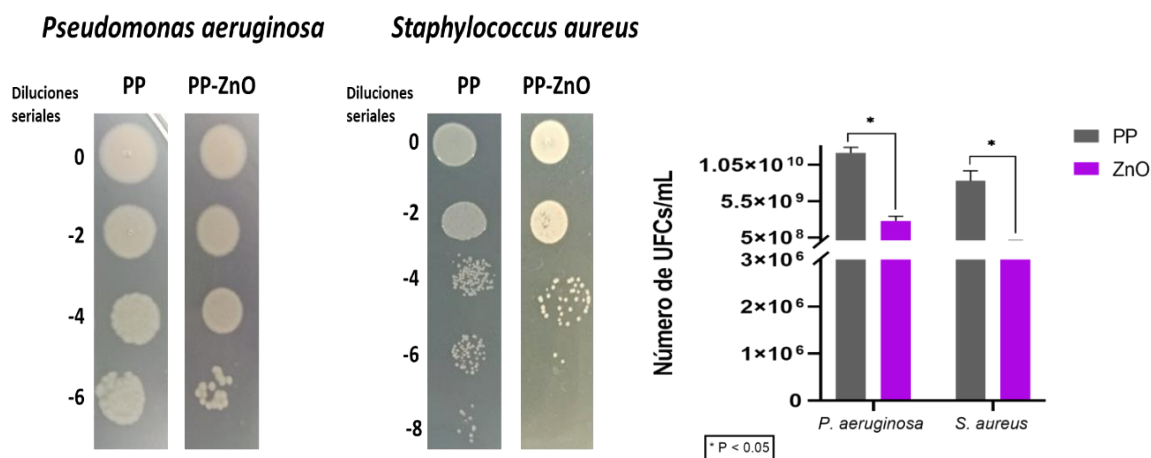
#### **a) Ensayos antibacterianos.**

*Evaluación por contacto directo (gota).*

Bacterias aerobias.

Los resultados de la evaluación de la efectividad antibacteriana del nanorecubrimiento de ZnO por medio de contacto directo durante 24 horas de incubación sobre los discos de polipropileno (PP) y los discos de polipropileno con el nanorecubrimiento de ZnO (PP-ZnO) de *P. aeruginosa* y *S. aureus* medidos mediante el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFCs) se presentan en la **figura 16**.

Se puede observar una disminución significativa de las UFCs de las bacterias que estuvieron en contacto con el PP-ZnO comparándolo con el contacto con el PP. La especie que mostró más sensibilidad al contacto con el nanorecubrimiento fue *S. aureus*. Se usaron los valores de las UFCs de cada bacteria para obtener el porcentaje de inhibición utilizando la fórmula descrita previamente en la metodología. Los resultados mostraron un porcentaje de inhibición del 77% para *P. aeruginosa* y del 99.3% para *S. aureus* cuando estuvieron en contacto con el nanorecubrimiento de ZnO.



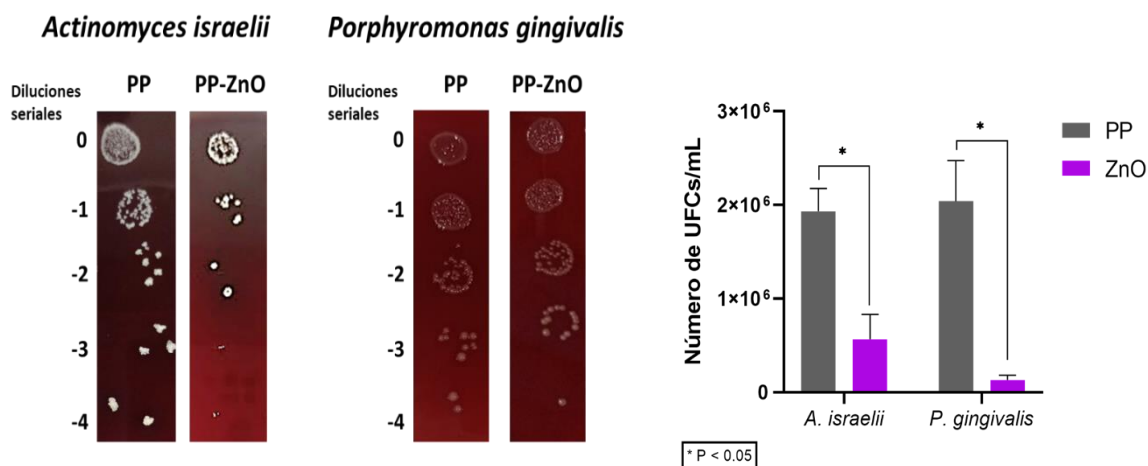
**Figura 16.** Conteo de las UFCs de las bacterias *P. aeruginosa* y *S. aureus* que crecieron al estar en contacto con los textiles de PP y PP-ZnO. Del lado izquierdo se muestran imágenes representativas del crecimiento bacteriano en las diferentes diluciones que fueron sembradas después de 24 horas de incubación en contacto con el PP y el PP-ZnO. Del lado derecho se muestra la gráfica del conteo de las UFCs de ambas bacterias.

### Bacterias aerobias.

La efectividad antibacteriana del nanorecubrimiento de ZnO por medio de contacto directo durante 24 horas de incubación anaerobia sobre los discos de polipropileno (PP) y los discos de polipropileno con el nanorecubrimiento de ZnO (PP-ZnO) de *A. israelii* y *P. gingivalis* medida mediante el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFCs) se presenta en la **figura 17**.

Se puede observar una disminución de las UFCs de las bacterias que estuvieron en contacto con PP-ZnO comparándolo con PP, siendo *P. gingivalis* la especie que mostró más sensibilidad al estar en contacto con el nanorecubrimiento.

Se usaron los valores de las UFCs de cada bacteria para obtener el porcentaje de inhibición con la misma fórmula que se usó para las bacterias aerobias. Los resultados mostraron una inhibición bacteriana del 70% para *A. israelii*, mientras que *P. gingivalis* tuvo una inhibición del 93% después del contacto con el nanorecubrimiento de ZnO.



**Figura 17.** Conteo de las UFCs de las bacterias *A. israelii* y *P. gingivalis* que crecieron al estar en contacto con los textiles de PP y PP-ZnO. Del lado izquierdo se muestran imágenes representativas del crecimiento bacteriano en las diferentes diluciones que fueron sembradas después de 24 horas de incubación en contacto con el PP y el PP-ZnO. Del lado derecho se muestra la gráfica del conteo de las UFCs de ambas bacterias.

## b) Ensayos antivirales.

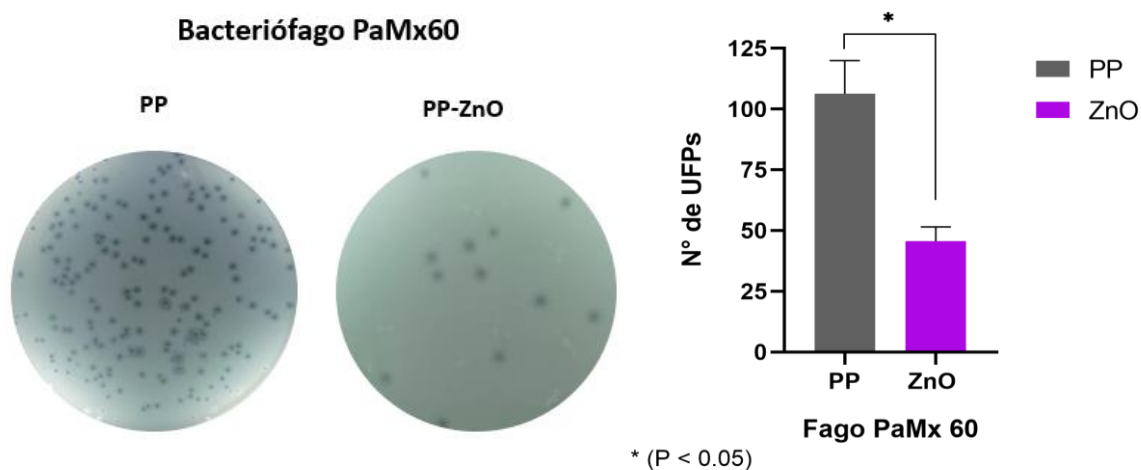
### *Evaluación por filtrado de aerosoles.*

La evaluación de la efectividad antiviral mediante la técnica de filtrado por aerosoles se midió mediante el conteo de las unidades formadoras de placas líticas (UFPs) del bacteriófago PaMx60. Los resultados del efecto del contacto con el nanorecubrimiento de ZnO se presentan en la **figura 18**.



Se puede observar una disminución significativa de las UFPs del aerosol contaminado con el bacteriófago que estuvo en contacto con el PP-ZnO comparándolo con el PP.

Los valores de las UFPs obtenidas fueron utilizados para obtener el porcentaje de inactivación viral utilizando la fórmula descrita previamente en la metodología. Los resultados mostraron un porcentaje del 56.23% de inactivación del fago al estar en contacto con el nanorecubrimiento de ZnO.



**Figura 18.** Conteo de las UFPs formadas una vez que los aerosoles del bacteriófago PaMx60 atravesaron los textiles de PP y PP-ZnO. Del lado izquierdo se muestran imágenes representativas de la inhibición del crecimiento de la célula huésped del bacteriófago después de 24 horas de incubación. Del lado derecho se muestra la gráfica del conteo de las UFPs del bacteriófago cuando estuvo en contacto con PP como con PP-ZnO.

## VII. DISCUSIÓN.

El polipropileno es un material con el que se elaboran barreras de protección del personal médico y odontológico como cubrebocas, batas, gorros y zapatos quirúrgicos. En este estudio *in vitro* se evaluó la efectividad antibacteriana y antiviral de un nanorecubrimiento de óxido de zinc depositado sobre textiles hechos de este material (PP-ZnO).

Los experimentos con las bacterias fueron diseñados para simular gotas contaminadas con microorganismos generadas al toser, estornudar o en un ambiente clínico donde se pudieran general gotas al atender un paciente como en el consultorio dental y que pudieran quedar adheridas al polipropileno (contacto directo). Mientras que los ensayos antivirales se diseñaron para simular el contacto con aerosoles contaminados por virus que pudieran tener contacto sobre el polipropileno en un ambiente hospitalario o en el mismo consultorio dental haciendo un procedimiento generador de aerosoles como las profilaxis hechas con escariador ultrasónico.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron una disminución del crecimiento bacteriano tanto en bacterias aerobias como en bacterias anaerobias cuando estuvieron en contacto con el nanorecubrimiento de ZnO. El efecto antibacteriano del óxido de zinc ha mostrado mayor efectividad sobre bacterias Gram positivas (81). Las bacterias Gram positivas se distinguen por su capa gruesa de 20 a 50 nm compuesta por peptidoglicanos, la cual confiere protección a la célula. En cambio, las bacterias Gram negativas tienen una pared celular más compleja ya que comprende una capa de peptidoglicano ubicada en medio de una membrana celular externa y una membrana celular interna. La membrana externa de las bacterias Gram negativas contiene lipopolisacáridos y proteínas y es el lugar por donde se lleva a cabo el transporte de nutrientes y iones que son esenciales para la integridad estructural y la viabilidad de las bacterias. El daño en la estructura celular de las bacterias Gram negativas también pueden ser parte de algún mecanismo de acción antimicrobiano del óxido de zinc (82). Las diferencias estructurales de las bacterias Gram positivas y Gram negativas pueden influir en la resistencia de las bacterias a los mecanismos de acción de los nanorecubrimientos. En las Gram positivas la pared celular actúa como capa protectora debido al grosor haciendo más resistentes a los mecanismos de acción antimicrobianos que en las Gram negativas ya que estas carecen de esta gruesa capa y por la permeabilidad de la membrana externa facilita el ingreso de los iones  $Zn^{2+}$  (83). Cuando la

integridad de la pared bacteriana se ve afectada, podríamos hablar de un posible mecanismo de acción antimicrobiana (84).

Los resultados con las bacterias aerobias mostraron que la bacteria Gram positiva *S. aureus* disminuyó su crecimiento en un poco más del 99% después de haber estado en contacto con el nanorecubrimiento de ZnO, este resultado coincide con lo que la literatura menciona ya que la integridad de la célula depende de la liberación de iones metálicos del ZnO que se pueden establecer en el citoplasma, causando daños estructurales (85). En cambio, *P. aeruginosa* fue más resistente al contacto con el PP-ZnO teniendo un 77% de inhibición. Esto, podría deberse a que la pared celular de *P. aeruginosa* es delgada ya que es una bacteria Gram negativa y sus mecanismos de resistencia y de adaptación al medio ambiente se encuentran más encadenados con su metabolismo y con la integridad de la membrana celular (86).

Por otra parte, los resultados con las bacterias anaerobias mostraron un efecto contrario respecto al tipo de Gram; ya que *P. gingivalis* (Gram negativa) tuvo un 99% de inhibición al tener contacto con el PP-ZnO y *A. israelii* que es Gram positiva, tuvo un efecto inhibitorio del 70%. *P. gingivalis* al ser una bacteria Gram negativa, probablemente fue más susceptible debido a que su membrana externa contiene polisacáridos, lo cual podría aumentar la carga negativa de la bacteria y que junto con la liberación de los iones  $Zn^{2+}$  provocaría una atracción electrostática causando la acumulación de iones en la membrana celular, alterando la estructura y permeabilidad de la misma (87). Mientras que *A. israelii* pudo ser más resistente debido a que su pared celular le confirió mayor resistencia a la entrada de iones al interior (88).

Diferentes estudios han reportado que el ZnO actúa a través de varios mecanismos, como el daño a la membrana e interrupción del potencial e integridad de la misma debido al exceso de iones  $Zn^{2+}$  que puede generar una alteración del metabolismo celular. También se ha reportado el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno causantes del daño al DNA de la bacterias. Se ha estudiado y comprobado el efecto inhibitorio en bacterias como *Bacillus subtilis*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *E. faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enteritidis*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes* (89, 90). También hay otros estudios que confirman la fuerte actividad antimicrobiana del ZnO donde pudo lisa completamente *Salmonella typhimurium* y *S. aureus*, bacterias que se transmiten a través de los alimentos (91).

Por otro lado, el óxido de zinc también ha sido estudiado por su capacidad antiviral. Nuestros resultados mostraron que los aerosoles contaminados con el bacteriófago PaMx60 que atravesaron el textil con el nanorecubrimiento de ZnO tuvieron una menor capacidad infectiva de su célula huésped, ya que hubo una menor cantidad de UFPs cuando el fago estuvo en contacto con el nanorecubrimiento de ZnO que con el textil sin nanorecubrimiento.

Se ha demostrado que el ZnO tiene una buena actividad antiviral contra el virus de la influenza A (H1N1) y del herpes simple tipo 1 (HSV-1) (92). Sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción del ZnO contra los coronavirus, pero hipótesis han propuesto la capacidad de los iones  $Zn^{2+}$  para unirse a proteínas y a otras macromoléculas biológicas, modulando su actividad (93). En un estudio reciente se menciona el posible mecanismo de acción de los metales y óxidos metálicos como el nanorecubrimiento de plata-cobre (AgCu) sobre el SARS-CoV-2 y éste se debe a la liberación de iones con un efecto letal al contacto con los fosfolípidos de la membrana del virus provocando su muerte (94).

En un estudio realizado en el año 2018, concluye que el ZnO exhibe una importante actividad antiviral al interactuar con el virus del chikungunya y propone a este compuesto como un posible fármaco antiviral contra este virus, aunque menciona que aún es necesario realizar pruebas en animales y si hay éxito aplicarla en humanos (95).

Se ha reportado que la acción antiviral del ZnO se produce a través de la liberación de los iones sobre la membrana lipídica del virus, lo que podría conducir a una pérdida de la viabilidad e infectividad del virus y posiblemente los iones que lleguen a cruzar al interior también puedan dañar la estructura helicoidal del material genético (DNA o RNA) provocando su lisis (96).

Aún queda mucho por seguir investigando en la capacidad antimicrobiana del óxido de zinc, así como sus mecanismos por los cuales llega a provocar la lisis celular bacteriana y la inactivación viral. Respecto a los ensayos antivirales, el uso de bacteriófagos, resulta ser un método innovador y seguro para investigar las propiedades antivirales de diferentes agentes utilizándolos como sustitutos de virus que afectan a los seres humanos.

## VIII. CONCLUSIONES.

Con los resultados de este estudio podemos concluir que:

- El nanorecubrimiento de ZnO depositado sobre textiles de polipropileno, fue efectivo para inhibir el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias tanto Gram positivas como Gram negativas en porcentajes del 70 al 99 %, comparándolo con los resultados obtenidos del propileno sin recubrir.
- También inactivó de manera importante la capacidad infectiva del bacteriófago PaMx60 ya que hubo menor cantidad de unidades formadoras de placas líticas una vez que el fago estuvo en contacto con el nanorecubrimiento comparada con el contacto sobre el polipropileno sin recubrir.
- El óxido de zinc tiene el potencial de ser utilizado como recubrimiento antimicrobiano para algunos equipos de protección personal que utilizamos en la atención odontológica como cubrebocas, batas y gorros.

Los equipos de protección personal utilizados en consultorios dentales y en el medio hospitalario, tienen la capacidad para prevenir la transmisión de diversas enfermedades infecciosas que pueden ser causadas por aerosoles biológicos contaminados con microorganismos patógenos. El uso de equipos que tengan un componente antimicrobiano como el nanorecubrimiento de ZnO, puede ser fundamental para protegernos de los agentes patógenos y que estos equipos ayuden a disminuir el riesgo de transmisión de enfermedades entre el odontólogo y los pacientes.

## IX. REFERENCIAS.

1. OMS. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos: Organización Mundial de la Salud; 2016.
2. OPS. Manual de Normas Bioseguridad en Odontología. 2a. ed: Organización Panamericana de la Salud; 2007.
3. CDC. Summary of Infection Prevention Practices in Dental Settings: Basic Expectations for Safe Care. Services UDoHaH, editor. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2016.
4. ADM. Infection control recommendations for the dental office and the dental laboratory. ADA Council on Scientific Affairs and ADA Council on Dental Practice. *J Am Dent Assoc.* 1996;127(5):672-80.
5. Harrel SK, Molinari J. Aerosols and splatter in dentistry: a brief review of the literature and infection control implications. *J Am Dent Assoc.* 2004;135(4):429-37.
6. Leggat PA, Kedjarune U. Bacterial aerosols in the dental clinic: a review. *Int Dent J.* 2001;51(1):39-44.
7. Mirhoseini SH, Koolivand A, Bayani M, Sarlak H, Moradzadeh R, Ghamari F, et al. Quantitative and qualitative assessment of microbial aerosols in different indoor environments of a dental school clinic. *Aerobiologia (Bologna).* 2021;37(2):217-24.
8. Shpuntoff H, Shpuntoff RL. High-speed dental handpieces and spread of airborne infections. *N Y State Dent J.* 1993;59(1):21-3.
9. Pasnick S, Carlos WG, Dela Cruz CS, Gross JE, Garrison G, Jamil S. SARS-CoV-2 Transmission and the Risk of Aerosol-Generating Procedures. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;202(4):P13-P4.
10. Ge ZY, Yang LM, Xia JJ, Fu XH, Zhang YZ. Possible aerosol transmission of COVID-19 and special precautions in dentistry. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2020;21(5):361-8.
11. Li Y, Ren B, Peng X, Hu T, Li J, Gong T, et al. Saliva is a non-negligible factor in the spread of COVID-19. *Mol Oral Microbiol.* 2020;35(4):141-5.
12. Fong PG. Cross-infection in dentistry: an appraisal of the control guidelines with regard to contamination of dental unit water systems. *Singapore Dent J.* 1993;18(1):6-8.
13. Barbeau J, ten Bokum L, Gauthier C, Prevost AP. Cross-contamination potential of saliva ejectors used in dentistry. *J Hosp Infect.* 1998;40(4):303-11.
14. Redd JT, Baumbach J, Kohn W, Nainan O, Khristova M, Williams I. Patient-to-patient transmission of hepatitis B virus associated with oral surgery. *J Infect Dis.* 2007;195(9):1311-4.
15. Ou CY, Ciesielski CA, Myers G, Bandea CI, Luo CC, Korber BT, et al. Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice. *Science.* 1992;256(5060):1165-71.
16. Hillis DM, Huelsenbeck JP. Support for dental HIV transmission. *Nature.* 1994;369(6475):24-5.
17. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. *Microbiología de Prescott, Harley y Klein.* 7 ed. Madrid: McGraw-Hill; 2016.
18. Fredrickson JK, Zachara JM, Balkwill DL, Kennedy D, Li SM, Kostandarithes HM, et al. Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the hanford site, washington state. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(7):4230-41.
19. Castillo-Basaldúa I. Las bacterias, estudio y cambios a lo largo de la historia. *Revista Digital Universitaria.* 2016;17(5).
20. Bourgeois D, Goncalves LS, Lima-Junior JDC, Carrouel F. Editorial: The Oral Microbiome Is a Key Factor in Oral and Systemic Health. *Front Microbiol.* 2022;13:855668.
21. Kilian M, Chapple IL, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AM, et al. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J.* 2016;221(10):657-66.

22. Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, et al. Biology of Oral Streptococci. *Microbiol Spectr*. 2018;6(5).
23. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009;73(3):407-50.
24. Amyes SG. Enterococci and streptococci. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;29 Suppl 3:S43-52.
25. Ondusko DS, Nolt D. *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Rev*. 2018;39(6):287-98.
26. Romero-Cabello R. *Microbiología y parasitología humana*. España: Editorial Médica Panamericana; 2018.
27. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 28 ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2020.
28. Klockgether J, Tummeler B. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. *F1000Res*. 2017;6:1261.
29. Walker J, Moore G. *Pseudomonas aeruginosa* in hospital water systems: biofilms, guidelines, and practicalities. *J Hosp Infect*. 2015;89(4):324-7.
30. Kononen E, Wade WG. *Actinomyces* and related organisms in human infections. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(2):419-42.
31. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2005;38:72-122.
32. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*. 1999;20:168-238.
33. Liébana Ureña J. *Microbiología Oral*. 2 ed: Mc Graw-Hill Interamericana; 2002.
34. Arenas Guzmán R. *Micología médica ilustrada*. México.: McGraw-Hill Interamericana.; 2019.
35. Pumarola Busquets A. *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona: Editorial Masson 1992.
36. Dumitru R, Hornby JM, Nickerson KW. Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(7):2350-4.
37. Jardetzky T, Kuhn R, Lamb R. Editorial overview: Virus structure and functions. *Curr Opin Virol*. 2017;24:ix.
38. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. Ninth edition. ed. Edinburgh ; New York: Elsevier; 2021. ix, 855 pages p.
39. Cohen J. HIV prevention. Halting HIV/AIDS epidemics. *Science*. 2011;334(6061):1338-40.
40. Thomas Mulet V, Aguado Taberna C, Fidalgo Gonzalez S, Fransi Galiana L, Gutierrez Jodra M, Mascort Roca J, et al. HIV/AIDS infection and primary care. *Aten Primaria*. 2004;33(1):3-5.
41. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol*. 2015;1282:1-23.
42. Zhang Y, Chen C, Zhu S, Shu C, Wang D, Song J, et al. Isolation of 2019-nCoV from a Stool Specimen of a Laboratory-Confirmed Case of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *China CDC Wkly*. 2020;2(8):123-4.
43. Ozceylan G, Altuntas SB. Relationship between initial symptoms and prognosis of patients with Covid-19. *Aten Primaria*. 2022;54(1):102146.
44. Garcia Palomo JD, Aguero Balbin J, Parra Blanco JA, Santos Benito MF. *Enfermedades infecciosas. Concepto. Clasificación. Aspectos generales y específicos de las infecciones. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementarias. Criterios de indicación*. *Medicine (Madr)*. 2010;10(49):3251-64.

45. Sapp PJ. *Patología Oral y Maxilofacial Contemporánea*. 2 ed. México: Elsevier Mosby; 2004.
46. Francis DP, Favero MS, Maynard JE. Transmission of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis*. 1981;1(1):27-32.
47. OPS. *Requerimientos para uso de equipos de protección personal (EPP) para el nuevo coronavirus (2019-nCoV) en establecimientos de salud. Recomendaciones interinas.*: Organización Panamericana de la Salud; 2020.
48. Smereka J, Szarpak L. The use of personal protective equipment in the COVID-19 pandemic era. *Am J Emerg Med*. 2020;38(7):1529-30.
49. Raghunath A, Perumal E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49(2):137-52.
50. Radzig MA, Nadochenko VA, Koksharova OA, Kiwi J, Lipasova VA, Khmel IA. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;102:300-6.
51. Lu Z, Rong K, Li J, Yang H, Chen R. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24(6):1465-71.
52. Alali A, Hosseini-Abari A, Bahrami A, Yazdan Mehr M. Biosynthesis of Copper Oxide and Silver Nanoparticles by Bacillus Spores and Evaluation of the Feasibility of Their Use in Antimicrobial Paints. *Materials (Basel)*. 2023;16(13).
53. Vincent M, Duval RE, Hartemann P, Engels-Deutsch M. Contact killing and antimicrobial properties of copper. *Journal of Applied Microbiology*. 2017;124(5):1032-46.
54. Song C, Sun W, Xiao Y, Shi X. Ultrasmall iron oxide nanoparticles: synthesis, surface modification, assembly, and biomedical applications. *Drug Discov Today*. 2019;24(3):835-44.
55. Sanchez-Lopez E, Gomes D, Esteruelas G, Bonilla L, Lopez-Machado AL, Galindo R, et al. Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(2).
56. Liu S, Chen X, Yu M, Li J, Liu J, Xie Z, et al. Applications of Titanium Dioxide Nanostructure in Stomatology. *Molecules*. 2022;27(12).
57. Chen X, Mao SS. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chem Rev*. 2007;107(7):2891-959.
58. Kolodziejczak-Radzimska A, Jesionowski T. Zinc Oxide-From Synthesis to Application: A Review. *Materials (Basel)*. 2014;7(4):2833-81.
59. Martinez-Carmona M, Gun'ko Y, Vallet-Regi M. ZnO Nanostructures for Drug Delivery and Theranostic Applications. *Nanomaterials (Basel)*. 2018;8(4).
60. Barceló FH. *Materiales dentales: conocimientos básicos aplicados*. 4 ed. México: Trillas; 2015.
61. Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus NHM, Ann LC, Bakhori SKM, et al. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Lett*. 2015;7(3):219-42.
62. Kumar R, Umar A, Kumar G, Nalwa HS. Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review. *Ceram Int*. 2017;43(5):3940-61.
63. Krol A, Pomastowski P, Rafinska K, Railean-Plugaru V, Buszewski B. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Adv Colloid Interface Sci*. 2017;249:37-52.
64. Dobrucka R, Dlugaszewska J. Biosynthesis and antibacterial activity of ZnO nanoparticles using *Trifolium pratense* flower extract. *Saudi J Biol Sci*. 2016;23(4):517-23.



65. Peran M, Garcia MA, Lopez-Ruiz E, Jimenez G, Marchal JA. How Can Nanotechnology Help to Repair the Body? Advances in Cardiac, Skin, Bone, Cartilage and Nerve Tissue Regeneration. *Materials (Basel)*. 2013;6(4):1333-59.
66. Alshammari BH, Lashin MMA, Mahmood MA, Al-Mubaddel FS, Ilyas N, Rahman N, et al. Organic and inorganic nanomaterials: fabrication, properties and applications. *RSC Adv*. 2023;13(20):13735-85.
67. Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett*. 2008;176(1):1-12.
68. Mendonca G, Mendonca DB, Aragao FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials*. 2008;29(28):3822-35.
69. Van Tassel PR. Nanotechnology in medicine: nanofilm biomaterials. *Yale J Biol Med*. 2013;86(4):527-36.
70. Kelkawi AHA, Abbasi Kajani A, Bordbar AK. Green synthesis of silver nanoparticles using *Mentha pulegium* and investigation of their antibacterial, antifungal and anticancer activity. *IET Nanobiotechnol*. 2017;11(4):370-6.
71. Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:1227-49.
72. Xiu ZM, Zhang QB, Puppala HL, Colvin VL, Alvarez PJ. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Lett*. 2012;12(8):4271-5.
73. Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, Jimenez de Aberasturi D, de Larramendi IR, Rojo T, et al. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol*. 2012;30(10):499-511.
74. Dalmaso M, Hill C, Ross RP. Exploiting gut bacteriophages for human health. *Trends Microbiol*. 2014;22(7):399-405.
75. Jamal M, Bukhari S, Andleeb S, Ali M, Raza S, Nawaz MA, et al. Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. *J Basic Microbiol*. 2019;59(2):123-33.
76. Calendar R. *The bacteriophages*. 2nd ed. Oxford; New York: Oxford University Press; 2006.
77. Sabino J, Hirten RP, Colombel JF. Review article: bacteriophages in gastroenterology-from biology to clinical applications. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;51(1):53-63.
78. Jamal M, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, Hussain T, et al. Isolation and characterization of a bacteriophage and its utilization against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*-2995. *Life Sci*. 2017;190:21-8.
79. Sepulveda-Robles O, Kameyama L, Guarneros G. High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(12):4510-5.
80. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol Biol*. 2009;501:69-76.
81. Janaki AC, Sailatha E, Gunasekaran S. Synthesis, characteristics and antimicrobial activity of ZnO nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2015;144:17-22.
82. Braun V. Bacterial cell wall research in Tübingen: a brief historical account. *Int J Med Microbiol*. 2015;305(2):178-82.
83. Slavin YN, Asnis J, Hafeli UO, Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1):65.
84. Malanovic N, Lohner K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1858(5):936-46.
85. Grigor'eva A, Saranina I, Tikunova N, Safonov A, Timoshenko N, Rebrov A, et al. Fine mechanisms of the interaction of silver nanoparticles with the cells of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Biometals*. 2013;26(3):479-88.

86. Nino-Martinez N, Salas Orozco MF, Martinez-Castanon GA, Torres Mendez F, Ruiz F. Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Metal and Metal Oxide Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11).
87. Beveridge TJ. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol.* 1999;181(16):4725-33.
88. Behbehani MJ, Jordan HV. Comparative pathogenicity of *Actinomyces* species in mice. *J Med Microbiol.* 1982;15(4):465-73.
89. Beyth N, Hourri-Haddad Y, Domb A, Khan W, Hazan R. Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:246012.
90. Salem W, Leitner DR, Zingl FG, Schratte G, Prassl R, Goessler W, et al. Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 2015;305(1):85-95.
91. Jin T, Sun D, Su JY, Zhang H, Sue HJ. Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, and *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Sci.* 2009;74(1):M46-52.
92. Ghaffari H, Tavakoli A, Moradi A, Tabarraei A, Bokharaei-Salim F, Zahmatkeshan M, et al. Inhibition of H1N1 influenza virus infection by zinc oxide nanoparticles: another emerging application of nanomedicine. *J Biomed Sci.* 2019;26(1):70.
93. Pormohammad A, Monych NK, Turner RJ. Zinc and SARS-CoV-2: A molecular modeling study of Zn interactions with RNA-dependent RNA-polymerase and 3C-like proteinase enzymes. *Int J Mol Med.* 2021;47(1):326-34.
94. Bello-Lopez JM, Silva-Bermudez P, Prado G, Martinez A, Ibanez-Cervantes G, Cureno-Diaz MA, et al. Biocide effect against SARS-CoV-2 and ESKAPE pathogens of a noncytotoxic silver-copper nanofilm. *Biomed Mater.* 2021;17(1).
95. Mandal AK, Katuwal S, Tetey F, Gupta A, Bhattarai S, Jaisi S, et al. Current Research on Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications. *Nanomaterials (Basel).* 2022;12(17).
96. Pasquet J, Chevalier Y, Couval E, Bouvier D, Noizet G, Morliere C, et al. Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five micro-organisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties. *Int J Pharm.* 2014;460(1-2):92-100.