



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología

“Dr. Keisaburo Miyata”

**“Efecto del recubrimiento de nanopartículas de
Plata, Cobre y Óxido de Zinc en PMMA de uso
odontológico: estudio *in vitro*”**

TESIS DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

Presenta:

L.E. Nancy Millán Mora

Director Académico:

Dr. en C.S. Ulises Velázquez Enríquez

Co-Director:

Dra. en C.S. Saraí Carmina Guadarrama Reyes

Tutor:

Dr. en C.M. Raúl Alberto Morales Luckie

Toluca, Estado de México; octubre 2021



2017-2021

ÍNDICE

1. Introducción	8
2. Antecedentes	9
3. Marco teórico	12
3.1 Microbiología	12
3.1.1 Bacterias	12
3.1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
3.1.1.2 <i>Escherichia coli</i>	15
3.1.2 Levaduras	16
3.1.2.1 <i>Candida albicans</i>	17
3.2 Microbiología bucal	18
3.2.1 Saliva	19
3.3 Medios de cultivo de microorganismos	20
3.3.1 Medios de cultivo para bacterias	22
3.3.1.1 Agar Soja Trypticase (TSA)	22
3.3.2 Medios de cultivo para levaduras	24
3.3.2.1 Glucosado de Sabouraud (SDA)	24
3.3.3 Preparación de los medios de cultivo	26
3.4 Polimetilmetacrilato (PMMA)	27
3.4.1 Propiedades	28
3.4.2 Procesamiento	28
3.4.3 Generalidades	29
3.5 Nanopartículas de Plata (AgNPs)	31
3.5.1 Método de síntesis	33
3.6 Nanopartículas de Cobre (CuNPs)	34
3.6.1 Método de Síntesis	35
3.6.1.1 Microemulsión	36
3.6.1.2 Deposición al vacío	36
3.6.1.3 Poliol	37

3.6.1.4	Descomposición térmica	37
3.7	Nanopartículas de Óxido de Zinc (ZnONPs)	37
3.7.1	Método de síntesis	39
3.8	Técnicas de Caracterización	40
3.8.1	Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	41
3.8.2	Microscopia Electrónica de transmisión (TEM)	42
4.	Planteamiento del problema	44
5.	Justificación	46
6.	Hipótesis	48
7.	Objetivos	49
8.	Materiales y Método	51
8.1	Diseño metodológico	51
8.2	Criterios de selección	52
8.3	Operacionalización de las variables	54
8.4	Equipo y materiales	58
8.5	Método	62
8.6	Consideraciones Bioéticas	74
8.7	Análisis estadístico	75
9.	Resultados	76
10.	Acuse de envío de artículo	80
11.	Artículo: Resumen / Abstract	82
12.	Discusión	84
13.	Conclusión	88
14.	Sugerencias	89
15.	Referencias	90
	Anexos	98

Resumen

Introducción. En ocasiones la cavidad bucal sufre diversas alteraciones, originando la sustitución de sus tejidos mediante la utilización de diversas prótesis o aparatos ortodóncicos, la mayoría, se elabora de polimetilmetacrilato (PMMA). Las prótesis o aparatología ortodóntica-ortopédica acumulan una gran cantidad de biopelícula dental, aumentando así, el riesgo de padecer enfermedades o alteraciones en la cavidad oral causadas por microorganismos.

Objetivo. Analizar el efecto del recubrimiento de PMMA de uso odontológico con nanopartículas de Plata (AgNPs), Cobre (CuNPs) y Óxido de Zinc (ZnONPs) mediante la caracterización con Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Espectroscopía de Dispersión de Energía (EDS) y pruebas microbiológicas

Materiales y Método. Un total de 240 bloques de 5mm de diámetro x 2mm fueron elaborados y divididos en 8 grupos; GI (Arias control), GII (Arias con AgNPs), GIII (Arias con CuNPs), GIV (Arias con ZnONPs), GV (NicTone), GVI (NicTone con AgNPs), GVII (NicTone con CuNPs) y GVIII (NicTone con ZnONPs); se esterilizaron y almacenaron en frascos de vidrio ámbar. Las nanopartículas se sintetizaron *in situ* por el método de T. Bala, posteriormente se incorporaron a los bloques de PMMA. La caracterización de los bloques de PMMA impregnados con AgNPs, CuNPs y ZnONPs se evaluó mediante SEM/EDS. Finalmente se realizaron pruebas microbiológicas frente a los patógenos humanos estándar *E. coli* (ATCC25922), *S. aureus* (ATCC25923) y *C. albicans* (Identificada con agar cromogénico) para analizar su efecto antimicrobiano por medio de la observación de los halos de inhibición.

Resultados. Las micrografías obtenidas mediante SEM/EDS permitieron hallar AgNPs y CuNPs homogéneamente distribuidas. El análisis microbiológico mostró diferencias significativas de la inhibición entre grupos; para *S. aureus* el grupo con mayor efecto inhibitorio fue GVII seguido del GIV; en contraparte, el efecto menor se observó en GVIII; para *E. coli*; los grupos con mayor efecto inhibitorio fueron GIV y GVIII;

en contraparte el efecto menor se observó en GVI seguido de GIII. No se obtuvo efecto inhibitorio para *C. albicans*.

Conclusiones. Según los resultados de este estudio, el método de T. Bala permitió incorporar las AgNPs, CuNPs y ZnONPs a la superficie de los bloques de PMMA. Las resinas acrílicas evaluadas en el grupo GIV y GVIII recubiertas con nanopartículas de Óxido de Zinc, y la resina acrílica evaluada en el grupo GVII recubierta con nanopartículas de Cobre, fueron las que mostraron mayor actividad antibacteriana para la mayoría de los microorganismos. En general, el recubrimiento con nanopartículas reducen la adherencia de *E. coli* y *S. aureus* a los bloques de PMMA, demostrando propiedades antibacterianas. *C. albicans* mostró menor inhibición a los bloques de PMMA.

Abstract

Introduction. Sometimes the oral cavity undergoes various alterations, causing the replacement of its tissues through the use of various prostheses or orthodontic appliances, most of which are made of polymethylmethacrylate (PMMA). Prostheses or orthodontic-orthopedic appliances accumulate a large amount of dental biofilm, thus increasing the risk of suffering from diseases or alterations in the oral cavity caused by microorganisms.

Objective. Analyze the effect of the PMMA coating for dental use with Silver (AgNPs), Copper (CuNPs) and Zinc Oxide (ZnONPs) nanoparticles by characterization with Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersion Spectroscopy (EDS) and microbiological tests.

Materials and Method. A total of 240 blocks of 5mm diameter x 2mm were made and divided into 8 groups; GI (Arias control), GII (Arias with AgNPs), GIII (Arias with CuNPs), GIV (Arias with ZnONPs), GV (NicTone), GVI (NicTone with AgNPs), GVII (NicTone with CuNPs) and GVIII (NicTone with ZnONPs); they were sterilized and stored in amber glass jars. The nanoparticles were synthesized in situ by the method of T. Bala, later they were incorporated into the PMMA blocks. The characterization of the PMMA blocks impregnated with AgNPs, CuNPs and ZnONPs was evaluated by SEM/EDS. Finally, microbiological tests were carried out against the standard human pathogens *E. coli* (ATCC25922), *S. aureus* (ATCC25923) and *C. albicans* (Identified with chromogenic agar) to analyze their antimicrobial effect by observing the inhibition halos.

Results. The micrographs obtained by SEM/EDS allowed to find AgNPs and CuNPs homogeneously distributed. The microbiological analysis showed significant differences in inhibition between groups; for *S. aureus*, the group with the greatest inhibitory effect was GVII followed by GIV; on the other hand, the minor effect was observed in GVIII; for *E. coli*, the groups with the greatest inhibitory effect were GIV

and GVIII; in contrast, the lower effect was observed in GVI followed by GIII. Less inhibition effect was obtained for *C. albicans*.

Conclusions. According to the results of this study, the T. Bala method allowed the incorporation of AgNPs, CuNPs and ZnONPs to the surface of the PMMA blocks. The acrylic resins evaluated in the GIV and GVIII group coated with zinc oxide nanoparticles, and the acrylic resin evaluated in the GVII group coated with copper nanoparticles, were the ones that showed the highest antibacterial activity for most microorganisms. In general, coating with nanoparticles reduces the adherence of *E. coli* and *S. aureus* to PMMA blocks, demonstrating antibacterial properties. *C. albicans* showed less inhibition to PMMA blocks.

1. Introducción

La cavidad bucal se compone de diversas superficies, las cuales, a su vez están recubiertas por bacterias; los tejidos duros y blandos de la cavidad bucal están bajo la protección de factores inmunes específicos e inespecíficos, que tienden a limitar la colonización microbiana, prevenir la penetración de sustancias nocivas a través de los tejidos y evitar así el perjuicio que esto acarrea.¹ La pérdida de funciones o elementos estructurales nos lleva a la necesidad de reponer tejidos y en algunas ocasiones de la corrección de estos para devolver la función al aparato estomatognático. Por ello; utilizar materiales naturales, artificiales o sintéticos; es indispensable para la sustitución total o parcial, restauración o corrección de tejidos biológicos, mismos que han sido una gran preocupación en la odontología. Entre los materiales más utilizados en odontología para la elaboración de prótesis y aparatología se encuentra el Polimetilmetacrilato (PMMA), que ha resultado ser un excelente biomaterial.²

Se ha propuesto utilizar nanomateriales en odontología para combatir enfermedades o afecciones comunes, por ejemplo las Nanopartículas de Plata (AgNPs), nanopartículas de Cobre (CuNPs) y nanopartículas de Óxido de Zinc (ZnONPs); puesto que poseen propiedades antimicrobianas, buena conductividad iónica, actividad catalítica y estabilidad química considerable.³ Recientemente se ha incorporado su uso a diversas especialidades, una de ellas la ortodoncia, al implementarlas en los adhesivos para colocación de brackets. Las prótesis o aparatología ortodóntica-ortopédica por el hecho de estar en boca por un lapso de tiempo prolongado se convierten en un gran reservorio de microbios que provocan infecciones, pudiendo ser contrarrestado, si el PMMA material con el que son elaboradas, tuviera propiedades antimicrobianas; por lo anterior, el objetivo de la actual investigación es analizar el efecto del recubrimiento del PMMA de uso odontológico con AgNPs, CuNPs y ZnONPs; mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) (por sus siglas en inglés), Espectroscopía de Dispersión de Energía (EDS) (por sus siglas en inglés) y pruebas microbiológicas.

2. Antecedentes

Durante mucho tiempo, los metales han despertado una gran admiración en el hombre debido a sus propiedades antimicrobianas, han concebido grandes contribuciones al avance de la ciencia médica. El más utilizado desde la época de los griegos ha sido la Plata observando importantes propiedades curativas en este metal. Desde el año 400 a.C., se describe cómo el brillante metal puede ser utilizado para esterilizar agua, almacenar alimentos y tratar heridas. Los fenicios y chinos utilizaron como agente desinfectante la Plata, al observar que los alimentos almacenados en contenedores de Plata tardaban mucho más tiempo en descomponerse previniendo infecciones estomacales.⁴

Civilizaciones como los griegos, romanos, egipcios, aztecas y mayas, utilizaban el Cobre en la fabricación de vasijas para preservar agua y alimentos, así como también, en la fabricación de instrumentos quirúrgicos y en la curación de heridas. Avicena menciona el Óxido de Zinc como el tratamiento preferido para diversas condiciones en la piel, incluyendo cáncer de piel. En el siglo XVII se descubrió la capacidad del Cobre para combatir plagas en la agricultura, específicamente para controlar infecciones por hongos en plantaciones de trigo.⁵ En 1800, los médicos utilizan suturas de Plata en las heridas quirúrgicas con resultados muy exitosos. Credé, redacta el primer artículo científico en el que describe el uso de la Plata como antibacteriano para la prevención de infecciones oculares en los neonatos como antiséptico.⁴ En el siglo XIX personas ponían dólares de Plata en botellas de leche para prolongar la frescura de la misma. Los compuestos con Plata fueron utilizados con éxito para prevenir infecciones durante la Primera Guerra Mundial (antes de la era de los antibióticos). A comienzos del siglo XX, previo a la era antibiótica, diferentes compuestos químicos de Cobre fueron utilizados en el tratamiento de patologías infecciosas, como impétigo, tuberculosis y sífilis.⁵

En odontología las nanopartículas han tomado gran fuerza al ser incorporadas en diversos materiales debido a sus propiedades bactericidas, inclusive de dureza; dentro de las nanopartículas más utilizadas han sido las de Plata y Cobre siendo ampliamente estudiadas y aplicadas. Otra nanopartícula que recientemente se ha incorporado a los materiales odontológicos es la de Óxido de Zinc, la cual cuenta con pocos antecedentes, pero que ha demostrado ser una excelente opción como antimicrobiano.

Es así que en el año 2012 Acevedo Contreras analizó el efecto antifúngico que presentaban las Nanopartículas de Plata al incorporarlas a la formulación del alginato.⁶ En el año 2013, Mohammad Samiei mezcló agregado de trióxido mineral (MTA) con AgNPs;⁷ Mary Anne S. Melo incorporó AgNPs y de fosfato de calcio amorfo en el adhesivo por primera vez, e investigaron los efectos sobre la resistencia de la unión de la dentina, incluso las biopelículas de microcosmos de placa.⁸

En el 2014, Bahador incorporó Nanopartículas de Plata al polimetilmetacrilato para evaluar la actividad antimicrobiana contra colonizadores primarios de la placa dental humana de las bacterias cariogénicas en planctónicos y Cultivos de biopelículas.⁹ Mariel Murga en 2016 añadió partículas de Plata al primer aplicándolo en el esmalte dental adyacente a la aparatología fija;¹⁰ Ghahremanloo evaluó el efecto antimicrobiano de las resinas acrílicas que contienen diversas concentraciones de nanopartículas de Plata, sobre *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*.³ Sánchez Sanhueza, utilizó las nanopartículas de Cobre como antimicrobiano endodóntico.¹¹ Para el año 2017 Hernández-Gómora sintetizó AgNPs *in situ* en los módulos elastoméricos ortodónticos (OEM), obteniendo resultados favorables en la reducción bacteriana.¹²

Recientemente, se ha incrementado la aplicación de las nanopartículas en el área odontológica, realizando más investigaciones sobre las propiedades que aportan, por lo que en el año 2018, Guadarrama-Reyes recubrió con AgNPs hilos de sutura de seda y catgut para analizar su efecto antimicrobiano,¹³ Argueta Figueroa, enriqueció el acrílico termopolimerizable con CuNPs,¹⁴ Firas Abd Kati, incorporó ZnONPs a las resinas acrílicas;¹⁵ subsecuentemente en el 2019, se han realizado investigaciones en las que Llamas S. recubrió Brackets de Ortodoncia con AgNPs para la inhibición bacteriana,¹⁶ de igual manera, otros autores han llevado a cabo investigaciones de las propiedades antimicrobianas y citotóxicas probando un adhesivo de uso ortodóncico adicionado con AgNPs.¹⁷

Es así como estas nanopartículas han traído grandes beneficios al área odontológica primordialmente por sus propiedades antimicrobianas que han demostrado y que con el paso del tiempo se seguirán estudiando e incorporando en diversos materiales.

3. Marco teórico

3.1 Microbiología

Microbiología proviene del griego *mikros*, que significa "pequeño", *bios*, "vida" y *logos*: "tratado, investigación, ciencia". Su objeto de investigación son los microorganismos, también conocidos como microbios. A su vez, están formados por una sola célula o estructuras celulares más complejas. La organización de estas entidades se distribuye en tres áreas: 1) Bacterias, originalmente llamadas *Eubacterias* 2) Arqueas o *Archaea* que originalmente incluía bacterias que vivían en ambientes extremos; y 3) Eucariontes o *Eukarya*, donde se encuentran hongos, algas levaduras.¹

3.1.1 Bacterias

Dentro de los procariontes se encuentra un grupo de organismos unicelulares mejor conocidos como bacterias; esto quiere decir, que carecen de un núcleo celular y orgánulos como aparato de Golgi, mitocondrias o cloroplastos, por lo tanto, su material genético, ADN (Ácido desoxirribonucleico) está libre en el citoplasma. Aunque su organización celular es simple, adoptan muchas formas, llamadas filamentos, cocos, bacilos, vibrios y espirilos. La longitud de las bacterias oscila entre 0.5 y 5 μ de longitud; siendo imperceptibles para el ojo humano por sí solo, con la particularidad de su percepción cuando se tratan de agrupamientos considerables; estos microorganismos tienen una pared que envuelve a la célula proporcionándole solidez y protección contra el ambiente externo.

La tinción de Gram es una técnica de estudio, desarrollada en 1884 por el bacteriólogo danés Hans Christian Gram, permite hacer la diferenciación de las bacterias en dos grupos de acuerdo con las propiedades de sus membranas para teñirse.

Las bacterias Gram positivas son bacterias que aparecen en púrpura bajo un microscopio después de la tinción. Por el contrario, las bacterias Gram negativas aparecen rosadas, rojas o grosellas.¹

Existen bacterias autótrofas y heterótrofas (saprofitas, parásitas, simbióticas); muchas de estas son aerobias puesto que requieren oxígeno libre para respirar; otras son anaerobias debido a que viven en ausencia de oxígeno, y varias más tienen la posibilidad de vivir en los dos medios por lo cual se les llama facultativas; su reproducción es por partición.¹⁻³

Las **bacterias aerobias** requieren oxígeno para crear energía y crecer en un cultivo por medio de la respiración celular aeróbica.^{3,18}

Las **bacterias anaeróbicas** no requieren oxígeno y no crecen en un cultivo en presencia de aire, generan energía por respiración anaeróbica; estas bacterias se encuentran comúnmente en grietas y heridas en la superficie del tracto digestivo, vagina y dientes.^{3,18}

Las **bacterias facultativas** crecen con o sin oxígeno, generan energía, respiración anaeróbica si no hay oxígeno, o por respiración celular aeróbica en presencia de oxígeno; las bacterias microaerófilas optan por una concentración de oxígeno limitada (de 2 a 10%).^{3,18}

La Tabla 1 ejemplifica la clasificación de los géneros antimicrobianos.

Tabla1. Géneros Antimicrobianos

	ANAEROBIAS	AEROBIAS
Gramnegativos	<i>Prevotella</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Bacteroides</i> <i>Treponema</i> <i>Campylobacter</i> <i>Eikenella</i>	<i>Haemophilus</i> <i>Kingella</i> <i>Neisseria</i>
Grampositivos	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Capnocytophaga</i> ¹⁹

3.1.1.1 Staphylococcus aureus

S. aureus se encuentra principalmente en los conductos nasales, en la dermis, tracto gastrointestinal y en aparato estomatognático, con capacidad para integrar material genético de otros microorganismos, aumentando su virulencia y resistencia antimicrobiana. Siendo un microorganismo considerado Gram positivo esférico, que al ser visualizado por microscopía se presenta con una apariencia de racimo. Este microorganismo provoca un sinnúmero de infecciones cutáneas de tejidos blandos, pleuropulmonares y osteoarticulares. Es probable que la infección estafilocócica sea el resultado de una infección cruzada de múltiples causas.²⁰

El crecimiento en medios de cultivo controlados inicia entre 18 y 24 horas posterior al incubamiento, estableciéndose agrupamientos con un diámetro de 0.5-1.5 mm, lisos,

elevados, radiantes y con bordes regulares, densidad cremosa y de tonalidad amarillo-dorado resultado de la producción de carotenoides. Este microorganismo se distingue por la producción de coagulasa, ser resistente al calor, y a la desecación, por lo que consigue proliferar en medios con porciones de Cloruro de Sodio al 7.5 %. Asimismo, logra subsistir en medios de cultivos no selectivos, como el agar sangre, agar chocolate, y medios líquidos para hemocultivo.²⁰



Figura 1. *Staphylococcus aureus*

3.1.1.2 *Escherichia coli*

El núcleo familiar *Enterobacteriaceae* está formado por más de 20 géneros bacterianos, alrededor de 120 especies y miles de serotipos (combinación del antígeno somático y el flagelar): las bacterias de esta familia son anaerobias facultativas; la mayoría son de vida independiente, varias son comensales de animales vertebrados e invertebrados; no obstante, tienen la posibilidad de ser patógenos responsables de enfermedad.¹⁸

Escherichia coli es la especie bacteriana que está en el microbiota intestinal; se muestra como un comensal del intestino humano escasas horas a partir del nacimiento. Preexisten varios patotipos de *E. coli* implicados en un extenso espectro de patologías agrupadas en tres síndromes clínicos.¹⁸

Para un óptimo funcionamiento, el proceso digestivo requiere de vitaminas esenciales como B y K, *que son generadas por distintas bacterias entre ellas Escherichia coli*. La magnitud promedio de los bacilos es de 0.5 μ de ancho por 3 μ de extenso, una vez que se usa la tinción de Gram se tiñen de rojo (Gram negativa). Varias especies son móviles (por flagelos peritricos), no esporuladas, fermentan la glucosa y la lactosa son catalasa positivos, oxidasa negativos además disminuyen nitratos a nitritos. El género *Escherichia* incluye siete especies (*E. adecarboxylata*, *E. alberti*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* y *E. coli*); *E. coli* se considera uno de los componentes etiológicos primordiales de diarrea infantil en naciones en desarrollo.¹⁸

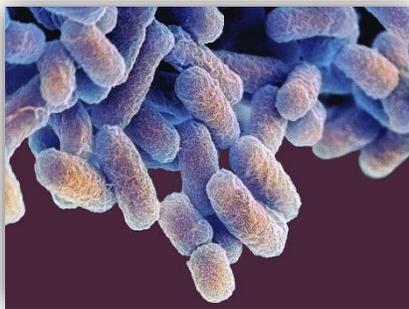


Figura 2. *Escherichia coli*

3.1.2 Levaduras

El dominio Eucarionte (*Eukarya*) está compuesto por algas, hongos filamentosos; levaduras, hongos mucosos y protozoos. Dichos microorganismos se catalogan en unicelulares o pluricelulares. Según su tipo de hábitat además tienen la posibilidad de ser saprófitos, que se alimentan de sustancias en descomposición, parásitos, que se alimentan de los líquidos internos de otros organismos vivos o simbioses que se asocian a otros organismos con beneficios mutuos. A partir de una visión microbiológica, se ha nombrado “levadura” a todos los hongos con predominio de una etapa unicelular en su periodo de vida.²

Los hongos se reproducen mediante esporas que tienen la posibilidad de ser asexuales y sexuales, ciertos hongos poseen la función de modificar su morfología (dimorfismo) conforme el medio en el cual estén; esto se prueba en patógenos como *Candida*, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis*, etc. Los hongos son heterótrofos, aerobios o microaerófilos, se desarrollan en medios artificiales a temperaturas de entre 5 y 45 °C con un pH de 2 a 8; necesitan agua, sales, fuente de Nitrógeno (N) y de Carbono (C) para su desarrollo generalmente, es más retardado que el de las bacterias.²

La categorización de los hongos tiene presente el tipo de recursos de reproducción, hay hongos que se unen a la biota común y producen patologías endógenas mientras tanto que en otras ocasiones la infección nace del medio y se llama patología exógena.²

3.1.2.1 *Candida Albicans*

Candida albicans es el patógeno fúngico humano más común que causa alteraciones que afectan desde la mucosa hasta infecciones sistémicas. La característica de esta especie de hongo radica en que es enormemente adaptable para la transición de comensal a patógeno lo que se debería a un repertorio de componentes virulentos, especialmente, la función de modificar la morfología y conformar biopelículas.²¹

Los hongos del género *Candida* tiene la posibilidad de ocasionar tanto micosis superficiales como profundas; en las primeras dichos microorganismos tienen una capacidad variable de fijarse a las células epiteliales de la mucosa y piel; esta incorporación va a ser tanto más fuerte y más inmediata cuanto más grande sea el poder patógeno de la especie. La pared celular de los hongos del género *Candida* tiene antígenos que son asociaciones de polisacáridos y proteínas, los cuales se relacionan con la generalidad de los microorganismos patógenos.^{1,22}

La *Candida* acostumbra a unirse a ciertos receptores de la pared celular de los epitelios alojándose en los tubos germinativos o las pseudohifas; en la mucosa dichos microorganismos ocasionan una respuesta inflamatoria con desprendimiento de células epiteliales y exudación leucocitaria de proteínas plasmáticas que conduce a la formación de regiones erosivas cubiertas por pseudomembranas blanquecinas.²²

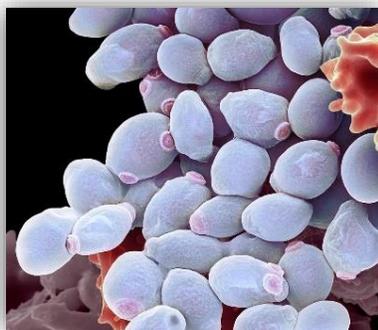


Figura 3. *Candida Albicans*

3.2 Microbiología bucal

En la cavidad bucal se encuentra una amplia gama de bacterias, denominada biopelícula bacteriana. Los microorganismos bucales son responsables de patologías orales, encontrándose entre las más comunes la enfermedad periodontal y caries. El microbioma bucal es un ente bastante complejo gracias a la abundancia de hábitats en la cavidad oral, proporcional a la concentración de oxígeno, nutrientes, temperatura, exposición a componentes inmunológicos y propiedades anatómicas.^{19,23}

Entre los microorganismos que conforman la microbiota de la cavidad bucal resaltan las especies del género *Streptococcus* que se localizan en una alta proporción en tejidos blandos, saliva y en la lengua, siendo el *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* los microorganismos más asociados con caries dental. Las especies del

género *Actinomyces* se localizan a nivel supragingival e infragingival y en fisuras de la lengua; las especies *Veillonella* y *Neisseria* tienen la posibilidad de ser recluidas en todos los hábitats bucales.²³

Estudios de reciente publicación establecen que el microbioma bucal es tan abundante con la coexistencia de diversos agentes bacterianos siendo los principales *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*, derivando de ello, una naturaleza polimicrobiana de las infecciones bucales.^{1,23}

Si bien el elemento bacteriano ha sido objeto de amplias observaciones, la microbiota fúngica bucal es prácticamente desconocida, las relaciones fúngicas-bactéricas, inciden directamente en la salud bucal como lo ilustra la interacción sinérgica entre *Candida albicans* y *Streptococcus* orales.²²

3.2.1 Saliva

La saliva se considera un sistema indispensable, porque las glicoproteínas interactúan con los microorganismos en boca, generando la integración bacteriana en superficies, evasión de la protección del huésped, nutrición, metabolismo bacteriano y la expresión génica. En este mismo sentido, las glicoproteínas permanecen asequibles en la interacción con la adhesina microbiana del colonizador para formar una biopelícula dental.²³

3.3 Medios de cultivo de microorganismos

La identificación de las especies bacterianas en la ciencia básica aplicada a las ciencias de la salud, se hace convencionalmente mediante cultivos, pruebas bioquímicas y tinciones para la idónea identificación además de permitir tanto la caracterización del microorganismo como su morfología. Actualmente, este campo posibilita observar un gran desarrollo gracias al progreso de técnicas aplicadas a la investigación en odontología basándose en la Genética y Biología.²⁴

El medio de cultivo es una solución equilibrada de nutrientes y componentes de crecimiento necesarios para el progreso y reproducción de microorganismos (bacterias, hongos y parásitos en el laboratorio); es decir, intentan imitar de manera artificial condiciones de hábitat natural para los microorganismos. El propósito es aislar las múltiples especies, proceder a identificarlas o realizar estudios complementarios.^{24,25}

Se utilizan diferentes métodos para su identificación, entre ellos está el análisis de su morfología que también incluye su reacción a diferentes tintes y los tipos de estructuras teniendo endosporas, cápsula, etc. Así mismo sus metabolitos son muy útiles, porque muchos de ellos son productos típicos de cada especie y se pueden utilizar para identificarlos; estos metabolitos pueden detectarse mediante una serie de pruebas llamadas reacciones bioquímicas. El medio utilizado dependerá del microorganismo a cultivar y del propósito de su cultivo.²⁵

Para promover el crecimiento de microorganismos, el medio de cultivo debe cumplir ciertos requisitos:

1. Nutrición suficiente
2. Proporcione suficiente humedad
3. Ajuste el pH
4. Inicialmente es estéril.

Pueden describirse globalmente según su composición química, estado físico y finalidad del cultivo. Debido a la distribución según diferentes estándares, un medio puede incluirse en múltiples categorías.^{24,25}

Podemos clasificar a los medios de cultivo según diferentes estándares:

A. Por su composición: Para preparar un medio definido o sintético como el de Koser con citrato, se emplean ingredientes altamente puros para saber su composición química (cualitativa y cuantitativamente). Si su composición es incierta, se usan medios indefinidos, naturales o complejos.

B. Por su estado físico. El medio sólido como el Agar Soja Trypticase contiene coagulantes que se emplean para separar los microorganismos presentes en la muestra. El medio líquido como Agua de peptona no se agrega con un elemento solidificante, suelen utilizarse para mantener los microorganismos que crecen más rápido en el medio; el medio semisólido como Agar de Hugh-Leiffson al contener un coagulante con una concentración menor que los sólidos, pueden usarse para establecer la motilidad de microorganismos o su potencial de fermentación oxidativa de los microorganismos.^{1,24,25}

C. Por su utilidad: Cuando se cultivan microorganismos que requieren nutrientes comunes, utilizar medios ordinarios como el Agua de peptona, sus nutrientes permiten que crezcan una gran cantidad de microorganismos. Las bacterias con las mayores

necesidades de nutrientes se cultivan en medios enriquecidos, por ejemplo, Agar chocolate que es Agar con nutrientes añadidos de sangre hemolizada; contienen los nutrientes ausentes de los medios ordinarios, por ejemplo, factores orgánicos de crecimiento.^{1,24,25}

Cuando el propio cultivo bacteriano tiene como objetivo distinguir entre diferentes tipos de bacterias se utiliza un medio diferencial; si ciertas bacterias están presentes, ciertos componentes del medio proporcionarán cambios visibles al cultivo. Utilizando medios selectivos o enriqueciendo las bacterias a seleccionar y dañando otras bacterias de la mezcla, se puede facilitar la posibilidad de seleccionar determinadas bacterias específicas de su mezcla.¹

A fin de que desde el momento del muestreo hasta que el laboratorio reciba la muestra para su procesamiento, la tasa de supervivencia de los microorganismos debe utilizar un medio de transporte libre de nutrientes, generalmente un semisólido, que permita que las bacterias sobrevivan sin reproducirse.¹

3.3.1 Medios de cultivo para bacterias

3.3.1.1 Agar Soja Trypticase (TSA)

Para estudiar las propiedades de las bacterias, es necesario obtener cultivos puros de ellas. Para ello, los laboratorios de microbiología utilizan medios de cultivo, uno de los más utilizados es el Agar Soja Trypticase (TSA) (Tryptic Soy Agar).^{26,27}

El Agar Soja Trypticase (TSA) se usa para cultivar una variedad de microorganismos, incluidas bacterias aeróbicas y anaerobios. TSA es un medio universal, comúnmente

conocido como Agar digerido de soja y caseína USP (Agar de soja y caseína digerido), basado en fuentes de proteínas (tripsina). digerido, digerido de proteína de soja) una pequeña cantidad de carbohidratos naturales, cloruro de sodio y sangre de oveja, caballo o conejo desfibrinada al 5%, estéril, proporcionan un excelente medio no selectivo para identificar la reacción de hemólisis de las bacterias.^{26,27}

Las placas de Agar Soja Trypticase sin aditivos se suelen utilizar para el paso de cepas microbianas (bacterias o levaduras). La presencia de Lecitina puede neutralizar la actividad antibacteriana y promover la investigación de los microorganismos en productos o superficies que contienen aldehídos, derivados fenólicos, o ingredientes de amonio cuaternario.^{26,27}

La contribución de caseína y peptona de soja al Agar Soja Trypticase al proporcionar nitrógeno orgánico, especialmente aminoácidos y péptidos de cadena larga, hace que el medio sea muy nutritivo; la presencia de estas peptonas en el medio permite el cultivo de una variedad de aeróbicos y anaeróbicos de rápido crecimiento; así como bacterias del género *streptococcus*, *pneumococos*, *brucella*, *erysipelothrix* y *pasteurella*.^{26,27}

A continuación, la Tabla 2 muestra la composición del agar TSA.

Tabla 2. TSA.^{26,27}

Polisorbato 80 5 g/L	Sodio Tiosulfato 0,5 g/L	Sodio Cloruro 5 g/L
Hisditina 1 g/L	Lecitina 0,7 g/L	Agar 15 g/L
Peptona de Soya 5 g/L	Peptona de Caseína 15 g/L	

Preparación:

Para preparar Agar Soja Trypticase, se deben pesar 40 g de medio comercial deshidratado en una balanza digital. Se disuelve en 1000 ml de agua destilada en un matraz, se deja reposar la mezcla por 5 minutos y luego se mueve a una fuente de calor para disolver el medio. Se debe remover y hervir durante 1 o 2 minutos luego el medio se somete a alta presión a 121° C. Esterilizar en los inóculos durante 15 minutos. Debe enfriarse a 50° C y distribuirse en placas de Petri estériles, cuando solidifique, colocarse boca abajo, ordenarse en una bandeja y almacenarse en el refrigerador. El pH final del medio debe ser de $7,3 \pm 0,2$.

Cabe señalar que el color del medio deshidratado es beige claro y debe almacenarse entre 10-35° C en un lugar seco; al mismo tiempo, el agar preparado es de color ámbar claro. Los platos preparados deben conservarse en el frigorífico (2-8° C) hasta su uso, estos deben alcanzar temperatura ambiente antes de su uso.^{28,29}

3.3.2 Medios de cultivo para Levaduras

3.3.2.1 Glucosado de Sabouraud (SDA)

La mayoría de las levaduras pueden crecer fácilmente en un gran número de medios convencionales en el laboratorio. El medio de Glucosado de Sabouraud (SDA), con o sin antibióticos, es el más utilizado para el aislamiento y su posterior identificación. Para los medios que contienen inhibidores, la incubación se efectúa a temperatura ambiente y para los medios enriquecidos a 37° C. Después de 24-48 horas, se pueden ver colonias características de color blanco o crema, de consistencia opaca, convexas, lisas, brillantes o mate, con un diámetro de 1-3 mm. El aspecto de la colonia es determinante, porque es una particularidad de cada especie en diferentes ambientes,

en cuanto al color, olor y consistencia lo que ayudará a su identificación futura.

Los estudios microscópicos de organismos en cultivo se pueden realizar mediante inspección en húmedo o tinción. La observación microscópica muestra la presencia de blastosporas, pseudohifas, esporas de paredes gruesas, etc., que tienen tamaños y formas características cuando se cultivan en diferentes medios. La presencia de filamentos y esporas de hongos obtenidos en diferentes medios (agar harina de maíz, agar Wolin-Bevis, agar arroz o agar patata-zanahoria) es característica y puede utilizarse para identificar bacterias *Candida albicans* y *Candida dublin*.

La técnica de tubos germinativos es la prueba más utilizada para la identificación de especies *Candida albicans* y *Candida dublin*; es una prueba económica, sencilla y rápida, al ser observada una porción de esta prueba en el microscopio, se identifica *Candida albicans* y *C. dubliniensis* las cuales forman una prolongación filamentosa conocida como tubo germinal; una desventaja es que aproximadamente el 5% de las cepas de *Candida albicans* no producen tubo germinal y existe la posibilidad de falsos positivos para *Candida tropicalis*, lo que requiere experiencia previa para explicarlo.³⁰

Preparación:

Para preparar dextrosa Sabouraud, se debe pesar 40 g de glucosa, 10 g de peptona, 15 g de agar y 1000 ml de agua destilada. Mezclar todos los ingredientes y ajustar el pH a 5,6. El soluto se disuelve por ebullición; distribuir 20 ml de medio de cultivo en tubos de 25 x 150 mm sin bordes, preferiblemente con tapones de algodón. Se esterilizan en autoclave a 121° C durante 10 minutos; no se debe exceder el tiempo de esterilización en autoclave. Al salir del autoclave, los tubos se inclinan con ayuda de soportes hasta que solidifican en el pico de la flauta.³⁰

3.3.3 Preparación de los medios de cultivo

Los diferentes componentes del medio de cultivo vienen en presentación deshidratada o liofilizada, y solo es necesario disolverlos, separarlos y esterilizarlos mediante la adición de agua. Debe prepararse estrictamente de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Siembra

La siembra de microorganismos consiste en colocarlos en un medio de cultivo celular o artificial adecuado para su metabolismo y reproducción, la técnica de inoculación debe seleccionar un medio adecuado de acuerdo con el protocolo del laboratorio. La condición básica de la siembra es realizarla bajo estrictas reglas asépticas, pues se debe evitar el crecimiento de microorganismos contaminantes en el medio del cultivo.

La inoculación se puede realizar utilizando diferentes instrumentos (asas, hisopos o pipetas) para colocar la muestra en el medio de cultivo. Estos instrumentos se introducen en el medio de cultivo líquido o semisólido en el tubo, o distribuyendo la muestra en una placa de Petri. Este procedimiento obtiene un cultivo de microorganismos para aislar o trasplantar los microorganismos contenidos en la muestra.

Aislamiento

Cuando se siembran materiales a partir de muestras clínicas, se suelen obtener cultivos mixtos, y es fundamental separar diferentes tipos de colonias para obtener cultivos puros o cultivos estériles, ya que los cultivos mixtos aportan poca o incluso

información errónea. Solo los cultivos puros pueden desarrollar las características y la receptividad a los agentes antimicrobianos selectivos.

La técnica de aislamiento más utilizada siempre se fundamenta en el empleo de medios sólidos donde los microorganismos producen colonias aisladas; el método de aislamiento más común es:

- A. Siembra por agotamiento por estrías
- B. Siembra por diseminación en superficies
- C. Siembra de diluciones seriadas.^{1,24,25}

3.4 Polimetilmetacrilato (PMMA)

El material con mayor uso en el área odontológica para la elaboración de prótesis y aparatología ortodóncica-ortopédica es el polimetilmetacrilato (PMMA), también conocido como resina acrílica; este material debe contar con excelentes propiedades y características, entre ellas el proporcionar un área alisada que le brinde al paciente mayor comodidad y con esto impedir alteraciones en la mucosa oral, además evitar áreas retentivas que acumulen placa bacteriana. Otra característica es que cumple los requerimientos ideales para su uso en cavidad bucal y sobre todo es un material relativamente económico.³¹

3.4.1 Propiedades

1. Propiedades biológicas:

El PMMA no debe ser tóxico, no presentar sabor u olor desagradable, insoluble e impenetrable por saliva u otras secreciones y fluidos en cavidad bucal y no deberán irritar los tejidos orales.

2. Propiedades físicas:

Las resinas deben tener suficiente resistencia y elasticidad para soportar la fuerza de la masticación y el impacto que produce en la cavidad bucal, deben ser estables en tamaño a los cambios de temperatura y carga. Cuando se utiliza como base de dentadura postiza para el maxilar superior, su gravedad específica debe ser muy baja.

3. Propiedades estéticas:

Los materiales acrílicos deben ser translúcidos, transparentes, aptos para ser pigmentados y no deben cambiar de color o apariencia después de la fabricación del dispositivo protésico.³¹

3.4.2 Procesamiento

Cuando se procesa y manipula dicho material, no producirá sustancias tóxicas o residuos; el mezclado, inserción, forma y activación en la fase de polimerización deberá ser sencillo. Para complicaciones clínicas como supresión de oxígeno,

contaminación de saliva o sangre, debe minimizarse sin impacto final; debe ser fácil de pulir y puede repararse si se fractura.

3.4.3 Generalidades

Las resinas acrílicas son sintéticas y consisten en productos químicos artificiales derivados del polimetilmetacrilato (PMMA). Se caracteriza por la estabilidad del color, inodoro, suficientes propiedades térmicas, estabilidad dimensional, propiedades ópticas y físicas adecuadas para condiciones bucales normales, así como economía y facilidad de procesamiento; este material generalmente se presenta en forma de polvo y líquido.

El líquido está principalmente conformado de monómero de metacrilato o metacrilato de metilo sin polimerizar, y se agrega una pequeña cantidad de hidroquinona como inhibidor, dado que el metacrilato inicia la polimerización cuando se expone a luz ultravioleta, luz visible o calor. Presenta un punto de fusión de -48°C , punto de ebullición de $100,8^{\circ}\text{C}$ y densidad de $0,945\text{ g/ml}$ a 20°C . El polvo o polímero está constituido por micro esferas pre polimerizadas de metacrilato de polimetilo y peróxido de benzoílo como iniciador.

La relación de volumen aceptable de polímero a monómero es 3:1, lo que asegura que el monómero humedezca completamente las partículas de polvo y evita que el monómero excesivo aumente la contracción de la polimerización. Con una proporción de 3:1, la tasa de contracción de volumen se puede limitar a alrededor del 6% (tasa de contracción lineal del 0,5%). Al combinar estos compuestos en proporciones correctas, se origina una masa moldeable con una estructura de red, la cual es colocada en un molde con diversa morfología, se polimeriza y finalmente se limpia, pule y ajusta para en la cavidad oral.³²

En el proceso de combinación polvo-líquido, la reacción comienza a producir una masa que es fácil de manejar la cual recorre cinco etapas:

1. **Arenosa:** Existen pocas interacciones intermoleculares y la mezcla es granular.
2. **Filamentosa:** Cada esfera de polímero es impregnada por el monómero diseminado en ella, conformando una masa elástica y viscosa.
3. **Pastosa:** Se forman muchas cadenas de polímero, pero todavía existen partículas de polímero sin disolver. La mezcla es elástica, lisa y no pegajosa, esta etapa es muy adecuada para el moldeo por compresión.
4. **Gomosa o elástica:** El monómero se evapora penetrando en las partículas sobrantes del polímero. Cuando la pasta se comprime o se estira y se produce una reacción exotérmica, recuperará su forma.
5. **Rígida:** Se forma una masa seca y solidificada ocasionada por la evaporación del monómero.

La polimerización del acrílico se divide en polimerización química o auto polimerización y polimerización térmica o termo polimerizado. Pese a que presentan gran similitud en aspecto ambos tipos de resina, se emplea con mayor frecuencia el acrílico de termo polimerizado para la fabricación de bases protésicas, dadas sus propiedades físicas.³²

El acrílico termopolimerizable está compuesto por peróxido de benzoílo como iniciador de polimerización. Al pasar los 60° C, se activa descomponiéndose en radicales libres. Estos reaccionan con las moléculas de monómero aprovechables para iniciar la polimerización del desarrollo de la cadena, por lo tanto, adicionan moléculas de monómero a la cadena del polímero; la termo polimerización logra que el acrílico pase de una fase gomosa a una fase rígida.⁹

El acrílico autopolimerizable presenta las mismas propiedades químicas que el acrílico

termopolimerizable, la única diferencia radica en el proceso de curado, el cual en el acrílico autopolimerizable es iniciado por aminas terciarias, que son dimetil p-toluidina o ácido sulfónico. La activación se da a temperatura ambiente, y es tan efectivo como el proceso que usa calor. A partir de esta reacción se produce un material con bajo peso molecular, teniendo un impacto negativo en cuanto a resistencia.⁹

Una particularidad del PMMA es la porosidad, que se puntualiza como la presencia de poros superficiales o internos, afectando las propiedades físicas, estéticas e higiénicas de las prótesis. Cuando la temperatura de la resina alcanza o supera su punto de ebullición, estos poros se crean mediante la vaporización de monómeros sin reaccionar y polímeros de bajo peso molecular. La porosidad también puede ser causada por una mezcla inadecuada de polvo y líquido durante la polimerización, presión insuficiente o material insuficiente en el molde.³³

La superficie de las prótesis o aparatología ortopedica-ortodoncica puede ser modificada mediante procedimientos de terminado y pulido para interferir con la adherencia bacteriana.^{9,31,34}

3.5 Nanopartículas de Plata (AgNPs)

La nanotecnología es la manipulación de la materia a una escala nanométrica; es decir materiales por debajo de los 100 nanómetros (nm) (1 nm equivale a 1×10^{-9} metros). Los nanomateriales han tomado gran relevancia en el área de Biomedicina por sus propiedades electrónicas, magnéticas, ópticas y catalíticas; hay dos características relevantes que los distingue de los demás materiales, 1) debido a su tamaño, pueden llegar con mayor rapidez y efectividad a un blanco elegido luego de ser administrados y, 2) la relación área/volumen es mayor que en un material macroscópico, lo cual

permite modificar su superficie con una mayor cantidad de moléculas activas y ofrece una mayor exposición del nanomaterial ante el blanco elegido.³⁴

Las nanopartículas son nanomateriales cuya dimensión oscila entre 1 y 100 nm, las cuales pueden ser sintetizadas por diversos métodos químicos, físicos o biológicos, con grandes propiedades antimicrobianas contra un amplio espectro de bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, protozoos, virus y hongos; buena conductividad iónica, actividad catalítica y considerable estabilidad química. En la actualidad existen nanopartículas de una gran variedad de metales y óxidos metálicos, entre las que destacan de Oro, Plata, Dióxido de Titanio, Cobre, Óxido de Zinc, Óxido de Hierro y Oxido de Zirconio.^{34, 35}

Las nanopartículas de Plata (AgNPs) son materiales nanoestructurados a base de sales de Plata; el tamaño de las nanopartículas de Plata está en el rango de 1 a 100 nm. Por sus propiedades antimicrobianas, las AgNPs se han agregado a insumos médicos, entre ellos destacan los vendajes, complementos alimenticios y sondas; en el ámbito dental han sido incorporadas a resinas dentales, adhesivos e implantes. La microscopía electrónica ha estudiado sus propiedades físicas y eléctricas, la alta conductividad eléctrica y térmica, obteniendo un rendimiento aumentado debido a un tamaño menor de nanopartícula con lo cual se mejora la estabilidad, así como sus efectos antimicrobianos en comparación con partículas más grandes.³⁵

Diversas investigaciones han estudiado las propiedades antimicrobianas de las Nanopartículas de Plata en virus y bacterias. Se ha confirmado que tiene un amplio efecto sobre las bacterias *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y otras bacterias; además, las nanopartículas de Plata tienen un efecto sobre el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1.³⁶

Las nanopartículas de Plata han ingresado al campo de la biotecnología y la biomedicina por su potencial antimicrobiano. El mecanismo de acción no es del todo conocido; estudios sugieren que los iones de Plata interfieren con la permeabilidad de la membrana celular; una vez que ingresan a la célula, alteran el proceso de respiración, cambian su sistema enzimático, inhiben su metabolismo, producción de energía y cambian su material genético. El resultado es que los microorganismos pierden rápidamente toda la capacidad de crecer y reproducirse. Además, los estudios han demostrado que es poco probable que los microorganismos desarrollen algún tipo de resistencia al tratamiento.³⁶

3.5.1 Método de síntesis

Existen diversos métodos que permiten obtener nanopartículas de Plata, como los métodos físicos, químicos y biológicos, los cuales permiten obtener nanopartículas monodispersas, estables, de alta pureza, de diversa morfología y tamaño.³⁷

Los métodos físicos son procesos en los que no se dan transformaciones químicas, se inicia con el material del cual se quieren obtener las nanopartículas. Los métodos químicos conllevan reacciones químicas, en las que se reducen los iones metálicos para obtener nanopartículas metálicas o de polimerización de óxidos metálicos para obtener nanopartículas de óxidos metálicos Y los métodos biológicos, los cuales son más amigables con el medio ambiente y menos costosos, empleando organismos como plantas, hongos, algas y bacterias.

El método tradicional de obtención de nanopartículas de Plata es la reducción química, teniendo un precursor metálico el cual será reducido utilizando un agente reductor como borohidruro, citrato, ascorbato o hidrógeno elemental. La reducción de iones de Plata en la solución acuosa generalmente da como resultado nanopartículas

nanométricas. Cuando las partículas coloidales son mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz visible, obtendrá una solución amarilla.³⁸

La síntesis verde o ecoamigable, ha sido recientemente investigada por su bajo costo de producción, utiliza menos reactivos que otras vías de síntesis, se lleva a cabo a temperatura ambiente, no requiere equipos especiales y tiene buenas propiedades, así como estabilidad química. La síntesis verde es la síntesis que utiliza agentes reductores de organismos (generalmente plantas o microorganismos).³⁹

Los extractos de las partes de las plantas (hoja, tallo o raíz) y de hongos o bacterias se utilizan como agentes reductores y mediadores para el tamaño y la forma de las AgNPs. Las características sobresalientes del uso de varias especies de plantas de la familia *Pelargonium* para sintetizar AgNPs son la alta estabilidad del producto y el tamaño y la forma uniforme de las nanopartículas en la solución.³⁹

3.6 Nanopartículas de Cobre (CuNPs)

Durante siglos, los beneficios del Cobre se han reconocido en la desinfección de suministros quirúrgicos, ropa y otros instrumentos. Además, también se utiliza como antibiótico puesto que no provoca reacciones adversas al cuerpo humano como otros metales. El Cobre se registró como el primer material antibacteriano sólido y su disponibilidad lo convirtió en una opción importante como agente antibacteriano. Por tanto, este mineral puede atacar una variedad de microorganismos, incluso cepas bacterianas resistentes a otros compuestos.⁴⁰

Las nanopartículas de Cobre (CuNPs) han sido empleadas en la ciencia médica para

la fabricación de tubos traqueales, aprovechando con esto sus propiedades bactericidas, previniendo o reduciendo infecciones ocasionadas por la producción de biopelículas.⁴⁰

Las CuNPs son capaces de privar el desarrollo de microorganismos; el mecanismo de acción se debe al tamaño y forma de las partículas, así como a la liberación de sus iones y su interacción con la pared celular bacteriana. Dentro de sus particularidades se encuentra una gran actividad antibacteriana, así como la emisión de iones durante un amplio periodo.⁴⁰

El mecanismo de acción de estas nanopartículas no ha sido del todo definido, dado que tiene altos potenciales de oxidación y reducción, debido a la capacidad de proporcionar y aceptar electrones. Derivado de sus peculiaridades electroquímicas, altera directamente las proteínas en las células microbianas, evitando que completen su metabolismo. La actividad del Cobre sobre los microorganismos está en función de su concentración, impidiendo con ello su reproducción o bien utilizándose como sustancia bactericida.^{40,41}

Su eficacia contra bacterias ha sido demostrada, principalmente sobre *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexneri*, y *Staphylococcus aureus*. Diversos estudios han demostrado que la actividad inhibidora de estas nanopartículas frente a bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, ha dado mejores resultados en comparación a los demostrados por los hongos como *Candida albicans*.⁴¹

3.6.1 Método de Síntesis

Las CuNPs se han sintetizado mediante diversas técnicas, estas técnicas permiten el

control de tamaño pudiendo tener morfologías variables como nanocubos, nanobarras, nanoesferas, etc.; teniendo en cuenta variables como: relación molar, temperatura, pH, velocidad de agitación, etc.

Las nanopartículas pueden obtenerse mediante diferentes métodos de síntesis, como lo son microemulsión, deposición al vacío, de poliol y descomposición térmica; el tamaño y la forma de las nanopartículas está supeditado por la concentración de Cobre.^{41,42}

3.6.1.1 Microemulsión

El método consta de tres fases, iniciando con la acuosa, seguida de la orgánica y por ultimo un tensoactivo. La estructura interna de una microemulsión, está determinada por la relación de sus componentes a una temperatura controlada. Dicha estructura se conforma por partículas esféricas; en el entendido que, de acuerdo al incremento de concentración de la parte orgánica, resultará una fase bicontinua. Así mismo, si la concentración de la fase orgánica es mayúscula, detonará en una microemulsión inversa.^{42,43}

3.6.1.2 Deposición al Vacío

Este método consiste en evaporar sólidos metálicos seguido de una condensación rápida, formando agregados atómicos de tamaño nanométrico, de los que pueden resultar polvos metálicos. Con este método se puede controlar la morfología y el tamaño de las nanopartículas.^{42,43}

3.6.1.3 Poliol

Esta síntesis permite obtener nanopartículas monodispersas en carencia de atmósfera inerte, para ello se emplea un disolvente no acuoso que minimice la oxidación de la superficie del Cobre. Con este método se puede controlar la cinética de reacción y la distribución del tamaño de partícula modificando los parámetros de reacción, como temperatura de reacción, velocidad de inyección de los reactivos precedentes y la proporción de agente reductor.^{42,43}

3.6.1.4 Descomposición Térmica

Con este método es posible obtener nanopartículas con morfología uniforme y monodispersas. El material procedente del metal se agrega a una solución tensoactiva, mientras el crecimiento de la nanopartícula se lleva a la temperatura de reacción más alta, produciendo la nucleación.

Es necesario emplear un agente protector y un precursor para que las CuNPs no se oxiden con facilidad; el agente protector controla su crecimiento y previene la oxidación de la superficie de las nanopartículas. El agente precursor controla el tamaño de las nanopartículas. Con esta síntesis se obtienen nanopartículas con un tamaño de 10 nm a partir del material precursor Oxalato de Cobre (CuC_2O_4) a 400°C .^{42,43}

3.7 Nanopartículas de Óxido de Zinc (ZnONPs)

El Óxido de Zinc (ZnO) es un material semiconductor del grupo II-VI, que existe en los minerales de la naturaleza denominado Zincita y se puede obtener a partir de él

mediante tecnología simple y de bajo costo. Actualmente, es uno de los semiconductores más estudiados, ya sea en términos de mejora de nuevas tecnologías de crecimiento que aporten nuevas propiedades físicas, o en términos de investigación de posibles aplicaciones técnicas, existe un gran interés tecnológico en estructuras de baja dimensión. El ZnO en forma de nanoestructuras con una variedad de morfologías se ha obtenido a través de diferentes métodos de crecimiento, este tipo de nanoestructuras van desde formas simples como nanopartículas, nanocables, nanopilares y nanocinturones hasta estructuras con formas más complejas como nano flores.⁴⁴

El Óxido de Zinc tiene propiedades físicas y químicas únicas, como alta estabilidad química, afinidad electrónica, rango de absorción de radiación y estabilidad a la luz. Es un candidato ideal para innumerables aplicaciones; es un material que se ha utilizado en diversas aplicaciones, como catalizadores, adsorbentes, etc. Tiene las características de buena retención de brillo, baja resistividad, no tóxico y riqueza natural, es una característica importante de los materiales optoelectrónicos y piezoeléctricos.^{44,45}

El mecanismo de acción de esta nanopartícula no se ha establecido por completo. Algunas investigaciones sugieren que la carga positiva de las nanopartículas se une a la carga negativa de las membranas celulares interactuando con los lípidos de esta, desintegrando la membrana. Otra hipótesis sugiere que se debe a la toxicidad de los iones metálicos libres conformados por la disolución de metales en la superficie de las nanopartículas y el oxígeno activo generado por el estrés oxidativo (ROS).⁴⁶

Las nanopartículas de Óxido de Zinc (ZnONPs) tienen muchas aplicaciones, una de ellas es el desarrollo de catalizadores utilizados en el campo médico. También en el campo farmacéutico, debido a las propiedades antibacterianas de las suspensiones de nanopartículas de Óxido de Zinc, se utilizan para el etiquetado de células y la

administración de fármacos, cosméticos, filtros UV y colorantes, han incorporado estas nanopartículas en sus ingredientes. Actualmente se utiliza como agente antibacteriano en formulaciones a micro y nanoescala y se considera no tóxico, bioseguro y biocompatible.⁴⁵

3.7.1 Método de síntesis

Sintetizar nanopartículas con formas y tamaños uniformes a través de una ruta simple es el principal problema en la obtención de las nanopartículas; los científicos han participado en el avance de nuevas rutas sintéticas, que pueden controlar con precisión la morfología y el tamaño de las nanopartículas. Su síntesis se puede realizar de las siguientes formas: líquida (método químico), sólida o gaseosa. Debido a sus varias ventajas en comparación con otros métodos, los métodos químicos se han convertido en el método más popular debido a sus rutas sintéticas de bajo costo, seguras y respetuosas con el medio ambiente, y este método puede controlar estrictamente el tamaño y la forma de las nanopartículas.⁴⁷

Utilizando diferentes métodos de síntesis, diferentes parámetros y diferentes condiciones de crecimiento, como temperatura, presión, índice de hidrólisis y precursores, se puede lograr diferentes formas de ZnONPs, como nanoesferas, nanotubos, nanovarillas, nanocintas, nanocables, etc.⁴⁷

Estos métodos incluyen: deposición de vapor químico de metales orgánicos, síntesis hidrotermal, evaporación térmica a través de procesos sólido-vapor-líquido asistidos por catalizador y oxidación de polvo de zinc metálico. Además, la síntesis de ZnONPs depende en gran medida de si se utilizan en sistemas biológicos y / o no biológicos. En términos generales, estos métodos se dividen en dos rutas principales de síntesis de nanopartículas: síntesis en fase gaseosa y en fase de solución.⁴⁷

Generalmente, se requieren nanopartículas con una alta relación superficie / volumen, pero sin ningún estabilizador, la aglomeración de pequeñas partículas precipitadas en la solución es el principal problema. En este sentido, una preparación coloidal estable es muy importante para su crecimiento. Además, debido a la presencia de tensoactivos, moléculas de polímero o cualquier molécula orgánica adherida a la superficie de las nanopartículas, generalmente se estabilizan mediante repulsión estérica entre las partículas.⁴⁷

3.8 Técnicas de caracterización

Las características estructurales de un material están relacionadas con sus propiedades físicas y químicas; por lo tanto, una comprensión detallada de su microestructura puede explicar, controlar y predecir sus propiedades. La microscopía electrónica es una herramienta ideal para analizar la estructura local de sólidos a escala de celda unitaria y comprender sus cambios periódicos, y es un complemento a la estructura promedio estadística observada por otras técnicas.⁴⁸

El microscopio electrónico utiliza un haz de electrones con un voltaje de aceleración entre 20 y 100 Kv. Existen dos tipos básicos de microscopios electrónicos: **Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)**, (SEM por sus siglas en inglés) y **Microscopio Electrónico de Transmisión (MET)**; (TEM por sus siglas en inglés).

3.8.1 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un equipo indispensable para la caracterización de la microestructura de los materiales metálicos. El principio de funcionamiento del microscopio lo proporciona el haz de electrones del filamento, que se acelera mediante una serie de lentes electromagnéticas y se enfoca en la muestra. El haz de electrones barre la superficie de la muestra, generando una imagen de la morfología de la superficie, similar a la imagen formada por el ojo humano. Teniendo en cuenta la interacción de estos electrones con la muestra, se pueden recolectar y amplificar fácilmente una serie de señales, de manera que se puede obtener información desde la perspectiva de la morfología y composición química.⁴⁸

Bajo el impacto de los electrones, el fenómeno más importante que ocurre en la muestra es la emisión de electrones secundarios con energía de decenas de eV, seguida de la emisión de electrones retro dispersados con mayor energía. De igual forma, se produce otra emisión cuando el haz de electrones interactúa de forma inelástica con una muestra generando rayos X característicos de energía y longitud de onda de los elementos que componen la muestra, lo que permite la identificación y el valor de la concentración del elemento presente.^{48,49}

En la espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (EDS), se mide el número y la energía de los rayos X emitidos por la muestra después de que el haz de electrones penetra en la muestra.^{48,49}

El haz de electrones excita los electrones en la capa interna del átomo para hacer que emerja a la capa superior para generar pares de electrones y agujeros; los agujeros ocupan los electrones en la capa exterior y liberan energía en forma de rayos X. La energía de los rayos X es la diferencia de energía entre las dos capas y la estructura

atómica de los elementos que las emiten, por lo que el análisis de rayos X puede determinar la composición elemental de la muestra.^{48,49}

Para utilizar los rayos X emitidos para formar la imagen final, se utiliza un detector, cuyo principio es el mismo que el de los electrones secundarios; la imagen será un mapa de distribución de elementos, donde el cambio de contraste refleja la concentración del elemento seleccionado. Con la ayuda de un software, se realiza un análisis cualitativo y semicuantitativo, y en el gráfico se muestra la composición porcentual de los elementos manifestados en la muestra.⁴⁹



Figura 4. Esquema del Microscopio Electrónico de Barrido

3.8.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) estudia catalizadores basados en nanopartículas metálicas dispuestas sobre materiales porosos, de modo que las nanopartículas se puedan observar directamente, evitando imponer suposiciones físicas y matemáticas; de manera similar, se puede medir el diámetro de partículas discretas, así como el tamaño medio de partícula.⁴⁹

TEM utiliza haces de electrones de alta energía de 100 a 200 keV para pasar a través de una muestra de espesor reducido; estos electrones se dispersan, transmiten y

causan interacción, lo que resulta en fenómenos como la emisión de luz y rayos X; mediante el uso de la transmisión dispersa de electrones, la imagen generada proporciona información sobre la estructura interna de un sólido y permite acceder a detalles de la microestructura que no son familiares para el ojo humano.⁴⁹

Para que los electrones sean transmitidos a través de la muestra, debe prepararse una capa delgada, que sea transparente a los electrones y tenga un grosor inferior a 100 nm; la irradiación de electrones proporciona imágenes con alta resolución espacial, con una resolución inferior a 0,1 nm.⁴⁹

Usando TEM, se puede obtener el patrón de difracción de electrones del área seleccionada y, al mismo tiempo, se puede realizar el análisis de elementos del área visualizada. Por lo tanto, puede combinar la adquisición de patrones de difracción e imágenes y proporcionar información sobre la verdadera composición de cada material en varios números atómicos. La información obtenida de la imagen y el patrón de difracción es complementaria, y su análisis en conjunto permite la correcta interpretación de los resultados.⁴⁸

Microscopio electrónico de transmisión (MET)



Figura 5. Esquema del Microscopio Electrónico de Transmisión

4. Planteamiento del problema

La salud bucal consiste en mantener en un estado funcional las estructuras que componen al aparato estomatognático. Sin embargo, cuando el equilibrio en los tejidos se ve afectado, es necesaria la utilización de aparatología que mantenga un estado óptimo de oclusión, estética, y función.^{50,51}

En la actualidad; la mayoría de las prótesis, placas y aparatos ortopédicos-ortodóncicos; cuentan con una base de polimetilmetacrilato, la cual es utilizada en boca durante todo el día, convirtiéndose en un reservorio importante de microorganismos y alimentos que están generando el aumento en la carga bacteriana en la totalidad de la cavidad oral; volviéndose un factor desencadenante para la presencia de alteraciones bucales, especialmente cuando estas prótesis o aparatos se encuentran inadaptados, ocasionando diversos malestares en los pacientes portadores, resultando sumamente delicado en aquellos inmunocomprometidos.^{22,51} Lo anterior, se traduce en una incidencia de patologías, que a nivel epidemiológico son consideradas con una gran ocurrencia en la consulta odontológica.

Hoy en día, los alcances en la nanociencia permiten contar con materiales nanoestructurados, como las nanopartículas de Plata, Cobre y Óxido de Zinc, que reúnen propiedades antimicrobianas, empleadas como método preventivo para el desarrollo de infecciones ocasionadas por microorganismos.

No obstante, a los avances tecnológicos en el campo de los materiales dentales, se ha comprobado que la porosidad es un enorme problema del polimetilmetacrilato. La presencia de poros superficiales o internos pueden comprometer las propiedades físicas, estéticas e higiénicas de una prótesis, provocando que se adhieran grandes

cantidades de microorganismos principalmente *Streptococcus*, y, por ende, provocando infecciones bucales y micosis.³³

De la problemática planteada anteriormente, surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál será el efecto que presentará el polimetilmetacrilato de uso odontológico recubierto con nanopartículas de Plata, Cobre y Óxido de Zinc?

5. Justificación

El PMMA es una resina acrílica de uso frecuente en odontología para la elaboración de prótesis y aparatología ortodóncica, las cuales están en contacto con tejidos blandos y saliva durante periodos prolongados, originando diferentes respuestas de la mucosa oral, debidas tanto a factores mecánicos como factores químicos e incluso a microbiológicos. Es necesario poder modificar el PMMA para evitar alteraciones en cavidad oral sobre todo aquellas que se desarrollan por la adherencia de microorganismos a dicho material.^{50,51}

Esta investigación surge de la necesidad de contar con un material que posea propiedades antimicrobianas el cual al ser adicionado al PMMA disminuyera la carga bacteriana, reduciendo la presencia de infecciones bucales, micosis, candidiasis, enfermedad periodontal, lesiones en tejidos blandos en pacientes portadores de prótesis; así mismo en los pacientes portadores de aparatología ortodóncica se disminuiría la acumulación de placa bacteriana, presencia de caries, mal aliento e incluso la pérdida de órganos dentarios.^{33,52}

Hoy en día se cuenta con nanomateriales como nanopartículas de Plata, Cobre y Óxido de Zinc, que poseen propiedades antimicrobianas las cuales pueden emplearse para recubrir al PMMA y evitar alteraciones de tipo bacteriano en cavidad bucal.^{36,40,46}

Se han incorporado las nanopartículas a diversos materiales, siendo la excepción el PMMA; por lo tanto al ser este recubierto con dichas partículas, se supondría una menor adherencia al Polimetilmetacrilato; aunque se encuentra cierta desventaja en las nanopartículas tanto de Plata como de Cobre, debido al cambio de color que podría producir en el material; por lo que respecta a las nanopartículas de Óxido de Zinc, no han sido empleadas en recubrimientos, considerando como gran ventaja su color y sobre todo su efecto antimicrobiano, ya que al no alterar la coloración del PMMA,

se convertiría en la opción más viable a utilizar.

Es necesario realizar investigación *in vitro* en ciencias básicas que aporte información trascendente para el odontólogo, lo cual representaría un avance en la odontología para que posteriormente sea utilizado clínicamente.

6. Hipótesis

Hipótesis de Trabajo:

El PMMA de uso odontológico recubierto con nanopartículas de Plata, Cobre u Óxido de Zinc, presentará un efecto favorecedor en las propiedades del material estudiado.

Hipótesis Nula:

El PMMA de uso odontológico recubierto con nanopartículas de Plata, Cobre u Óxido de Zinc, no presentará ningún efecto en las propiedades del material en comparación con el grupo control.

7. Objetivos

General

Analizar el efecto del recubrimiento de polimetilmetacrilato (PMMA) de uso odontológico con nanopartículas de Plata, Cobre y Óxido de Zinc mediante la caracterización con Microscopia Electrónica de Barrido (SEM), Espectroscopía de Dispersión de Energía (EDS) y pruebas microbiológicas

Específicos

- Sintetizar nanopartículas de Plata (AgNPs), Cobre (CuNPs) y de Óxido de Zinc (ZnONPs) mediante la síntesis química con Borohidruro de sodio como agente reductor.
- Recubrir los bloques de polimetilmetacrilato (PMMA) con las nanopartículas antes mencionadas mediante la técnica de T. Bala.^{53,54}
- Examinar el comportamiento de los bloques de PMMA recubiertos con AgNPs, CuNPs y ZnONPs mediante la evaluación de la distribución y análisis elemental por Microscopia electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopía de Dispersión de Energía (EDS) determinando su presencia en superficie, así como la proporción de los elementos presentes.
- Realizar el cultivo, siembra y ensayo bacteriológico de los microorganismos, colocar los bloques de PMMA e incubar las placas.

- Comprobar el efecto antimicrobiano de los distintos grupos experimentales de PMMA con AgNPs, CuNPs y ZnONPs sobre *S. aureus*, *C. Albicans* y *E. Coli*, mediante el recuento de los halos inhibitorios.
- Comparar el efecto antimicrobiano de los distintos grupos experimentales de PMMA con AgNPs, CuNPs y ZnONPs sobre *S. aureus*, *C. Albicans* y *E. Coli*.
- Identificar los grupos experimentales con mayor inhibición microbiológica y los que tengan menor inhibición microbiológica.

8. Materiales y método

8.1 Diseño metodológico

Diseño de estudio: Estudio experimental

Universo: Polimetilmetacrilato (PMMA)

Muestra: 240 bloques de PMMA dividido en 8 grupos experimentales

Muestreo: Probabilístico

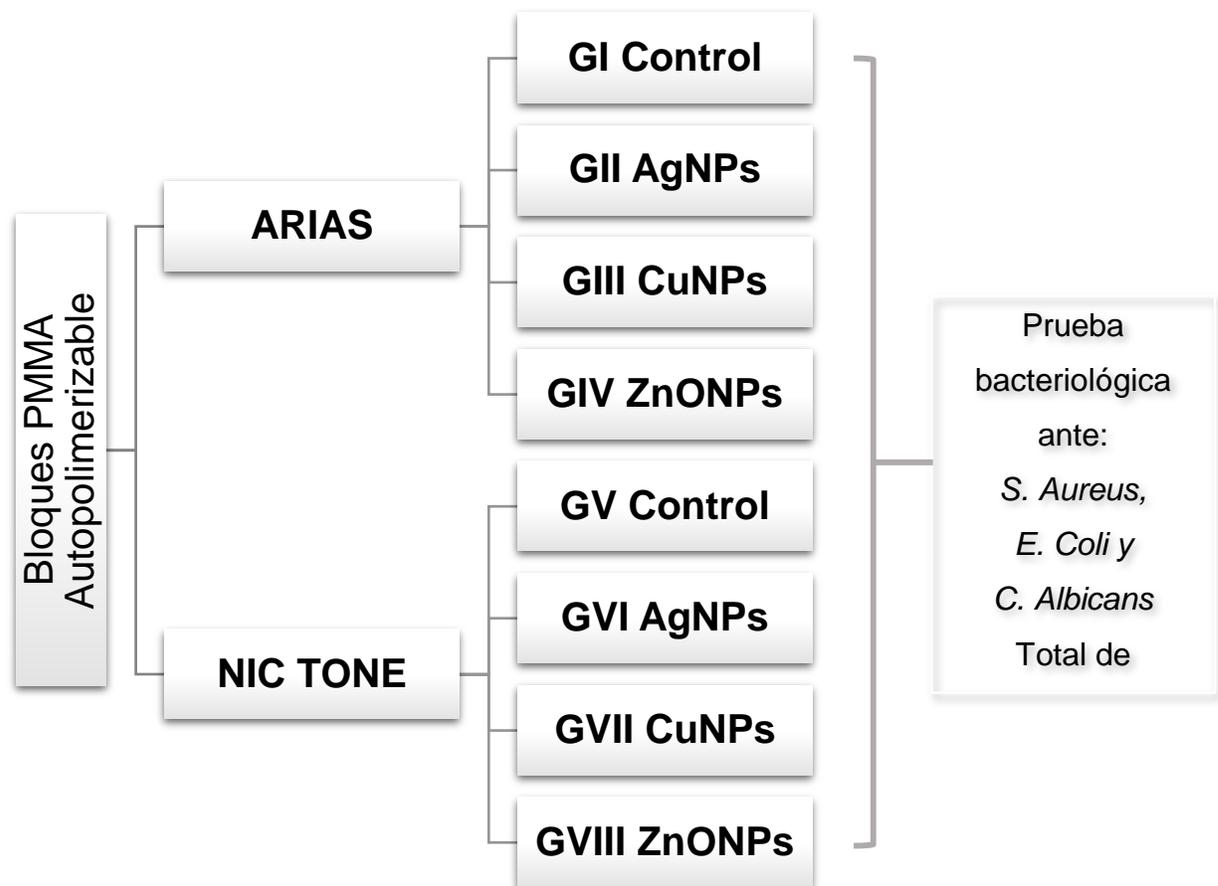


Figura 6. Representación de los 8 grupos experimentales

8.2 Criterios de selección

Criterios de Inclusión:

- Monómero y polímero de marcas comerciales antes mencionadas, nuevos y en buen estado, almacenados correctamente.
- Bloques de PMMA de 2 marcas comerciales de auto polimerizado convencionales cilíndricos con medidas de 5mm de diámetro por 2mm de profundidad.
- Bloques de PMMA que se observen íntegros estructuralmente mediante la inspección visual.
- Bloques de PMMA que al ser observados por SEM de manera aleatoria contengan nanopartículas de Plata, Cobre u Óxido de Zinc en superficie.

Criterios de Exclusión:

- Monómero o polímero que haya expirado fecha de caducidad.
- Bloques de PMMA que muestren irregularidades en la superficie, contracción y cambios de coloración visibles a simple vista.

Criterios de eliminación:

- Bloques de PMMA con fisuras, alteración accidental de la superficie o contaminación derivadas del proceso.

8.3 Operacionalización de las variables

Variable Dependiente	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de Medición	Unidad de medida
Efecto inhibitorio de bloques de PMMA contra <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>C. albicans</i>	Acción de una enzima para impedir el crecimiento de agentes patógenos o la corrección de un desequilibrio metabólico. ⁵⁵	Milímetros cubiertos por la zona de inhibición generada por los bloques de PMMA con AgNPs, CuNPs y ZnONPs	Cuantitativa continua	Escala de razones	mm

Variable Independiente	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de Medición	Unidad de medida
ARIAS	Polímero a base de polimetacrilato de metilo de gran aplicación en odontología. ³¹	Resina acrílica autopolimerizable Arias RV	Cualitativa Nominal	Escala nominal	Bloques cilíndricos de 5mm de diámetro por 2mm de profundidad.
NIC TONE	Polímero a base de polimetacrilato de metilo de gran aplicación en odontología. ³¹	Resina acrílica autopolimerizable NicTone R2V	Cualitativa nominal	Escala nominal	Bloques cilíndricos de 5mm de diámetro por 2mm de profundidad.
Nanopartículas de Plata (AgNPs)	Partículas coloidales sólidas con un rango de tamaño de 1 a 100 nm. derivadas de las sales de nitrato de Plata. ³⁸	Nanopartículas de Plata sintetizadas por método químico	Cuantitativa	Escala de razón	5-70 nm

Variable Independiente	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de Medición	Unidad de medida
Nanopartículas de Cobre (CuNPs)	Partículas coloidales sólidas con un rango de tamaño de 3 a 100 nm. derivadas de Sulfato de Cobre. ¹¹	Nanopartículas de Cobre sintetizadas por método químico	Cuantitativa	Escala de razón	3-100 nm
Nanopartículas de Óxido de Zinc (ZnONPs)	Partículas coloidales sólidas con un rango de tamaño de 3 a 100 nm. derivadas de Acetato de zinc. ⁴⁶	Nanopartículas de Óxido de Zinc sintetizadas por método químico	Cuantitativa	Escala de razón	3-100 nm

<i>Variable Independiente</i>	<i>Definición conceptual</i>	<i>Definición operativa</i>	<i>Tipo de variable</i>	<i>Escala de Medición</i>	<i>Unidad de medida</i>
Análisis de los bloques de PMMA por SEM/EDS	Serie de señales que permiten obtener información morfológica y composición química de los elementos presentes en una muestra. ⁴⁸	Proporción de los elementos manifestados en la muestra durante análisis EDS por SEM, (Carbono, Oxígeno, Plata, Cobre, Óxido de Zinc)	Cuantitativa continua	Razón	Por ciento en peso atómico

8.4 Equipo y materiales

Etapa 1

Instrumental y Material

- Molde de teflón con cavidades cilíndricas de 5mm de diámetro por 2mm
- Resina acrílica autopolimerizable Arias RV (Arias plus, México, Lote 1018000009)
- Resina acrílica autopolimerizable NicTone R2V (MDC Dental, México, Lote 170619144)
- Portaobjetos (Portaobjetos de vidrio para Microscopio con pantalla, esmerilados, 25x75mm, Madesa, México)
- Gasas Estériles (Gasa simple esterilizada con óxido de etileno, 10cm x 10cm doblada, Dibar, México)
- Gotero (BM, México)
- Godetes (BM, México)
- Espátula 7a metálica (Hu-Friedy, USA)
- Espátula para Cemento (Hu-Friedy, USA)
- Tijeras iris curva (Hu-Friedy, USA)
- Pinza de curación (Hu-Friedy, USA)
- Mango de bisturí 4 (Hu-Friedy, USA)
- Hoja de bisturí #11(Hu-Friedy, USA)
- Papel filtro Whatman #42 (Papel filtro de 110 mm de diámetro, GE Healthcare, USA)

- Matraz aforado de 100 ml., 200 ml., 250 ml. (Kimax Kimble, USA)
- Vaso de precipitado de 150, 250 Y 500 ml. (Kimax Kimble, USA)
- Piceta de 500 ml. (BM, México)
- Barra agitadora magnética (SP scienceware, USA)
- Termómetro 260°C (Brannan, UK)
- Frasco de vidrio color ámbar (BM, México)
- Frasco de vidrio con tapa (BM, México)
- Lentes de protección (Grainger, México)
- Cubre bocas (Mascarillas quirúrgicas de tres pliegos con filtro antibacterial, Ambiderm, México)
- Guantes estériles (Guantes quirúrgicos Uniseal, Guilin HBM Healthcare, China)

Equipo

- Balanza Analítica (Explorer Pro Model EP213C, OHAUS Co).
- Sonicador (Branson Ultrasonic Cleaner 2510)
- Parrilla electromagnética de agitación (Thermo Scientific Cimarec)
- Microscopio Electrónico de Escaneo (SEM) (JEOL, JSM-6510LV)

Sustancias

- Agua destilada (Agua destilada, WOHLER. México)
- Alcohol isopropílico (Éter etílico anhidro, WOHLER. México)

- Ácido oleico (BM, México)
- Metanol (Alcohol metílico RA ACS, Metanol, WOHLER. México)
- Sales de Nitrato de Plata (AgNO_3) (Sigma Aldrich, Germany)
- Sulfato de Cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Sigma Aldrich, Germany)
- Acetato de Zinc dihidratado ($\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma Aldrich, Germany)
- Borohidruro de sodio (NaBH_4) (Sigma Aldrich, Germany)

Etapa 2

Instrumental y Material

- Cepas de *E. Coli*, *S. Aureus*, *Candida Albicans*
- Agar Sal y Manitol (BD Bioxon TM, México)
- Agar MacConkey (BD Bioxon TM, México)
- Agar Biggy (MCD LAB, México)
- Peróxido de Hidrógeno al 30%, sorbitol y manitol para pruebas de susceptibilidad (Productos químicos Monterrey SA., México)
- Placas de Petri; cristal 10 cm (Plato Petri p/Cultivo, Vidrio, Kimax Kimble, USA)
- Tubos estériles y tubos de centrifuga (Tubo Cónico para Centrifuga, Lab Safety Supply, USA)
- Torundas estériles (Algodón absorbente elaborado con fibras 100% de algodón quirúrgico, Protec, México)

- Asas de platino (aguja y asas de inoculación entre 1 y 10 μ L, Fisher Scientific, Madrid)
- Portaobjetos y cubreobjetos (Portaobjetos de vidrio para Microscopio con pantalla, esmerilados, Madesa, México)
- Hisopos con cloruro de sodio 3M (Minnesota Mining and Manufacturing Co, USA)
- Bolsas de esterilización (Medicom, USA)
- Espátulas (Hu-Friedy, USA)
- Gradillas (Gradilla de alambre, CIVEQ, USA)
- Guantes de autoclave
- Cinta termolábil (Cintas auto-adhesivas indicadoras de esterilización, Dentalab, Barcelona)
- Pinzas portatubos (Pinza para tubo de ensaye, CIVEQ, USA)
- Mecheros Bunsen (Mechero Bunsen sencillo, AESA, México)
- Lámpara de alcohol (CIVEQ, USA)

Equipo

- Incubadora bacteriológica (Incubadora Riossa, USA)
- Congelador (Congelador horizontal, Ecoshel, USA)
- Autoclave (All American Portable Pressure Sterilizer No. 1925 Wisconsin USA)
- Balanza analítica (Explorer Pro Model EP213C, OHAUS Co)
- Calibrador de Vernier. (Calibrador digital Digimatic, Mitutoyo, México)

8.5 Método

Etapa 1

- **Preparación de las muestras**

Preparación de los bloques de PMMA: Pesar 2 gr de polvo de la marca Arias (Arias plus, México, Lote 1018000009) y 1 ml de monómero, comenzar a mezclar, colocarla en el molde de teflón, esperar a que se active la fase gomosa o elástica, se retiran los bloques del molde de teflón, después se recortan y almacenan. Realizar el mismo procedimiento con el acrílico Nic Tone (MDC Dental, México, Lote 170619144).

Se elaboraron 240 bloques con un diámetro de 5 mm x 2 mm; los bloques obtenidas se colocaron en frascos de vidrio añadiendo alcohol isopropílico y sonicadas durante 10 min para eliminar impurezas. Se dejaron secar por 12 hrs; posteriormente se esterilizaron con óxido de gas de etileno y se almacenaron en frascos de vidrio estériles.



a. Acrílico NicTone



b. Acrílico Arias



c. Molde de teflón con acrílico



d. Bloques de PMMA



e. Almacenado de las muestras

Figura 7. Preparación de las muestras.

- **Síntesis *in situ***

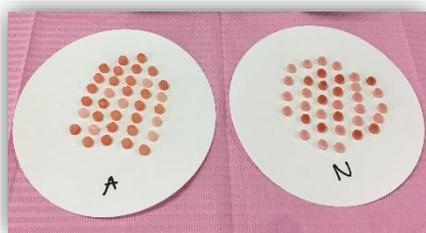
Las Nanopartículas fueron sintetizadas por el método de T. Bala y Jasso *et al.*^{53,54}

- **Síntesis *in situ* de Nanopartículas de Plata:**

Se colocaron los bloques de PMMA en una solución de $1 \times 10^{-2} \text{M}$ de ácido oleico con metanol, la cual se agitó a 500 rpm hasta la evaporación total del metanol, una vez ocurrida la evaporación del metanol se preparó una solución de Sales de Nitrato de Plata (AgNO_3) a una concentración de $1 \times 10^{-2} \text{M}$ añadiéndose a los bloques de PMMA dejándose en agitación durante 24 horas. Pasadas las 24 hrs se inició la reducción mediante la adición de una solución de borohidruro de sodio (NaBH_4) al $4 \times 10^{-2} \text{M}$, dejando reaccionar durante 30 min. Posteriormente, se retiraron las muestras de la solución, se lavaron con agua destilada para eliminar cualquier exceso de reactivo, se dejaron secar, inmediatamente, se almacenaron en frascos de vidrio estériles color ámbar.



a. Ácido oleico y metanol



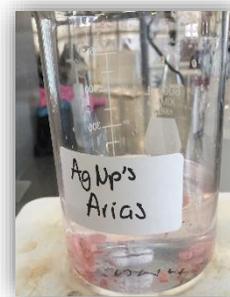
b. Bloques de PMMA



c. Bloques en ácido oleico con metanol



d. Sales de Nitrato de Plata



e. Adición de la solución de Sales de Nitrato de Plata a los bloques de PMMA



f. Borohidruro de Sodio



g. Reducción química



h. Bloques de PMMA con AgNPs



i. Almacenado de las muestras

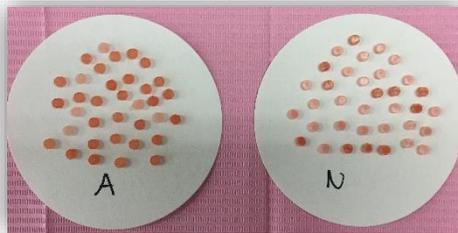
Figura 8. Síntesis *in situ* de AgNPs

▪ **Síntesis *in situ* de Nanopartículas de Cobre:**

Se colocaron los bloques de PMMA en una solución de $1 \times 10^{-2} \text{M}$ de ácido oleico con metanol, la cual se agito a 500 rpm hasta la evaporación total del metanol, una vez ocurrida la evaporación del metanol, se preparó una solución de sulfato de Cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a una concentración de $1 \times 10^{-2} \text{M}$, misma que se añadió a los bloques de PMMA dejándose en agitación durante 24 horas. Pasadas las 24 hrs se inició la reducción mediante la adición de una solución de borohidruro de sodio (NaBH_4) al $8 \times 10^{-2} \text{M}$, dejando reaccionar durante 30 min. Pasando el tiempo establecido, se retiraron las muestras de la solución, se lavaron con agua destilada para eliminar cualquier exceso de reactivo, y se dejaron secar, para posteriormente ser almacenadas en frascos de vidrio estériles color ámbar.



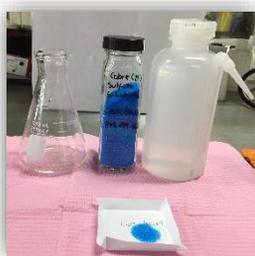
a. Ácido oleico y metanol



b. Bloques de PMMA



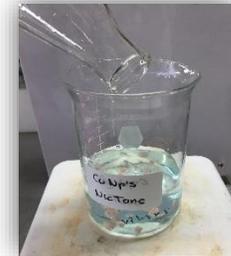
c. Bloques en ácido oleico con metanol



d. Sulfato de Cobre



e. Adición de la solución de Sulfato de Cobre a los bloques de PMMA





f. Borohidruro de Sodio



g. Reducción química



h. Bloques de PMMA con CuNPs



i. Almacenado de las muestras

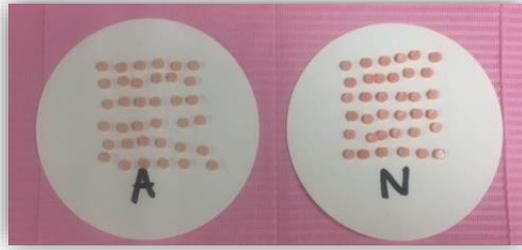
Figura 9. Síntesis *in situ* de CuNPs

▪ **Síntesis *in situ* de nanopartículas de Óxido de Zinc:**

Se colocaron los bloques de PMMA en una solución de $1 \times 10^{-2} \text{M}$ de ácido oleico con metanol, agitándose a 500 rpm, hasta la evaporación total del metanol; una vez ocurrida la evaporación del metanol, se preparó una solución de Acetato de Zinc dihidratado ($\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a una concentración de $1 \times 10^{-2} \text{M}$ la cual se añadió a los bloques de PMMA, dejándose en agitación durante 24 horas. Pasadas las 24 hrs, se inició la reducción mediante la adición de una solución de Borohidruro de sodio (NaBH_4) al $8 \times 10^{-2} \text{M}$, dejando reaccionar durante 30 min. Se retiraron las muestras de la solución, fueron lavadas con agua destilada, para eliminar cualquier exceso de reactivo, se dejaron secar, subsecuentemente, se almacenaron en frascos de vidrio estériles color ámbar.



a. Ácido oleico y metanol



b. Bloques de PMMA



c. Bloques en ácido oleico con metanol



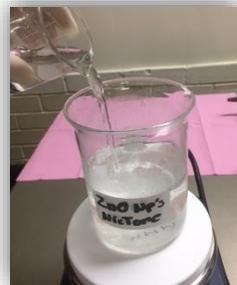
d. Acetato de Zinc



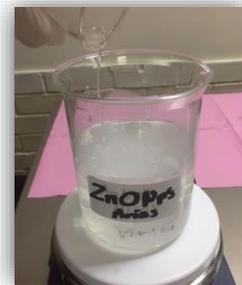
e. Adición de la solución de Acetato de Zinc a los bloques de PMMA



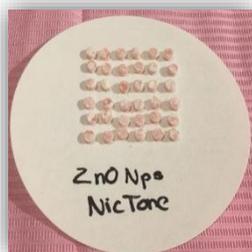
f. Borohidruro de Sodio



g. Reducción química



h. Bloques de PMMA con ZnONPs



i. Almacenado de las muestras

Figura 10. Síntesis *in situ* de ZnONPs

- **Caracterización:**

La distribución y el análisis elemental de los bloques de PMMA impregnados con AgNPs, CuNPs y ZnONPs se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido, determinando su presencia en superficie. Los bloques fueron colocados en el portaobjetos del Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) (JEOL, JSM-6510LV a 20 kV, Tokio, Japón) con una amplificación de 500 a 3000x a una potencia de a 15 kV. Seguido esto, se realizó el análisis químico mediante Espectroscopía de Dispersión de Energía (EDS; Oxford Abingdon, Reino Unido) con una resolución de 127 eV para Ag, 300 eV para Cu.



a. Portaobjetos con muestras



b. Recubrimiento conductor de las muestras



c. Microscopio Electrónico de Barrido



d. . Análisis de las muestras

Figura 11. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y dispersión de energía (EDS)

Esta fase fue llevada a cabo en las instalaciones del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable (CCIQS) de la UAEM-UNAM.



Figura 12. Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM

Etapa 2

- **Análisis del efecto antimicrobiano**

Se emplearon cepas de *E. coli* (CEPA ATCC25922), *S. aureus* (CEPA ATCC25923) y *C. albicans* (Identificada con agar cromogénico) para realizar los ensayos de actividad antimicrobiana.

Preparación de la suspensión e inoculación

Se inocularon las cepas resembradas, colocando las colonias en una nueva caja Petri en un medio específico para cada especie, verificando su viabilidad y forma de cada microorganismo.³⁷

Se preparó el inóculo seleccionando colonias viables, suspendiéndolas en caldo y estandarizando la suspensión. Fue extraída la cepa caracterizada del dial; se realizó la suspensión de las colonias en solución salina estéril ajustando el inóculo al 0.5 de la escala de McFarland. (equivalente a 1.5×10^8 UFC / ml), las colonias fueron aisladas de 18 a 24 horas.



a. Agar Sal y Manitol
S. aureus



b. Agar MacConkey
E. coli



c. Agar Biggy
C. albicans

Figura 13. Medio de cultivo

Se realizó la extracción de la cepa, sembrándola directamente realizando una estría masiva en una caja Petri; de ahí se fue tomando a 90 grados para hacer la siembra en las cajas Petri experimentales.³⁷

Fue colocado uno a uno cada bloque en las diversas cajas Petri, asegurando tener un contacto completo con la superficie del agar, realizando esta etapa por triplicado para cada cepa.

El siguiente esquema representa las cajas Petri con las muestras.

	GI		GV
	GII		GVI
	GIII		GVII
	GIV		GVIII

Figura 14. Identificación de las muestras

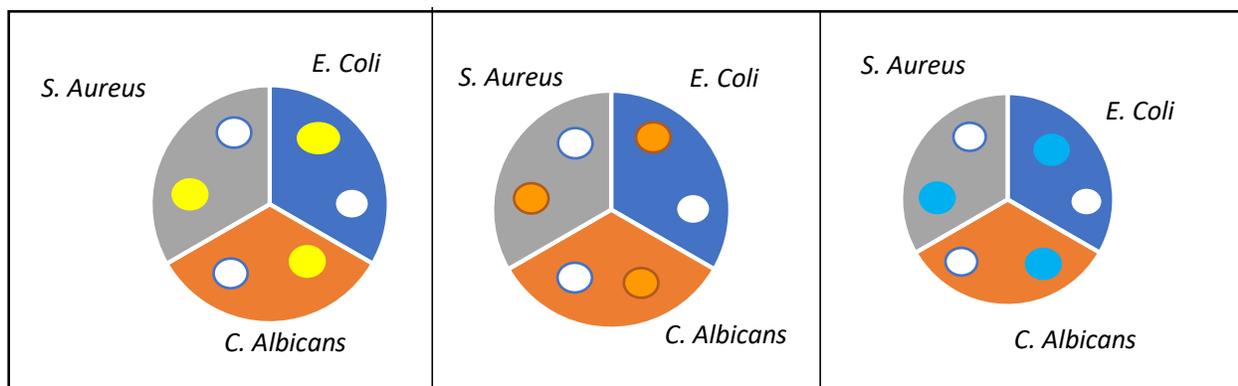


Figura 15. Esquema de cajas Petri con bloques de PMMA Arias impregnados con AgNPs, CuNPs y ZnONPs

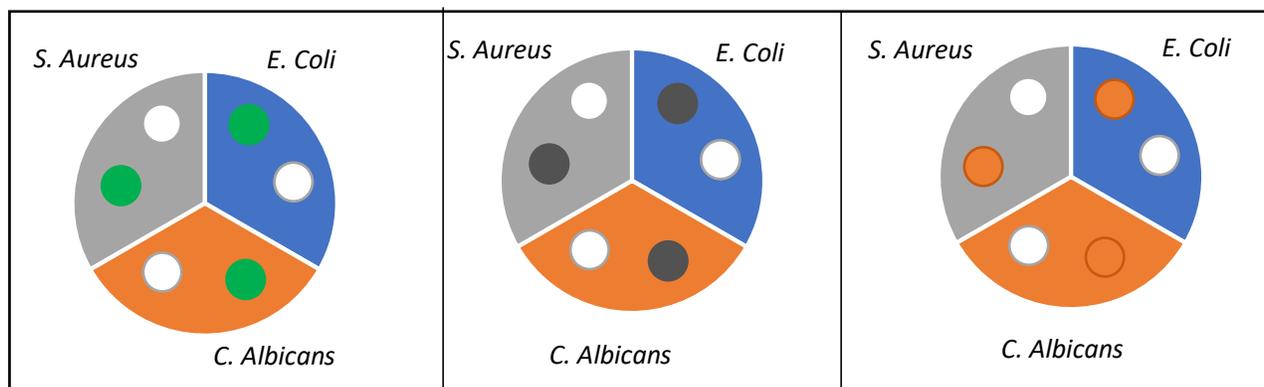
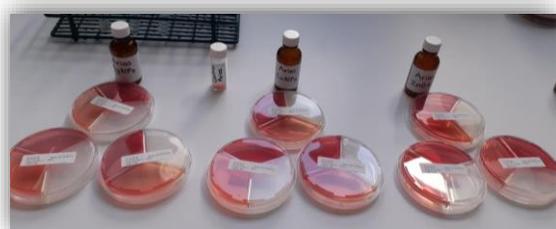


Figura 16. Esquema de cajas Petri con bloques de PMMA NicTone impregnados con AgNPs, CuNPs y ZnONPs



a. Cajas Petri con las tres cepas (Arias)



b. Cajas Petri con las tres cepas (NicTone)



c. Bloques de PMMA (Arias) en las cajas Petri



d. Bloques de PMMA (NicTone) en las cajas Petri

Figura 17. Inoculación y distribución de las muestras

Incubación de la placa

Las cajas Petri fueron incubadas a 36° C en ambiente aerobio durante 72 hrs, en una incubadora Bacteriológica marca RIOSSA.

Medición de zonas de inhibición

Se retiró la placa de la incubadora a las 24 y 72 hrs para realizar la lectura de los halos de inhibición empleando una regla milimétrica.

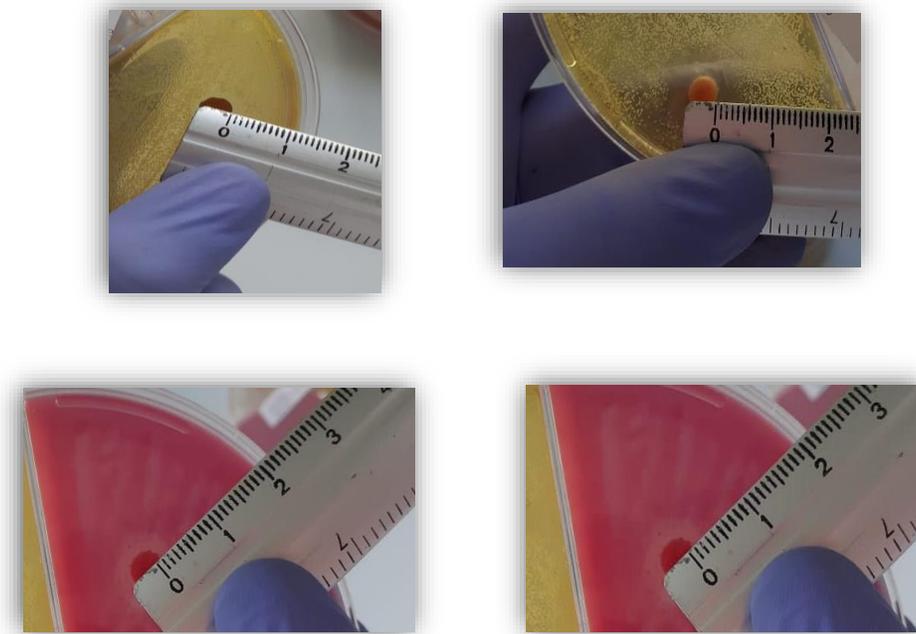


Figura 18. Medición zonas inhibitorias

8.6 Consideraciones bioéticas

El presente trabajo de investigación se realizó bajo la Ley General de Salud, los códigos de bioética Helsinki, CIOMS y sometido a la aprobación del Comité de Ética del CIEAO.

8.6.1 Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud

De acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Artículo 17, la presente investigación se clasifica en Categoría I: Investigación sin riesgo. Título Cuarto Capítulo I Artículo 75 a 84 que hacen referencia a Investigaciones con microorganismos, lineamientos y capacitación para su correcto manejo en el laboratorio de Microbiología, así como los riesgos que se puedan presentar, marcando las bases que deben cubrir las Instituciones debidamente autorizadas con las adecuadas instalaciones para la realización de investigaciones con microorganismos.⁵⁶

8.6.2 Pautas éticas de la CIOMS

Todo proyecto de investigación deberá ser revisado éticamente bajo los principios éticos establecidos en las pautas de la CIOMS, siendo aplicadas al presente proyecto de investigación la pauta 1, 23, 24 y 25, las cuales hacen referencia al valor social y científico de toda investigación, los requisitos del comité de ética al cual será presentado el protocolo para revisión y la no existencia de conflictos de interés.⁵⁷

8.6.3 Declaración de HELSINKI

Toda investigación debe enviarse, para consideración, comentario, consejo y aprobación al comité de ética de investigación pertinente antes de comenzar el estudio. Los investigadores, autores, auspiciadores, directores y editores todos tienen obligaciones éticas con respecto a la publicación y difusión de los resultados de su investigación.⁵⁸

8.7 Análisis estadístico

Se empleó el programa estadístico IBM SPSS v 21 para analizar los datos obtenidos.

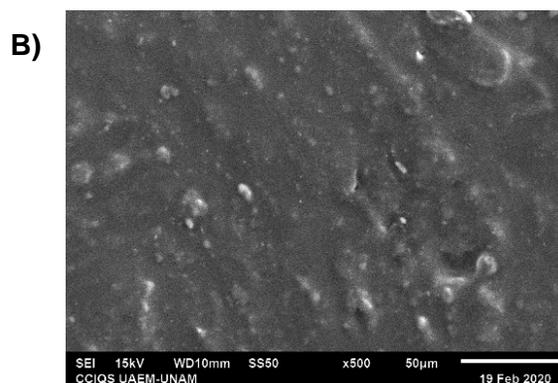
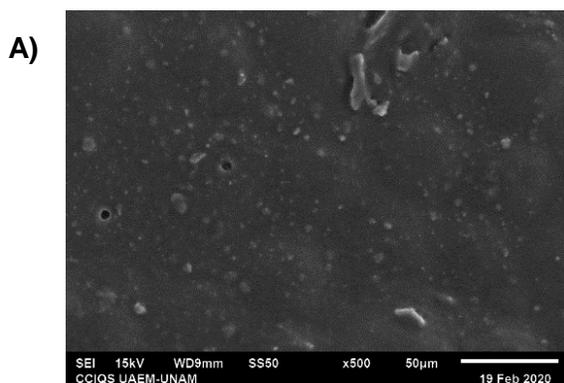
En el análisis estadístico, se procedieron diversas comparaciones entre los grupos de estudio mediante la prueba de ANOVA, *poshoc* Tukey con un valor de $p \leq 0.05$.

9. Resultados

Una vez obtenida la adhesión de las nanopartículas de Plata, Cobre y Óxido de Zinc a los bloques de PMMA; se analizó el efecto de estos mediante caracterización con SEM/EDS y pruebas microbiológicas; de lo anterior, se manifiestan los siguientes resultados.

- **Microscopía Electrónica de Barrido y Espectroscopía de Dispersión de Energía (SEM / EDS)**

La figura 19 muestra las micrografías obtenidas mediante SEM de las muestras de PMMA con AgNPs, CuNPs con una magnificación de 500x; donde se comprobó una distribución homogénea y presencia en superficie de las AgNPs, CuNPs en los bloques de PMMA, usando el método de síntesis *in situ* antes mencionado. La figura 19 A) (GII) y figura 19 B) (GVI), nos permite observar una distribución homogénea de nanopartículas de Plata; la figura 19 C (GIII) y figura 19 D (GVII) muestra aglomeraciones de nanopartículas de Cobre.



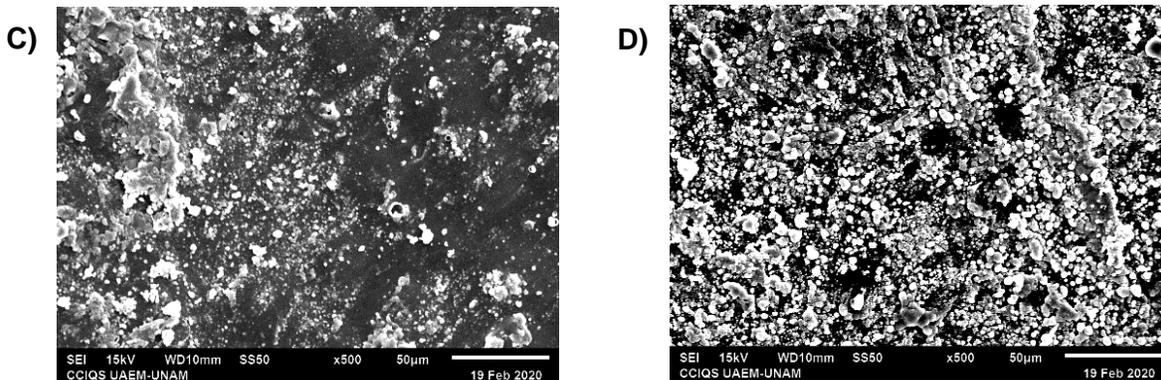
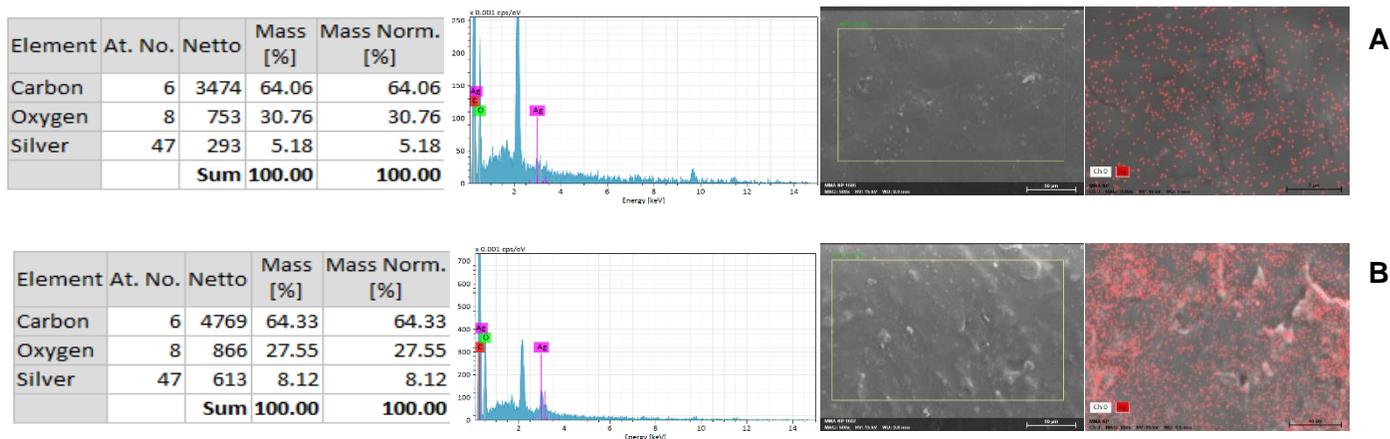
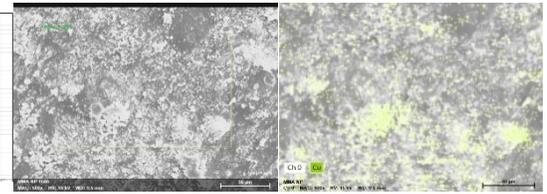
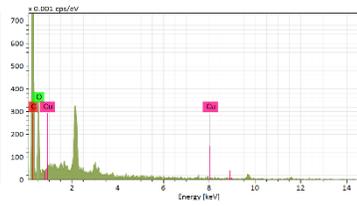


Figura 19. Micrografías representativas del SEM

La figura 20 corresponde al análisis de mapeo químico elemental, el cual mostró picos de absorción de 3 KeV para Ag, 8 KeV para Cu; el EDS nos permitió observar la presencia de diversos elementos químicos en alta concentración en 50 micras barridas, como Ag con 5.18% en peso para GII (A) y 8.12% en peso para GVI (B); Cu con 8.72% para GIII (C) y 9.36% para GVII (D); además de otros elementos como Carbono y Oxígeno. Teniendo que la absorción de Cu fue mayor, en particular para los bloques de la marca Nic Tone (MDC Dental, México, Lote 170619144).

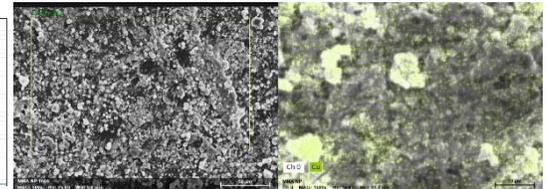
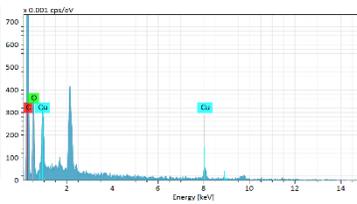


Element	At. No.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [%]
Carbon	6	83152	59.83	59.83
Oxygen	8	27711	31.45	31.45
Copper	29	3891	8.72	8.72
		Sum	100.00	100.00



C

Element	At. No.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [%]
Carbon	6	9781	60.70	60.70
Oxygen	8	3031	29.94	29.94
Copper	29	487	9.36	9.36
		Sum	100.00	100.00

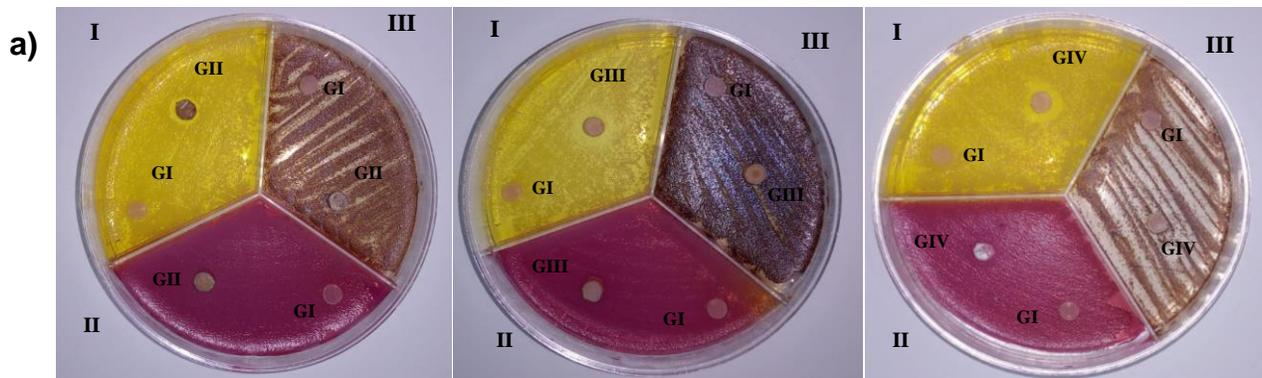


D

Figura 20. Espectro representativo de la composición química obtenida por espectroscopia de dispersión de energía (EDS) y análisis de mapeo basado en SEM

- **Análisis del efecto antimicrobiano**

Los bloques de PMMA impregnados con AgNPs, CuNPs y ZnONPs se probaron contra especies de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*. En la Figura 20 se observa la formación de halos de inhibición, los cuales muestran un efecto antimicrobiano contra *E. coli* y *S. aureus*.



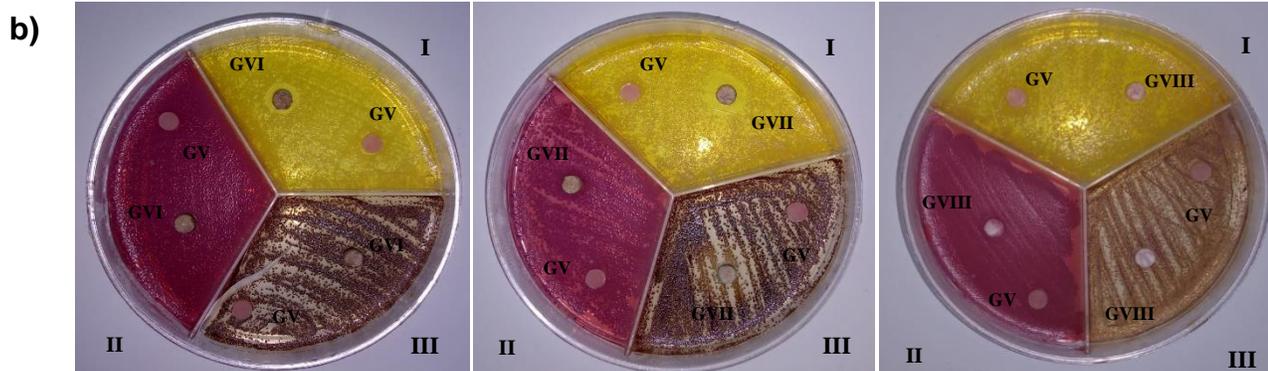


Figura 21. Imágenes representativas de los bloques de PMMA, Arias (a), Nic Tone (b), con AgNPs, CuNPs y ZnONPs en la evaluación *in vitro* con cepas *Staphylococcus aureus* (I), *Escherichia coli* (II) y *Candida albicans* (III).

La tabla 3 presenta los resultados del análisis estadístico de la medición de los halos de inhibición (mm, Media y Desviación estándar) para los bloques de PMMA con AgNPs, CuNPs y ZnONPs contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

Tabla 3. Resultados del test antimicrobiano (media y desviación estándar).

Microorganismo	Halos de inhibición (mm, Media \pm SD)					
	GII	GIII	GIV	GVI	GVII	GVIII
(A) <i>S. aureus</i>	1.33 \pm 0.577	2.33 \pm 0.577	2.66 \pm 0.577	1.33 \pm 0.577	3.66 \pm 0.577	1 \pm 0
(B) <i>E. coli</i>	1 \pm 0	0.66 \pm 0.577	1.33 \pm 0.577	0.66 \pm 0.577	1 \pm 0	1.33 \pm 0.577
(C) <i>C. albicans</i>	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

Como se puede observar en la Tabla 3, para *S. aureus* el grupo con mayor efecto inhibitorio fue GVII seguido del GIV; en contraparte, el efecto menor se observó en GVIII. Para *E. coli* los grupos con mayor efecto inhibitorio fueron GIV y GVIII; en contraparte el efecto menor se observó en GVI seguido de GIII. No se obtuvo efecto inhibitorio para *C. albicans*. Los detalles de todos los grupos se muestran en la Tabla 3.

10. Acuse de envío de artículo

The screenshot shows the 'Enviar un artículo' (Submit an article) page. The top navigation bar includes 'Español (España)', 'Ver el sitio', and the user 'ulises79'. The left sidebar has 'Tareas' (0) and 'Propuestas'. The main content area has a progress bar with five steps: 1. Inicio, 2. Cargar el envío, 3. Introducir los metadatos, 4. Confirmación, and 5. Sigüientes pasos. The current step is 'Envío completo' (Submission complete). The text reads: 'Gracias por su interés por publicar con CIENCIA ergo-sum. ¿Y ahora qué? La revista ha sido notificada acerca de su envío y a usted se le enviará un correo electrónico de confirmación para sus registros. Cuando el editor haya revisado el envío contactará con usted. Por ahora, usted puede:' followed by three links: 'Revisar este envío', 'Crear un nuevo envío', and 'Volver al escritorio'.

The screenshot shows the article submission page for 'Novedosas nanopartículas con efecto biocida; aplicación en el área odontológica: revisión sistemática' by ULISES VELAZQUEZ-ENRIQUEZ. The top navigation bar includes 'Español (España)', 'Ver el sitio', and the user 'ulises79'. The left sidebar has 'Tareas' (0) and 'Propuestas'. The main content area has a progress bar with four steps: Propuesta, Revisión, Editorial, and Producción. The current step is 'Archivos de envío' (Submission files). There is a search bar and a 'Buscar' button. Below the search bar, there is a table of submission files:

Nombre	De	Última respuesta	Respuestas	Cerrado
65859-1	ulises79, Autor, Artículo Ingles ERGOSSUM_ Nancy Millan Mora.docx			

Below the table, there is a 'Descargar todos los archivos' button. The 'Discusiones prerrevisión' (Pre-review discussions) section shows a table with one discussion:

Nombre	De	Última respuesta	Respuestas	Cerrado
Comentarios para el editor/a	ulises79 jun/01	-	0	<input type="checkbox"/>

ARTICLE

Cover letter

Title: Novel nanoparticles with a biocidal effect; application in the dental area: a systematic review

Author

1. Nancy Millán-Mora

Faculty of Dentistry, Autonomous University of the State of Mexico, Jesus Carranza esq. Paseo Tollocan,50130 Toluca, Estado de México, México.

2. Ulises Velazquez-Enriquez

Center for Research and Advanced Studies in Dentistry (CIEAO), Autonomous University of the State of Mexico, Jesus Carranza esq. Paseo Tollocan,50130 Toluca, Estado de México, México

3. Saraí C. Guadarrama-Reyes

Faculty of Dentistry, Autonomous University of the State of Mexico, Jesus Carranza esq. Paseo Tollocan,50130 Toluca, Estado de México, México.

4. Raúl Alberto Morales-Luckie

Departament of Nanomaterials, Joint Research Center for Sustainable Chemistry (CCIQS) National Autonomous University of Mexico - Autonomous University of the State of Mexico Carretera Toluca-Atlacomulco Km 14.5, San Cayetano, 50200 Toluca, Estado de México, México.

5. Gustavo Lopez-Tellez

Departament of Nanomaterials, Joint Research Center for Sustainable Chemistry (CCIQS) National Autonomous University of Mexico - Autonomous University of the State of Mexico Carretera Toluca-Atlacomulco Km 14.5, San Cayetano, 50200 Toluca, Estado de México, México.

Correspondence author:

Name: Ulises Velázquez Enríquez
E-mail: uvelazqueze@uaemex.mx
Institution: Universidad Autónoma del Estado de México
Adress: Jesús Carranza esq. Paseo Tollocan,50130 Toluca, Estado de México, México.

11. Resumen / Abstract

Novel nanoparticles with a biocidal effect; application in the dental area: a systematic review

Resumen:

La cavidad bucal está revestida por una biopelícula constituida por bacterias y hongos, dichos microorganismos tienen la posibilidad de ocasionar alteraciones en la cavidad oral; por consiguiente, es imprescindible eliminar dicha biopelícula bacteriana, ya sea de forma mecánica o por medio de agentes antimicrobianos. La adhesión de un agente antimicrobiano a diferentes materiales dentales como nanopartículas metálicas y óxido metálicas, las cuales poseen excelentes propiedades antimicrobianas, podría ser eficaz en la prevención de infecciones bucales. La finalidad de esta revisión es analizar el impacto antimicrobiano de las nanopartículas de Plata (AgNPs), Cobre (CuNPs) y Óxido de Zinc (ZnONPs) al ser adicionadas a diversos materiales dentales por medio de una revisión sistemática de la bibliografía publicada hasta el momento.

Palabras clave:

Nanopartículas de Plata, nanopartículas de Cobre, nanopartículas de Óxido de Zinc, materiales dentales, efecto antimicrobiano, síntesis química.

Abstract:

The buccal cavity is coated by a biofilm made up of bacteria and fungi, such microorganisms can cause alterations in buccal cavity; therefore, it is essential to remove such biofilm, either by mechanical means or by antimicrobial agents. Adhesion of antimicrobial agents to different dental materials such as metallic nanoparticles and metal oxides, which have excellent antimicrobial properties, could be effective

preventing oral diseases. The purpose of this review is to analyze the antimicrobial impact of Silver (AgNPs), Copper (CuNPs) and Zinc Oxide (ZnONPs) nanoparticles (NPs) when added to various dental materials by a systematic review of bibliography published to date.

Keywords:

Silver nanoparticles, copper nanoparticles, zinc oxide nanoparticles, dental materials, antimicrobial effect, chemical synthesis.

12. Discusión

El polimetilmetacrilato (PMMA) es una resina acrílica de uso frecuente en odontología para la elaboración de prótesis y aparatología ortodóncica, las cuales están en contacto con tejidos blandos y saliva durante periodos prolongados, originando diferentes respuestas de la mucosa oral, debidas tanto, a factores mecánicos como factores microbiológicos. Dutra *et al.*³³ (2018), reportó que la adherencia microbiana a diversos materiales, entre ellos las resinas acrílicas, se relaciona con sus características superficiales, siendo una de ellas la porosidad del material, originando mayor acumulación de placa bacteriana en la superficie de los materiales.

Por lo tanto, al recubrir el PMMA con agentes antimicrobianos se obtiene un efecto de inhibición del crecimiento microbiano con lo cual se podrían evitar alteraciones en cavidad oral desarrolladas por la adherencia de microorganismos a dicho material.⁵⁹ En los últimos tiempos, las nanopartículas de Plata, Cobre y Óxido de Zinc, han sido objeto de múltiples investigaciones, siendo aplicadas a diversos materiales en el área odontológica, debido a su potente acción antimicrobiana dada a la relación superficie-volumen, inhibiendo la proliferación microbiana considerándoseles excelentes antimicrobianos.⁶⁰

Existen diversos métodos para la síntesis de nanopartículas, siendo el método químico el más utilizado. La síntesis química se da a través del auto ensamblaje de átomos a nuevos núcleos que se convierten en una partícula con tamaño de nanoescala, estas nano estructuras son controladas por estabilizadores. Dentro de los precursores para la síntesis de nanopartículas se encuentra nitrato de Plata, cloruro de Cobre, sulfato de Cobre y cloruro de zinc; como agente reductor se tiene la polietilenimina ramificada o citrato de sodio.⁶¹ Hernández *et al.*¹² (2017), realizó síntesis *in situ* de Nanopartículas de Plata en módulos elastoméricos de ortodoncia, confirmado mediante el análisis EDS la presencia de Plata. Argueta *et al.*¹⁴ (2018), sintetizó nanopartículas de Cobre

por método químico agregándolas al acrílico termopolimerizable, reportando nanopartículas en un rango de 400-800 nm. En esta investigación la síntesis *in situ* de las nanopartículas se obtuvo por método químico, propuesto en el estudio de Bala⁵³ (2011), en el análisis EDS se confirmó la presencia de los elementos Plata y Cobre en alta concentración. La distribución de las nanopartículas en la superficie del PMMA se obtuvo siguiendo el método propuesto por Jasso *et al.*⁵⁴ (2019), en su estudio recubrió brackets de ortodoncia con nanopartículas de Plata, mostrando una distribución y adherencia en la superficie de los brackets. Vikram *et al.*⁶² (2020), incorporó nanopartículas de Óxido de Zinc en diferentes concentraciones al monómero líquido el cual fue mezclado con el polímero en polvo para obtener muestras de acrílico, estas muestras fueron sometidas a una prueba de flexión.

En el presente estudio, las nanopartículas se encontraban tanto adentro de los bloques de PMMA, como recubriendo la superficie, mediante las micrografías SEM, se comprobó una distribución homogénea y presencia en superficie de las AgNPs y CuNPs en los bloques de PMMA, donde GIII y GVII, mostraron mayor presencia y distribución en superficie, esto puede deberse a que las nanopartículas de Cobre se encontraban mono dispersas, por lo que recubrieron gran cantidad de la superficie del PMMA; estos resultados demuestran que el método propuesto por Bala⁵³ (2011), y Jasso *et al.*⁵⁴ (2019), para la coagregación de nanopartículas al PMMA es una alternativa viable y novedosa; puesto que el método de síntesis más utilizado es la mezcla de nanopartículas en suspensión acuosa al monómero antes de la mezcla del polímero.⁶³

Estudios *in vitro* demuestran que las nanopartículas de Plata, Cobre y Óxido de Zinc, son potentes antimicrobianos al combinarse o recubrir diversos materiales. Espinosa *et al.*⁶⁴ (2018), reportó la inhibición bacteriana de *S. mutans* en la superficie de brackets y alambres de ortodoncia, los cuales recubrió con nanopartículas de Plata de dos tamaños. Jasso *et al.*⁶⁵ (2020), modificó la superficie de los brackets de ortodoncia con

nanopartículas de Plata, demostrando una disminución en la adhesión de *S. mutans* y *S. sobrinus* a la superficie de estos.

Esta investigación reveló un efecto inhibitorio de las nanopartículas de Plata, Cobre y Óxido de Zinc sobre *S. aureus* y *E. Coli*. Los resultados mostraron en el análisis del efecto antimicrobiano contra *S. aureus* que GVII seguido de GIV fueron los grupos con mayor efecto inhibitorio obteniendo halos de inhibición de 3 a 4 mm; en contraparte, el efecto menor se observó en GVIII. Las nanopartículas de Cobre, coagregadas a los bloques de PMMA de la marca NicTone (MDC Dental, México, Lote 170619144), fueron las que mostraron un mayor halo de inhibición, seguido de las nanopartículas de Óxido de Zinc coagregadas a los bloques de PMMA de la marca Arias (Arias plus, México, Lote 1018000009). En el análisis contra *E. Coli* los grupos con mayor efecto inhibitorio fueron GIV y GVIII donde los halos de inhibición fueron de 2mm; en contraparte el efecto menor se observó en GVI. En general, las nanopartículas de Plata mostraron un menor efecto inhibitorio sobre especies Gram-positivas y Gram-negativas reportando halos inhibitorios de 1mm, lo que difiere en un estudio realizado por Guadarrama *et al.*¹³ (2018), en el que recubrió hilos de sutura con nanopartículas de Plata, obteniendo una inhibición del crecimiento de *S. aureus* y *E. Coli* de 2.5 mm en promedio.

En los resultados obtenidos en este estudio no se observó la formación de halos de inhibición contra *C. albicans*, sin embargo, se demuestra un efecto antifúngico al no presentarse un crecimiento de la levadura en la superficie de los bloques de PMMA, sugiriendo la posibilidad de que las nanopartículas evitan la colonización de levaduras en la superficie. Flores *et al.*⁶⁶ (2020), presentó un estudio en el cual analiza el efecto antifúngico de discos de PMMA con nanopartículas de Plata, encontrando que no se observan zonas de inhibición dado que las nanopartículas no se liberan de los discos de PMMA, aun así, actúan como agente inhibidor del crecimiento de *C albicans* sobre los discos. Lo que difiere en diversos estudios; Méndez *et al.*⁶⁷ (2020) evaluó la

adhesión de *C. albicans* en bloques de PMMA de curado por calor y autopolimerizado, modificados con nanopartículas de Plata, informó, que los bloques de PMMA de curado por calor mostraron menor adhesión a *C. albicans*, obteniendo un resultado contrario con los bloques de PMMA de autopolimerizado. Usman *et al.*⁶⁸ (2013), reportó que las nanopartículas de Cobre mostraron altas tasas de inhibición contra especies fúngicas, concluyendo que estas nanopartículas son efectivos antifúngicos. Miri *et al.*⁶⁹ (2019), sintetizó nanopartículas de Óxido de Zinc realizando pruebas de actividad antifúngica en *C. albicans*, demostrando que el efecto antifúngico depende de la dosis, es decir, al aumentar la concentración de ZnONPs se evita el crecimiento de los hongos, concluyendo que estas nanopartículas tienen un efecto antifúngico aceptable.

Estos hallazgos revelaron que el recubrimiento de PMMA con nanopartículas de Plata, Cobre y Óxido de Zinc, presenta un alto potencial antimicrobiano evaluado con cepas Gram-positivas y Gram-negativas; sin embargo, es necesario llevar a cabo más pruebas con levaduras, en particular *C. albicans*, para demostrar un efecto antifúngico.

13. Conclusión

Con base en los resultados de esta investigación, se estableció que el método de síntesis *in situ* propuesto por T. Bala permitió obtener e incorporar AgNPs, CuNPs y ZnONPs, observándose una distribución homogénea y presencia en la superficie de los bloques de PMMA.

Las resinas acrílicas evaluadas en el grupo GIV y GVIII recubierta con nanopartículas de Óxido de Zinc, y la resina acrílica evaluada en el grupo GVII recubierta con nanopartículas de Cobre, fue la que mostraron mayor actividad antibacteriana para la mayoría de los microorganismos.

En términos generales, el recubrimiento con nanopartículas disminuyó la adhesión de *E. coli* y *S. aureus* a los bloques de PMMA obteniendo inhibición bacteriana, demostrando tener un efecto favorecedor en sus propiedades puesto que expone propiedades antibacterianas; sugiriendo su uso para la elaboración de prótesis y aparatología ortodóncica-ortopédica ya que podría reducir el riesgo de padecer infecciones bucales, así como disminuir la acumulación de placa bacteriana, presencia de caries y mal aliento. En contraste, estas nanopartículas evaluadas contra *C. albicans* mostraron una menor inhibición a los bloques de PMMA.

14. Sugerencias

Es necesario realizar más estudios al PMMA modificado con AgNPs, CuNPs y ZnONPs para examinar sus propiedades físicas y estéticas, así como pruebas de citotoxicidad y biocompatibilidad; para posteriormente ser llevado a una investigación *in vivo* y asegurar el éxito de estas aplicaciones dentales.

15. Referencias

1. Cruz SM, Díaz P, Arias D, Mazón GM. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. *Rev Cubana Estomatol.* 2017; 54: 84-99.
2. Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Bahador A. Antimicrobial properties of acrylic resins doped with *Undaria pinnatifida* exposed to light-emitting diode: In silico and in vitro assessments on multispecies biofilm-producing microbiota. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 27: 210-215.
3. Ghahremanloo A, Movahedzadeh M. The Effect of Silver Nano Particles on *Candida Albicans* and *Streptococcus Mutans* in Denture Acrylic Resins. *J Dent Mater Tech.* 2015; 5: 23-30.
4. Morones JR, López SG. Plata. Metal con brillante futuro en la medicina. *Ciencia y desarrollo. Cienc Desarro.* 2014; 27: 17-23.
5. Prado V, Vidal R. Aplicación de la capacidad bactericida del Cobre en la práctica médica. *Rev Med Chil.* 2012;140: 1325-1332.
6. Acevedo A, Acosta L, Morales C, Castaño V. Citotoxicidad y efecto antifúngico de nanopartículas de Plata para uso odontológico. *Rev Interdiscip en Nanociencias y Nanotecnología.* 2012; 5: 68-76.
7. Samiei M, Aghazadeh M, Lotfi M, Shakoei S, Aghazadeh Z, Vahid Pakdel SM. Antimicrobial Efficacy of Mineral Trioxide Aggregate with and without Silver Nanoparticles. *Iran Endod J.* 2013; 8: 166-170.
8. Melo MAS, Cheng L, Zhang K, Weir MD, Rodrigues LKA, Xu HHK. Novel dental adhesives containing nanoparticles of silver and amorphous calcium phosphate. *Dent Mater.* 2013; 29: 199-210.
9. Bahador A. Anti-bacterial Effects of Polymethylmethacrylate with In situ

Generated Silver Nanoparticles on Primary Colonizers of Human Dental Plaque and Cariogenic Bacteria. *Annu Res Rev Biol.* 2014; 4: 1587-1601.

10. Murga HM, Centeno Sanchez R, Sánchez Meraz W, María González Amaro A, Arredondo Hernández R, Cárdenas JM, *et al.* Eficacia antimicrobiana del primer ortodóncico adicionado con nanopartículas de Plata. Estudio transversal *in vitro*. *Invest Clin.* 2016; 57: 321-329.
11. Sánchez G, Fuentes R, Helia B. Copper Nanoparticles as Potential Antimicrobial Agent in Disinfecting Root Canals. A Systematic Review. Nanopartículas de Cobre como Potencial Agente Antimicrobiano en la Desinfección de Canales Radiculares. Revisión Sistemática. *Int J Odontostomat.* 2016; 10: 547-554.
12. Hernández A, Lara E, Robles J, Scougall R, Hernández S, Medina C, *et al.* Biosynthesis of Silver Nanoparticles on Orthodontic Elastomeric Modules: Evaluation of Mechanical and Antibacterial Properties. *Molecules.* 2017; 22:1-14.
13. Guadarrama S, Scougall R, Morales R, Sánchez V, López R. Antimicrobial Effect of Silk and Catgut Suture Threads Coated with Biogenic Silver Nanoparticles. In: *Silver Nanoparticles - Fabrication, Characterization and Applications.* InTech; 2018. p. 249-262.
14. Argueta L, Mesta D, Torres N, Martínez O, Paulino A, Arenas M. Acrílico termopolimerizable enriquecido con nanopartículas de Cobre: evaluación antibacteriana y citotóxica. *Mundo Nano Rev Interdiscip en Nanociencia y Nanotecnología.* 2018; 11: 45-60.
15. Kati FA. Effect of the incorporation of zinc oxide nanoparticles on the flexural strength of auto-polymerized acrylic resins. *J Oral Res.* 2019; 8: 37-41.
16. Llamas S, Miranda O, Partida J, Acosta H, Rivera J, Ojeda A. Recubrimiento de Brackets de Ortodoncia con Nanopartículas de Plata para la Inhibición Bacteriana. *Ciartec Lamar.* 2019; 2: 1-9.

17. Argueta L, Arenas M, Herrera D, García S, García R. Propiedades antimicrobianas y citotóxicas de un adhesivo de uso ortodóncico adicionado con Nanopartículas de Plata. *Rev Interdiscip en Nanociencias y Nanotecnología*. 2019; 12: 59-71.
18. Corrales L, Antolínez D, Bohórquez J, Corredor A. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*. 2017;13: 55-81.
19. Negroni M. *Microbiología Estomatológica: Fundamentos y guía práctica*. 3rd ed. Panamericana M, editor. Ciudad Autónoma de Buenos Aires; 2018. 4-5, 95-96, 240-243, 656-659 p.
20. De Los Ángeles M, Contreras S, Flores TG, Del Rosario T, Talavera A, Evangelista Martínez Z, *et al.* ¿Que son los microbios? *Ciencia*. 2017; 68: 10-17.
21. Serrano H, Sánchez M, Cardona N. Knowledge of the microbiota of the oral cavity through the metagenomic. *Ces Odontol*. 2015; 28: 112-118.
22. Klein M, Hwang G, Santos P, Campanella O, Koo H. Streptococcus mutans-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015; 5: 1-8.
23. Rosa J, Santos R. Características da escherichia coli enterohemorrágica (ehec). *Saúde ciência em ação – Rev Acadêmica do Inst Ciências da Saúde*. 2016; 2: 66-78.
24. Tsui C, Kong E, Jabra M. Pathogenesis of Candida albicans biofilm. *Pathog Dis*. 2016; 74: 1-13.
25. Otero E, Peñamaría M, Rodríguez M, Martín B, Blanco A. Candidiasis oral en el paciente mayor. *Av Odontoestomatol*. 2015; 31: 135-148.
26. Pujol M, Tosco T, Martinez I. Comparación de tres procedimientos para la

identificación rápida de microorganismos causantes de bacteriemias. Evaluación de su eficacia y aplicabilidad en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2019; 37: 319-323.

27. Siller M, Hernández S, Sánchez F, González J, Muñoz J. Métodos rápidos de identificación de bacterias y hongos. Espectrometría de masas MALDI-TOF, medios cromogénicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017; 35: 303-313.
28. http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a297bfd85301.pdf Europea F. TSA (Tryptic Soy Agar). Consulta 17 junio 2019.
29. https://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/PB81.pdf Tryptic Soy Agar Consulta 17 junio 2019.
30. Cuenca M, Gadea I, Martin E, Peman L, *et al.* Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* 2006. 29-69 p.
31. Pereira D, Svidzinski E, Furlaneto M, Lopes M, *et al.* Acrylic Resins for Dental Use Based Polymethylmethacrylate. *Brazilian J Surg Clin Res.* 2014; 6: 63-72.
32. Anusavice K, Phillip R. *Phillips ciencia de los materiales dentales.* 11th ed. Elsevier; 2004. 117-220 p.
33. Dutra D, Pereira G, Kantorski K, Valandro L, Zanatta F. Does Finishing and Polishing of Restorative Materials Affect Bacterial Adhesion and Biofilm Formation? A Systematic Review. *Oper Dent.* 2018; 43: 37-52.
34. Corrêa J, Mori M, Sanches H, Cruz A, Poiate E. Silver Nanoparticles in Dental Biomaterials. *Int J Biomater.* 2015; 1: 1-9.
35. Di Vittorio L, Diaz M. Aplicaciones clínicas de la nanotecnología en odontología y medicina oral. *Científica Dent Rev científica Form Contin.* 2018; 15: 37-44.
36. Durán N, Durán M, de Jesus M, Seabra A, Fávaro W, Nakazato G. Silver

nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2016;12: 789-799.

37. Guadarrama Reyes SC. Efecto antibacteriano de las nanopartículas de Plata versus clorhexidina sobre streptococcus mutans y lactobacillus casei. 2013.
38. Abbasi E, Milani M, Fekri S, Kouhi M, Akbarzadeh A, Tayefi H, *et al.* Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. *Crit Rev Microbiol.* 2016; 42: 173-180.
39. Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *J Adv Res.* 2016; 7: 17-28.
40. Hernández C, España B, Luna G, *et al.* Actividad antimicrobiana de nanopartículas de Cobre soportadas en una matriz de quitosano. *Jovenes Investig.* 2017; 3: 129-133.
41. Román L, Castro F, Maúrtua D, Condori C, Vivas D, Bianclii A, *et al.* Nanopartículas de CuO e sua propriedade antimicrobiana frente a cepas intrahospitalares. *Rev Colomb Quim.* 2017; 46: 28-36.
42. Pariona N, Carrión G. Síntesis de nanopartículas de Cobre para el control de hongos fitopatógenos. *Rev ECIPeru.* 2018; 15: 109-116.
43. Lopez G, Ataucuri J. Estudio sobre metodologías aplicadas para la síntesis de nanopartículas de Cobre (NPsCU) y Plata (NPsAG) en diferentes formas y tamaños. *Rev Cient Tec.* 2018; 27: 45-52.
44. Montejo L, Autié G, Cavalcante C, *et al.* Evaluación de nanopartículas de ZnO para la separación de CH₄-CO₂. *Rev Cuba Química.* 2018; 30: 119-130.
45. Aquino P, Osorio A, Ninána E. Caracterización de nanopartículas de ZnO sintetizadas por el método de precipitación y su evaluación en la incorporación

en pinturas esmalte. Rev la Soc Química del Perú. 2018; 84: 5-17.

46. Zavaleta G. Efecto antibacteriano de nanopartículas de ZnO sobre *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*. *Arnaldoa*. 2019; 26: 421-430.
47. Salas G, Rosas N, Galeas S, Guerrero V, Debut A. ZnO Nanoparticles Synthesis by Pechini Method. *Rev Politécnica*. 2016; 38: 43-47.
48. Vaamonde A, Gonzalez J. Ciencia e ingeniería de la superficie de los materiales metálicos. *Científicas*. 2000. 485-524 p.
49. Faraldos M, Goberna C. Técnicas de análisis y caracterización de materiales. *Científicas*. 2002. 356-422 p.
50. Hernández S, Rueda F, Flota A, Aguilar F, Rodríguez M, Lama E. Influencia de la aparatología ortodóntica sobre la ocurrencia de *Candida* spp. en la cavidad oral. *Rev Chil Infectol*. 2016; 33: 293-297.
51. Rodríguez C, Rodríguez A. Lesiones de la mucosa bucal en pacientes rehabilitados con prótesis estomatológica acrílica total removible. *Rev Ciencias Médicas la Habana*. 2018; 25: 15-26.
52. Carpio M, Jimenez R, Matos W. Lesiones de la mucosa bucal en adultos mayores con prótesis dentales totales. *Medisan*. 2017; 21: 813-818.
53. Bala T, Armstrong G, Laffir F, Thornton R. Titania-silver and alumina-silver composite nanoparticles: Novel, versatile synthesis, reaction mechanism and potential antimicrobial application. *J Colloid Interface Sci*. 2011; 356: 395-403.
54. Jasso I, Velazquez U, Scougall R, Lara E, Toral V, López R, *et al*. Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles on Orthodontic Brackets: A New Alternative in the Prevention of White Spots. *Coatings*. 2019; 9: 1-11.
55. Jain I, Jain P. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of three different formulations of mouth rinses with multi-herbal mouth rinse. *J Indian Soc Pedod*

Prev Dent. 2016; 34: 315-323.

56. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html> Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud. Diario oficial de la federación. Últimas Reformas DOF 27-04-2010 Consulta: 22 noviembre 2019
57. International Ethical Guidelines for Health-related Research Involving Humans. https://cioms.ch/wp-content/uploads/2017/12/CIOMS_EthicalGuideline_SP_INTERIOR-FINAL.pdf. Consulta: 22 noviembre 2019
58. <http://www.innsz.mx/opencms/contenido/investigacion/comiteEtica/helsinki.html> Declaración de Helsinki. Consulta: 22 noviembre 2019
59. Bapat R, Chaubal T, Joshi C, Bapat P, Choudhury H, Pandey M, *et al.* An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. Mater Sci Eng C. 2018; 91: 881-898.
60. Bapat R, Joshi C, Bapat P, Chaubal T, Pandurangappa R, Jnanendrapa N, *et al.* The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. Drug Discov Today. 2019; 24: 85-98.
61. Barkat M, Harshita B, Naim M, Pottoo F, Singh S, *et al.* Current Progress in Synthesis, Characterization and Applications of Silver Nanoparticles: Precepts and Prospects. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2017; 13: 53-69.
62. Vikram S, Chander N. Effect of zinc oxide nanoparticles on the flexural strength of polymethylmethacrylate denture base resin. Eur Oral Res. 2020; 54: 31-35.
63. Ghaffari T, Hamedirad F, Ezzati B. In Vitro Comparison of Compressive and Tensile Strengths of Acrylic Resins Reinforced by Silver Nanoparticles at 2% and 0.2% Concentrations. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2014; 8: 204-209.
64. Espinosa L, López N, Cabada D, Reyes S, Zaragoza A, Constandse D, *et al.*

Antiadherence and antimicrobial properties of silver nanoparticles against streptococcus mutans on brackets and wires used for orthodontic treatments. J Nanomater. 2018; 1: 1-11.

65. Jasso I, Velazquez U, Scougall R, Morales R, Sawada T, Yamaguchi R. Silver nanoparticles in orthodontics, a new alternative in bacterial inhibition: *in vitro* study. Prog Orthod. 2020; 21: 1-8.
66. Flores J, García R, Villanueva G, Acosta L. Antimicrobial poly (methyl methacrylate) with silver nanoparticles for dentistry: A systematic review. Appl Sci. 2020; 10: 1-9.
67. Méndez J, Velazquez U, Contreras R, De La Rosa I, Sawada T, Yamaguchi R. Adhesion of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* to silver nanoparticle-modified polymethylmethacrylate. Interciencia. 2020; 45: 23-27.
68. Usman M, Zowalaty M, Shamel K, Zainuddin N, Salama M, Ibrahim N. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. Int J Nanomedicine. 2013; 8: 4467-4479.
69. Miri A, Ebrahimi O, Khatami M, Sarani M. Zinc oxide nanoparticles: Biosynthesis, characterization, antifungal and cytotoxic activity. Mater Sci Eng C. 2019; 104: 1-7.

ANEXOS

Ponencias y reconocimientos

- Ponente en el XXVIII Encuentro Nacional y XIX Iberoamericano de Investigación en Odontología ENIO 2020, en la modalidad presentación oral con el tema “Caracterización y coagregación de Nanopartículas de Plata y Cobre sobre la superficie de PMMA: estudio *in vitro*” llevado a cabo en Toluca, Estado de México, México, del 18 al 29 de noviembre de 2020.
- Ponente en el Foro de Investigación y Posgrado de la Facultad de Medicina, UAQ, en la modalidad presentación oral con el tema “Modificación de PMMA con nanopartículas, una nueva alternativa biocida: estudio *in vitro*” llevado a cabo en Querétaro, Querétaro, México, del 12 al 17 de abril de 2021.
- Reconocimiento por haber obtenido el 1er lugar a Nivel Nacional en el Foro de Investigación y Posgrado de la Facultad de Medicina, UAQ, en la modalidad presentación oral, llevado a cabo en la Universidad Autónoma de Querétaro, del 12 al 17 de abril de 2021.
- Conferencista del Programa de Formación Integral de la Facultad de Odontología, UAEM; con el tema “Incorporación de novedosas nanopartículas en odontología”, realizada el día 19 de agosto de 2021.
- Conferencista del Fireside chat del Consorcio Odontológico Traslacional, Colegio Dental del Estado de México A.C.; con el tema “Coagregación de nanopartículas en Odontología”, realizada el día 23 de septiembre de 2021.