

Citotoxicidad y efecto antifúngico de nanopartículas de plata para uso odontológico

ARACELI ACEVEDO CONTRERAS¹, LAURA S. ACOSTA TORRES²,
CARLOS A. MORALES-ZAVALA¹, VÍCTOR M. CASTAÑO MENESES³

RESUMEN: Actualmente no existe un alginato para toma de impresiones dentales que evite la adherencia de microorganismos, por lo que el objetivo del presente estudio fue sintetizar nanopartículas de plata, evaluar su comportamiento citotóxico y adicionarlas en la formulación de un alginato comercial para conferirle características antifúngicas específicas contra *Candida albicans*, proponiendo su uso en la prevención de contaminaciones cruzadas.

ABSTRACT: There isn't currently any alginate for dental impressions which avoids the adherence of microorganisms. Thus the aim of this study was to synthesize silver nanoparticles, evaluate their cytotoxicity and add those nanoparticles to the formulation of a commercial alginate so that it gets specific antifungal characteristics against *Candida albicans*. Its use is then suggested to prevent cross-contamination.

IMPORTANCIA DE SU DIVULGACIÓN

El odontólogo esta expuesto a infecciones cruzadas bebido a la continua exposición con microorganismos propios de la cavidad oral. Sin embargo, ciertas medidas que en la actualidad son posibles de tomar para evitar esta exposición pueden provocar cambios dimensionales en los materiales afectando el trabajo dental final; por esta razón se hace necesario seguir investigando nuevos métodos de desinfección que eviten la proliferación de microorganismos y, a su vez, permitan manejar de la mejor forma los materiales dentales utilizados para brindar un mejor tratamiento.

INTRODUCCIÓN

Los materiales de impresión son productos utilizados para reproducir las estructuras de los tejidos duros y blandos de la cavidad bucal. Las impresiones dentales sirven para la obtención de modelos de estudio y modelos de trabajo de cada paciente, en los cuales pueden realizarse mediciones, diseño y confección de restauraciones in-

¹ Laboratorio de Materiales Dentales, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México. Acevedo: homerack@hotmail.com; Morales: camz_8@hotmail.com.

² Escuela Nacional de Estudios Superiores, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad León Guanajuato. e-mail: laura.acuariux@gmail.com, Tel: (045) 477-7653-543.

³ Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla. meneses@servidor.unam.mx. Estancia sabática en la Universidad Autónoma de Querétaro.

directas como: incrustaciones, coronas, carillas, prótesis removibles, dentaduras, etc. Los materiales de impresión deben de ser biocompatibles y presentar una estricta fidelidad de detalle para duplicar las estructuras bucales (75 μm según la Asociación Dental Americana; ADA).

El alginato es un material para toma de impresiones ampliamente usado por su fácil manipulación y bajo costo (Craig, 1985), el cual proviene de las sales solubles del ácido alginico obtenido de las algas marinas llamadas "alginas" (Cova, 2010); se presenta en forma de polvo y es un polímero lineal cuyas propiedades mecánicas son tanto mejores cuanto más alto sea su peso molecular.

Una vez que el alginato ha gelificado presenta una estructura con defectos de superficie que propicia el crecimiento y proliferación de microorganismos originarios de la cavidad bucal como *Candida albicans*, principal microorganismo oportunista causante de la estomatitis protésica (Yildirime *et al.*, 2005; Cova, 2010). Factores locales como: higiene deficiente, traumatismos locales y pérdida de la integridad tisular; así como factores sistémicos (malnutrición, diabetes mellitus, infección por VIH, alteraciones sanguíneas, antibiótico-terapia prolongada, quimioterapia, radioterapia y xerostomía) contribuyen a la proliferación de *Candida albicans* y su adherencia en el 60 % de los pacientes portadores de prótesis removibles.

Diversos agentes químicos como amonio cuaternario y gluconato de clorhexidina con propiedades antimicrobianas se pueden colocar en contacto con las impresiones de alginato para su desinfección y evitar contaminaciones cruzadas; sin embargo, colocar sistemas acuosos en contacto con el alginato propicia el fenómeno de ambibisis (absorción de agua) modificando la estabilidad dimensional de la impresión final, por lo que no se recomienda sumergir en ninguna solución dichas impresiones (Taylor, 2002; Barceló, 2003). Por otro lado, las nanopartículas de plata (AgNPs) se han utilizado por su efecto antimicrobiano en diferentes aplicaciones biomédicas como en cubiertas de materiales, apósitos en heridas, cementos óseos, así como en algunos materiales dentales (Kassae *et al.*, 2008). No obstante, no existen reportes de su incorporación en la formulación de materiales de impresión. El mecanismo de acción de las nanopartículas de plata con efecto antimicrobiano se realiza mediante la liberación de iones de plata en el interior de los microorganismos atacando directamente el ciclo de la cadena respiratoria y propiciando la muerte microbiana.

El objetivo del presente estudio fue sintetizar, caracterizar y evaluar el efecto citotóxico de nanopartículas de plata para incluirlas dentro de la formulación de un alginato disponible comercialmente para su posterior evaluación de efecto antifúngico y reproducción de detalle.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis de nanopartículas de plata

La síntesis de nanopartículas de plata se realizó utilizando nitrato de plata (AgNO_3 ; Sigma, México) como precursor, y una infusión natural de extracto de *Geranium maculatum* como agente reductor. La infusión natural se agregó en etilenglicol (Sigma; México) previamente calentado a 176 °C, posteriormente se goteó el nitrato de plata 0.1 M y se mantuvo la reacción durante 20 min en agitación vigorosa. Las nanopartí-

culas de plata obtenidas se lavaron con etanol y acetona con periodos de sonicado y centrifugado de 10 min a 10,000 rpm.

Mediante este procedimiento se obtuvo una solución con coloración amarillo tenue, característica de la formación de nanoesferas de plata.

Caracterización de nanopartículas de plata

Las solución de AgNPs en etanol fue caracterizada mediante espectroscopía UV-Visible (UV-Vis) en un equipo Genesys 2PC; $\lambda = 410$ nm. Se utilizó la técnica de reflectancia total atenuada (ATR) para el análisis de espectroscopía de infrarojo (FT-IR), en un equipo Bruker Vector 33 con 17 escaneos en la región de $400 - 4500$ cm^{-1} . El análisis de Espectroscopía Raman-Dispersivo fue realizado en un equipo Senterra Buker, equipado con láser de $\lambda = 685$ nm y FT Raman (Nicolet 910) con $\lambda = 1064$ nm y acoplado con microscopio Olympus.

Para conocer el tamaño y morfología de las nanopartículas de plata fueron analizadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM; JEOL, Peabody, MA), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM; Anstron Advance Inc.) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, JEOL-1010). La solución de nanopartículas fue depositada en los portaobjetos y se mantuvieron hasta la evaporación del solvente antes de ser observadas.

Evaluación del efecto citotóxico

Fibroblastos de ratón 3T3-L1 (ATCC; CL173) fueron cultivados en medio Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS; Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) y antibióticos de (10 μL de estreptomycin y 100 U/mL de penicilina; Sigma). Las células fueron incubadas en ambiente de humedad a 37 °C en atmósfera de aire al 95 % y 5 % de CO_2 . Las células fueron sembradas a una densidad de 1×10^4 /pozo en cajas de cultivo de 24 pozos, incubadas durante 24 h para su adhesión y posteriormente se agregaron alícuotas 50 μL de la solución de AgNPs previamente esterilizadas con luz UV durante 5 minutos. Las células con nanopartículas fueron incubadas durante 24 h para evaluar el efecto citotóxico mediante el ensayo de MTT (Mosmann *et al.*, 1983). La densidad óptica fue leída a 570 nm en un espectrofotómetro de ELISA (Bio-Rad). Los resultados se compararon con respecto al grupo control negativo; células sin nanopartículas de plata. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Ensayo de inhibición de Candida albicans

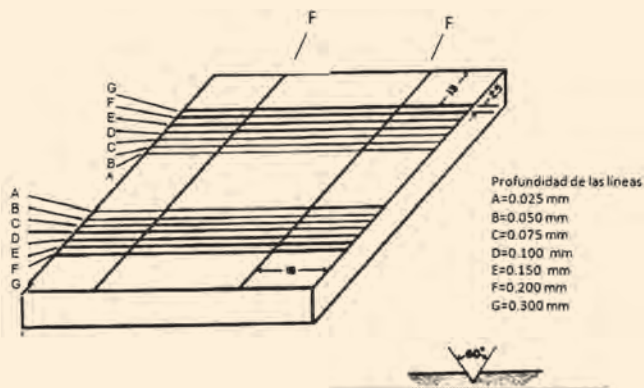
El efecto antifúngico de las AgNPs sintetizadas se evaluó usando una cepa de *Candida albicans* ATCC-90026, la cual fue sembrada a 1×10^6 en placas con agar Dextrosa Sabouraud (Sigma). Se prepararon ($n = 8$) discos de alginato de sodio (Max Print Cyan, MDC, México) con AgNPs (13.7 %) y fueron depositados sobre las placas de agar con *Candida albicans* e incubados a 37 °C durante 24 h. Discos de alginato Max-Print sin AgNPs fueron usados como grupo control. Se analizó la formación de zonas de inhibición alrededor de los discos de alginato en contacto con *Candida albicans* y se midió

la longitud de cada zona de inhibición. El ensayo de inhibición microbiana se realizó por duplicado.

Prueba de fidelidad de detalle

Se realizó la evaluación de fidelidad de detalle según la norma No. 18 de la Asociación Dental Americana (ADA No. 18, 1992) adicionando 13.7 % de AgNPs en el agua para mezclado del alginato. El procedimiento se llevó a cabo llenando con alginato un anillo de metal colocado sobre una placa metálica con hendiduras de distintas profundidades de 0.30 a 0.025 mm (figura 1); 15 min después se retiró el alginato y se le vació una mezcla de yeso tipo *alfa-1* para posteriormente colocarse en un baño de agua a 23 ± 2.0 °C y 100 % de humedad relativa durante 30 min. Finalmente se observó en un microscopio óptico la reproducción de las líneas de la placa ranurada en el modelo de yeso para valorar la fidelidad de detalle del alginato y el alginato adicionado con AgNPs.

FIGURA 1. Placa metálica con hendiduras de distinta profundidad para evaluar fidelidad de detalle de los alginatos.



Análisis estadístico

Se aplicó el análisis estadístico ANOVA de Una Vía ($p < 0.05$) y Tukey test para comparar los valores obtenidos en las evaluaciones de: citotoxicidad, inhibición de *Candida albicans* y fidelidad de detalle.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen diversos métodos para la síntesis de nanopartículas metálicas pero los más empleados son aquellos que utilizan procedimientos químicos (Guzmán *et al.*, 2008). Sin embargo, en el presente estudio, al utilizar una infusión natural como agente re-

ductor fue posible obtener partículas de plata de tamaño nanométrico, lo cual resulta favorable para uso en aplicaciones biomédicas por su alto efecto antimicrobiano y nula toxicidad en tejidos humanos cuando se utilizan en bajas concentraciones.

La caracterización espectroscópica de UV-Vis presenta el plasmón de superficie característico de las nanoesferas de plata con resonancia en la región de 410 nm como se muestra en la figura 2a. Los espectros de FT-IR y Raman-Dispersivo muestran picos característicos de las nanoestructuras de plata (figuras 2b y 2c).

Las micrografías electrónicas de barrido, de transmisión y de fuerza atómica indican la presencia de nanopartículas de plata de forma esférica, con bordes bien definidos y con tamaño de 10 - 12 nm (Figuras 3a, 3b y 3c).

En el ensayo de citotoxicidad no existió diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre el grupo de nanopartículas de plata comparado con el grupo control (figura 4).

A pesar de que existen más de 60 estudios que han reportado los efectos que causan los procedimientos de desinfección en la estructura y propiedades físicas de los materiales de impresión (Martín *et al.*, 2007), no existen estudios recientes sobre nuevas técnicas para evitar este problema, pues las técnicas de desinfección más utilizadas son mediante soluciones de hipoclorito de sodio y el glutaraldehído (Wadhvani *et al.*, 2005; Lepe *et al.*, 2002). En un intento por solucionar este problema se realizaron técnicas experimentales utilizando radiación ultravioleta (Larsen *et al.*, 2000) y radiación de microondas (Abdelazia *et al.*, 2004), las cuales no fueron bien aceptadas, por esta razón, en el presente estudio fue propuesta la adición de nanopartículas de plata como agente antimicrobiano en el agua de mezclado del alginato para prevenir la propagación de infecciones cruzadas.

Los valores promedio del tamaño de las zonas de inhibición de *Candida albicans* formadas por los discos de alginato son menores en comparación con las zonas de inhibición formadas por los discos de alginato con AgNPs se muestran en la figura 5, indicando diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

FIGURA 2. Espectros a) UV-Vis, b) FT-IR y c) Raman-Dispersivo de las AgNPs sintetizadas.

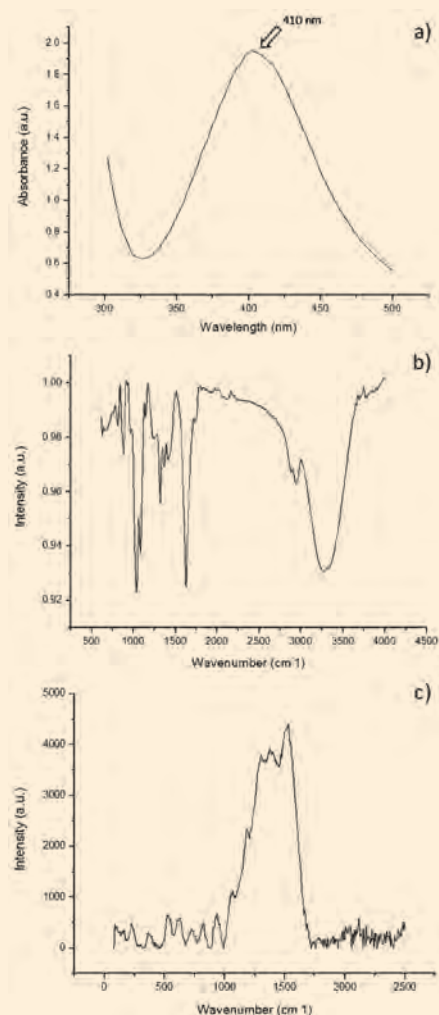
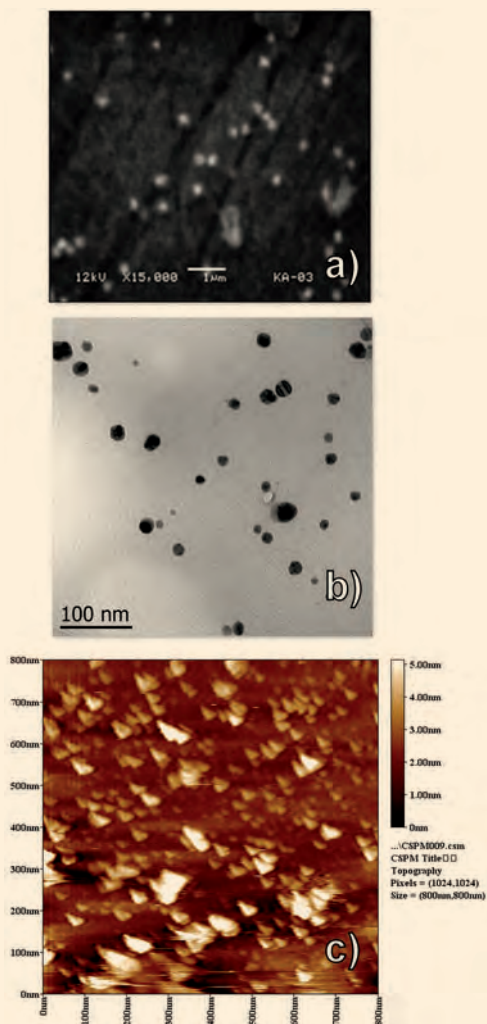


FIGURA 3. Micrografías que muestran el tamaño de partícula de las AgNPs sintetizadas a) SEM b) TEM c) AFM



Debido a que no se encuentran reportes previos de alginatos con nanopartículas de plata se realizó la prueba de fidelidad de detalle que indica norma ADA No. 18 con la cual se verifica la reproducción de detalle que se logra al tomar una impresión con alginato para obtener un modelo positivo de yeso.

La figura 6 muestra la micrografía del modelo de yeso con la reproducción de la impresión tomada con alginato con AgNPs, la cual resultó idéntica a la impresión tomada con alginato sin modificar; mostrando que se han reproducido exactamente todos los carriles marcados desde el que mide 0.3 mm hasta el de 25 μm, coincidiendo con los carriles originales de la placa metálica impresionada.

FIGURA 4. Valores del comportamiento de nanopartículas de plata en contacto con fibroblastos 3T3-NIH durante 24 h.

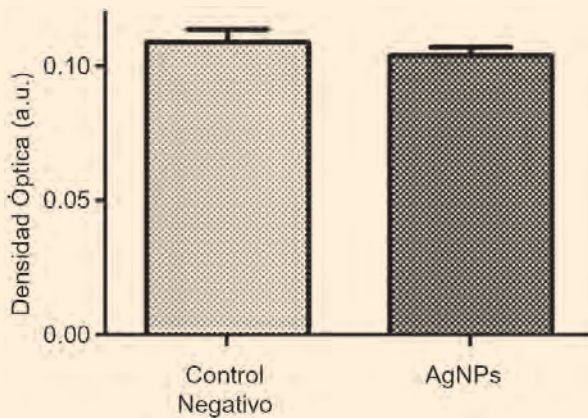


FIGURA 5. Valores promedio y desviación estándar del tamaño de las zonas de inhibición creadas por los grupos de alginato con nanopartículas de plata y alginato sin modificar.

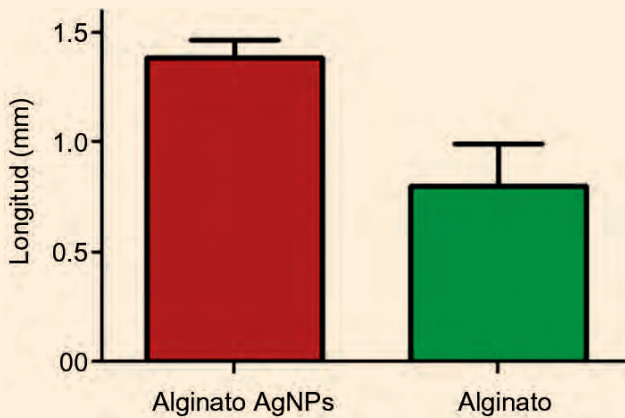
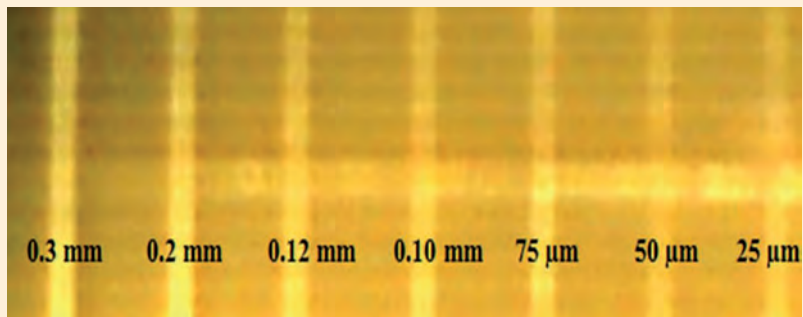


FIGURA 6. Micrografía del yeso obtenido para evaluar la fidelidad de detalle del alginato Max-Print con y sin nanopartículas de plata.



CONCLUSIONES

Un medio natural como el *Genium maculatum* puede reducir el tamaño de partículas de plata hasta escala nanométrica, las cuales adicionadas a un material de impresión lo dotan de efecto antifúngico haciéndolo una buena opción dentro de los materiales para la toma de impresiones dentales ya que mantienen la fidelidad en la reproducción de detalle y no resulta citotóxico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el Proyecto PAPIIT-IN227411, UNAM. Por excelente apoyo técnico a: Quím. Carmen Vázquez, L.Q.I. Israel López Quím. Concepción Arredondo, M.C. Francisco Fernández, Dra. Marina Vega, Mtra. Ma. Lourdes Palma Tirado, Daniel Mondragón, Antonio Prado y L.E.I. Daniel González-Espejel.

REFERENCIAS

- Abdelaziz, K. M., Hassan, A. M., Hodges, J. S. (2004). "Reproducibility of sterilized rubber impressions". *Brazilian Dental Journal*, vol.15, 209.
- American Dental Association Specification No. 18. (1992). "Alginate Impression Material".
- Barceló, F. H., Palma, M. (2003). *Materiales Dentales; Conocimientos básicos aplicados*, Trillas, México.
- Cova, J. L. (2012). *Biomateriales dentales*. AMOLCA, Caracas, Venezuela.
- Craig, G. R. (1985). *Materiales Dentales*, Interamericana. México.
- Guzmán, M. G., Dille, J., Godet S. (2008). "Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity". *World Academy of Science, Engineering and Technology*, vol. 43, 357.
- Kassaei, M. Z., Akhavan, A., Sheikh, N., Sodagar, A. (2008). "Antibacterial effects of a new dental acrylic resin containing silver nanoparticles". *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 110, núm. 3, 1699.
- Larsen, T., Fiehn, N. E., Peutzfeldt, A., Owall, B. (2000). "Disinfection of dental impressions an occlusal records by ultraviolet radiation". *The European Journal Prosthodontics Restorative Dentistry*, vol. 8, 71.
- Lepe X., Johnson, G. H., Berg, J. C., Aw, TC., Stroh, G.S. (2002). "Wettability, imbibition and mass change of disinfected low-viscosity impression materials". *The Journal Prosthetic Dentistry*, vol. 88, núm 3: 268.
- Martin, N., Martin, M. V., Jedyakiewicz, N. M. (2007). "The dimensional stability of dental impression materials following immersion in disinfecting solutions". *Dental Materials*, vol. 23,760.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, núm. 1-2, 55.
- Taylor, R. L., Wright, P. S., Maryan, C. (2002). "Disinfection procedures: their effect on the dimensional accuracy and surface quality of irreversible hydrocolloid impression materials and gypsum casts". *Dental Materials*, vol. 12, núm. 2, 103.

- Wadhwaniet, C. P., Johnson, G. H., Lepe, X., Raigrodski, A.J. (2005). "Accuracy of newly formulated fast-setting elastomeric impression materials". *Journal of Prosthetic Dentistry*, vol. 93, núm. 6, 530.
- Yildirim, M.S., Hasanreisoglu, U., Hasirci, N., Sultan, N. (2005). "Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers". *Journal of Oral Rehabilitation*, vol. 32, núm. 7, 518.