



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS**

“Preparación de resinas acrílicas cargadas con nanopartículas de cobre y sus propiedades antimicrobianas frente a *Candida albicans*”

Sebastián Adolfo Correa Hernández

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Cristián Covarrubias Gallardo

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Leyla Gómez Carranza

**Santiago - Chile
2012**

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo mantenido a través del tiempo.

A mi tutor Dr. Cristián Covarrubias y a la Prof. Leyla Gómez por su gran apoyo y motivación para la culminación de mis estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis.

Finalmente a los docentes que me ayudaron en asesorías y dudas presentadas a lo largo de mi educación y en el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION.....	3
MARCO TEORICO.....	5
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47

RESUMEN

INTRODUCCION. La rehabilitación de pacientes desdentados es vital para recuperar las funciones alteradas por la pérdida de las piezas dentarias. Existen distintos métodos de rehabilitación, siendo el más común la prótesis removible debido principalmente a razones económicas. El uso de estos aparatos produce una serie de alteraciones en la cavidad bucal, entre estas se encuentra la estomatitis asociada a levaduras del género *Candida*. El microorganismo que se ha detectado con mayor frecuencia en este tipo de lesiones es *Candida albicans*, por lo que se considera fundamental para el desarrollo de esta patología. Se ha visto que para que esta infección se produzca se debe colonizar en un primer momento la prótesis removible, este sería el primer paso para la generar la infección de la mucosa oral. El tratamiento de este tipo de lesiones puede resultar difícil, particularmente en pacientes con condiciones predisponentes. Por esta razón se deben promover acciones preventivas que eviten que esta se produzca. Actualmente se ha descubierto que nanopartículas metálicas poseen un fuerte efecto antimicrobiano, por lo que se están utilizando actualmente en el área médica con el objetivo de prevenir infecciones. Los metales más utilizados con este fin son el cobre y la plata. En el presente estudio se utilizaron nanopartículas de cobre (CuNPs) para fabricar un nuevo material en base a acrílico para determinar la capacidad de estas CuNPs de inhibir el crecimiento de *C. albicans*, una levadura comensal de la microbiota oral, analizando el fenómeno en la superficie de los compósitos como en el medio de cultivo en el cual se sumergieron las muestras.

METODOS. Se fabricaron muestras de acrílico cargadas con distintas concentraciones de CuNPs. La caracterización de estas se realizó mediante espectroscopía VIS-UV y espectrometría de energía dispersiva. Las muestras de acrílico se sumergieron en caldos de cultivo en los que se sembraron colonias de *Candida albicans* para evaluar si se detectaba alguna actividad antimicrobiana en relación al control. Se realizó un recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) a partir de diluciones del sobrenadante y del eluido desde de la superficie de las muestras.

RESULTADOS. No se apreciaron diferencias significativas al comparar el

crecimiento de microorganismos en el medio de cultivo. Sin embargo a partir de los eluidos se pudo ver una disminución considerable en el número de UFC obtenidas desde las muestras cargadas con CuNPs y las muestras control. Este efecto fue directamente proporcional a la cantidad de CuNPs presentes en la resina. La actividad antimicrobiana se mantiene con el paso de los días.

CONCLUSIONES. Las resinas acrílicas cargadas con CuNPs poseen una marcada actividad antimicrobiana frente a *Candida albicans* cuando esta entra en contacto con su superficie. Este efecto es directamente proporcional a la cantidad de CuNPs presentes en su composición y es sostenido en el tiempo. Las propiedades presentadas por este material sugieren que podría ser utilizado para la fabricación de prótesis removible con el objetivo de disminuir la incidencia de Candidiasis oral.

INTRODUCCION

La expectativa de vida de la población ha aumentado significativamente durante las últimas décadas. En 1900 se estimaba en 23,5 años para los hombres y 23,6 años para las mujeres, en el 2002 este indicador era de 74,4 años para los hombres y de 80,4 para las mujeres, mientras que en el 2009, la esperanza de vida era de 76 años para los hombres y de 82 para las mujeres, con un promedio de 79 años [1]. Este envejecimiento de la población genera desde el punto de vista de la salud pública, la necesidad de tener en mayor consideración patologías que afectan a pacientes de estos grupos etarios. En el contexto odontológico se estima que el 98% de la población entre 65 a 74 años sufre de algún grado de desdentamiento, lo que trae como consecuencia la alteración de una serie de funciones [2]. Actualmente el principal medio de rehabilitación de estos pacientes es mediante el uso de prótesis removible, debido al alto costo de otros medios de rehabilitación; sin embargo el uso de estos dispositivos genera una serie de trastornos en la cavidad bucal. Entre las patologías más relevantes se encuentran las estomatitis generadas como consecuencia de la infección por levaduras del género *Candida* que colonizan las prótesis removibles, las que se conocen en general con el término de candidiasis oral.

Frente a esta situación, y debido a lo difícil que resulta el manejo de esta patología, se han desarrollado diversos métodos para prevenir esta infección en los pacientes portadores de prótesis. Estos van desde lograr una mejor higiene de los pacientes a modificar la dieta para evitar el desarrollo de estos microorganismos. Sin embargo, existe una gran cantidad de pacientes en los que estas medidas no son suficientes para controlar la infección.

En los últimos años se han desarrollado una serie de modificaciones a los materiales de uso médico con el objetivo de prevenir su colonización por parte de microorganismos, lo que podría ser aplicado a los materiales utilizados para la confección de prótesis removible.

Algunos metales, como el cobre y la plata, han mostrado poseer una marcada actividad antimicrobiana, por esta razón actualmente se están utilizando para la fabricación de materiales de uso médico. Con el avance de la nanotecnología se han

desarrollado nanopartículas metálicas que presentan propiedades mejoradas al material en su estado macro.

En este trabajo se estudiará la preparación de una resina acrílica de uso odontológico con propiedades antimicrobianas al incorporar en su interior nanopartículas de cobre (CuNPs). Estas propiedades se evaluarán frente a *Candida albicans*, un patógeno involucrado en el desarrollo de Candidiasis oral.

MARCO TEORICO

Actualmente, las patologías bucales más prevalentes en la población son caries dental y la enfermedad periodontal. Estas patologías con el paso de los años, en caso de no recibir tratamiento, producen una destrucción y posteriormente la pérdida de las piezas dentarias, lo que afecta la calidad de vida de los individuos en términos de dolor, malestar, limitación y minusvalía social y funcional [2].

Según los datos obtenidos en la Encuesta Nacional de Salud [2], realizada en Chile el año 2003, entre los adultos de 35 a 44 años solo un 20% conserva su dentadura completa, este porcentaje disminuye a un 1% en los adultos de 65 a 74 años. Además se puede apreciar que la población de 35 a 44 años tiene un promedio de 6,5 dientes perdidos, llegando esta cifra a un 15,8 en la población de 65 a 74 años.

Frente a esta situación, en el ámbito de la odontología, se han desarrollado distintos métodos para remplazar las piezas dentarias pérdidas, y de esta forma recuperar todas las funciones que se ven afectadas producto de su destrucción. Los medios de rehabilitación más utilizados en odontología actualmente son las prótesis fijas, prótesis removibles y la rehabilitación sobre implantes. El tratamiento adecuado para cada paciente depende de una serie de factores como la edad, aspectos psicológicos, la necesidad de estética y el costo de este, entre otros [3]. Dado el alto costo económico que implica la rehabilitación mediante implantes y que el tratamiento de prótesis fija se limita solo a vanos desdentados cortos, es que el uso de prótesis removible se encuentra ampliamente masificado en la población. Este fenómeno se produce debido a que los pacientes no tienen la posibilidad de ser sometidos a otro tipo de rehabilitación, principalmente por el rechazo a ser intervenidos quirúrgicamente, ya sea por condiciones de salud precaria o razones económicas [4]. Por esta razón la prótesis removible es actualmente una alternativa en la rehabilitación de pacientes parcial o totalmente desdentados, especialmente en grupos de escasos recursos, y es la principal forma de rehabilitación en los servicios de atención primaria del país.

Estomatitis

El término estomatitis se refiere a cualquier condición inflamatoria del tejido oral, incluyendo la mucosa, tejido pulpar, periapical y periodontal. Por lo que se asocia con un gran número de patologías [5]. Entre estas se encuentra la estomatitis asociada al uso de prótesis, más conocida como estomatitis subprotésica, que se refiere a la inflamación de la mucosa que entra en contacto con esta [6].

Estomatitis en pacientes portadores de prótesis.

A pesar de ser utilizada en forma masiva, la prótesis removible tienen el potencial de impactar de distintas maneras en la salud oral. Por esta razón se prefieren otras alternativas de rehabilitación cuando esto sea posible. Existe abundante evidencia de que el uso de prótesis aumenta, la acumulación de placa y la incidencia de gingivitis. Estos resultados no son tan categóricos para la periodontitis, ya que no se ha demostrado asociación directa en la incidencia de ésta. En relación a las lesiones cariosas, se produce un aumento en la incidencia de caries radicales principalmente en las piezas pilares [7]. Además, se ha detectado que el uso de estos aparatos puede producir una serie de alteraciones en la mucosa que cubren siendo la más común la estomatitis subprotésica, que se presenta como una inflamación y eritema de la mucosa, en relación a la prótesis [6].

Se han identificado una serie de factores involucrados en el desarrollo de estomatitis subprotésica, tanto a nivel general como local, los que se asocian con una mayor incidencia de este tipo de lesiones:

- Condiciones generales: Edad del paciente, a mayor edad se ven más afectados . El género, ya que ésta se presenta con mayor frecuencia en mujeres. El consumo de tabaco y padecer alguna patología que comprometa el sistema inmune.

- Factores locales: El uso de prótesis antiguas y mal ajustadas, que aumentan el trauma y la irritación. La falta de higiene, tanto de la prótesis, como de la mucosa. El uso permanente del aparato y la presencia de infecciones microbianas [6].

Candidiasis Oral

Si se consideran solo las estomatitis subprotésicas generadas por infecciones, se estima que un gran porcentaje son producto de una respuesta exagerada del organismo frente una infección de la mucosa, por microorganismos que colonizan la superficie de la prótesis, entre estos se encuentran, en la mayoría de los casos, los hongos del género *Candida* [6]. Estos patógenos, son miembros comensales de la microbiota oral, y se encuentran presentes en alrededor del 40 por ciento de la población sin provocar problemas en la mayoría de estos. Sin embargo, su multiplicación descontrolada producto de un período de inmunosupresión o la presencia de factores locales, permite la colonización de los tejidos del paciente. Esto genera alteraciones en la mucosa oral, que se manifiestan con una serie de síntomas y signos, que se conocen genéricamente como **Candidiasis Oral** [8]. A pesar del gran porcentaje de portadores de levaduras del género *Candida*, esta patología no se da normalmente en la población, ya que el sistema inmune es capaz de mantener el número de microorganismos en equilibrio, sin embargo este puede ser alterado por una serie de condiciones. Los factores predisponentes más importantes para el desarrollo de Candidiasis oral son [9]:

- Fármacos: el uso de antibióticos de amplio espectro modifica la microbiota de la cavidad oral, lo que permite el aumento de microorganismos oportunistas, como es el caso de levaduras presentes en la cavidad oral. Fármacos inmunomoduladores, como los corticoides, que generan una alteración en la respuesta inmune del paciente, lo que aumenta la susceptibilidad a infecciones. Las drogas que producen xerostomía como efecto secundario, entre los más utilizados se encuentran los antidepresivos, antipsicóticos, anticolinérgicos, antihipertensivos y antiadrenérgicos. Estos disminuyen las acciones protectoras de la saliva,

tanto por el lavado que genera de la superficie, como por la acción de moléculas antifúngicas presentes en su composición [9].

- Quimio y radioterapia: estos tratamientos generan una citotoxicidad que se asocia con una disminución en los sistemas de defensa del hospedero, que puede generar una candidiasis oral. Se ha visto que la incidencia de candidiasis oral en estos pacientes es de un 30-94%. Además pueden afectar las glándulas salivales, disminuyendo el flujo salival [9].
- Dieta: La malnutrición, puede generar una disminución en las defensas del hospedero o una pérdida de la integridad de la mucosa oral, principalmente una deficiencia de hierro, folatos, Vitamina C, B y A. El exceso de carbohidratos en la dieta promueve el crecimiento y la adherencia de especies de levaduras del género *Candida* a la mucosa oral [10].
- Diabetes: El mal control de la enfermedad provoca un aumento de glicemia, pudiendo afectar la colonización de levaduras en la cavidad oral, debido a alteraciones que facilitan y promueven el desarrollo de microorganismos tales como la disminución del flujo y el pH salival y el aumento de los niveles de glucosa en la saliva [10].
- Desórdenes inmunológicos: La Candidiasis oral, es una manifestación común de muchas inmunodeficiencias, las que generan un aumento en la susceptibilidad a infecciones de este tipo [11]. Estudios demuestran que más de un 60% de los pacientes infectados con VIH sufre de Candidiasis y esta cifra aumenta a 80%, en pacientes diagnosticados de SIDA. Las manifestaciones más comunes en estos son Candidiasis pseudomembranosa y Candidiasis eritematosa [10].
- Alteraciones en la Saliva: Existen factores que pueden alterar tanto el flujo como la composición salival, en este sentido la hiposalivación y disminución del pH salival, se asocian con un aumento en la incidencia de candidiasis oral. El consumo de tabaco, alcohol y cafeína, reducen el flujo

salival. Pacientes que padecen del síndrome de Sjogren, presentan mayores recuentos de levaduras en la cavidad oral. Portadores de VIH y hepatitis C pueden desarrollar una sialoadenitis linfocítica, que produce una hipofunción glandular, aumentando el riesgo de sufrir Candidiasis [9].

El término candidiasis oral se refiere a una serie de condiciones, por lo que se han subdividido y clasificado con el objetivo de distinguirlas entre si y otorgar el tratamiento adecuado a cada infección particular. Si se considera el origen de la infección, las candidiasis orales pueden ser clasificadas como primarias y secundarias. Las primeras se refieren a las infecciones que se originaron en la cavidad oral o en los tejidos periorales. Mientras que la candidiasis secundaria, a infecciones que se producen en la cavidad oral producto de una infección sistémica de hongos del género *Candida* [12,13]. Las Candidiasis primarias se pueden subdividir en función de las formas en que se presentan; se reconocen cuatro distintas, dos de ellas transitorias *Candidiasis Pseudomembranosa Aguda* y *Candidiasis Eritematosa Aguda*, y dos formas persistentes, *Candidiasis Crónica Hiperplásica* y *Candidiasis Crónica Atrófica*. Cada tipo de infección, se asocia con ciertos signos clínicos y síntomas, que son influenciados por un amplio rango de factores predisponentes [14]. De estas presentaciones, existe una que se asocia directamente con el uso de prótesis removible, la *Candidiasis Crónica Atrófica*, esta se distingue de otros tipos de Candidiasis porque se presenta en áreas que están cubiertas por estos aparatos, como el paladar duro, y se aprecia como eritema y edema de la zona [8]. Se considera que un 26% de los portadores de prótesis se ven afectados por esta patología, y los principales síntomas son el dolor y ardor de la zona.

Por su parte, Candidiasis Crónica Atrófica ha sido clasificada en función de qué tan importante sea el compromiso de la mucosa cubierta por la prótesis. Se distinguen tres presentaciones [12,15]:

- Tipo I, corresponde a una inflamación local, que se manifiesta como máculas hiperémicas bien definidas.

- Tipo II se presenta como un eritema difuso de una parte o toda la zona cubierta por la prótesis.
- Tipo III, o tipo granular, compromete generalmente al paladar duro o al reborde alveolar formando una hiperplasia papilar.

Levaduras del Género Candida

Las levaduras del género *Candida* pertenecen al Phylum Ascomycota, este género incluye aproximadamente 150 especies identificadas. Estos microorganismos, corresponden a levaduras mitospóricas alargadas o ligeramente redondas que se reproducen por gemación (blastoconidios). A excepción de *C. glabrata*, el resto de las especies asociadas a candidiasis pueden formar pseudomicelios; *C. albicans* y *C. dubliniensis* además son formadoras de hifas. Aunque se han reportado más de 17 especies patógenas, el 90% de las infecciones se atribuyen a: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C. tropicalis* [16].

Candida albicans

Al investigar los microorganismos que se ven involucrados en el desarrollo de la Candidiasis oral, se han identificado varias especies de levaduras del género *Candida*. De las que se han podido aislar en zonas comprometidas, las más relevantes son *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei* y *C. guilliermondii*, sin embargo, entre todas estas, *Candida albicans* es la que con mayor frecuencia se aísla de lesiones de la cavidad oral, por lo que se considera la más importante en el desarrollo de Candidiasis a este nivel [14,17].

Se considera que *C. albicans* coloniza en primer lugar el dorso de la lengua, y que, desde ahí, es capaz de colonizar otros sitios de la cavidad oral, como la mucosa y piezas dentarias que son colonizados en forma secundaria [17]. Las razones principales, por las que se considera que esta especie es la más importante en el desarrollo de infecciones en la cavidad oral, además de la frecuencia con la que se presenta en las lesiones, es porque se ha determinado,

tanto en animales así como *in vitro*, que *Candida albicans* expresa una mayor cantidad de factores de virulencia asociados a la patogenicidad de las especies del género *Candida*, de estos los más importantes son [14]:

1. Adhesión a la mucosa del hospedero: Es necesaria para la colonización inicial del hospedero. Estos microorganismos tienen la capacidad de adherirse a varios tipos celulares, incluyendo células epiteliales, endoteliales y fagocíticas.
2. Secreción de proteinasas: De estas las más importantes son, las proteasas aspárticas, ya que son consideradas cruciales en el desarrollo de la infección por *Candida*. Se caracterizan por mostrar una mayor actividad en condiciones de acidez.
3. Formación de hifas: la mayoría de las especies del género *Candida* modifican su morfología, dependiendo de las condiciones ambientales, variando desde levaduras a pseudohifas e hifas. Se cree que las hifas, juegan un rol fundamental en la invasión de tejidos y biomateriales.

El mecanismo principal, que permite que estos microorganismos puedan mantenerse en la cavidad oral, a pesar de todas las medidas de protección que existen, es mediante la formación de biofilms. Estos son comunidades de microorganismos, que se encuentran adheridos a una superficie, ya sea de algún material o de algún tejido orgánico. Están compuestos por una matriz extracelular de polisacáridos que es producida por los mismos integrantes de la película [18]. Este es el medio preferido para el crecimiento, y se ha reportado que especies del género *Candida* poseen la habilidad de formar biofilms con una virulencia mayor que otras levaduras [14]. El biofilm, protege a las células de la acción de remoción mecánica que producen la saliva y el fluido crevicular, además, funciona como barrera protectora frente a la penetración de factores de la respuesta inmune del hospedero y de antimicrobianos administrados. La formación del biofilm de *C. albicans*, es un proceso que se puede dividir en distintas etapas, comienza con la adhesión al sustrato [18], seguido por la proliferación de las levaduras a lo largo de la superficie de este y el desarrollo de hifas. Finalmente, se produce la etapa de maduración, que

consiste en una disminución en el crecimiento de levaduras y un aumento en el crecimiento de hifas; paralelo a esto se produce el desarrollo de la matriz extracelular [19].

La adhesión inicial de las levaduras al hospedero es fundamental para el desarrollo posterior del biofilm, esta se produce a través de distintos mecanismos de adhesión, los que se separan en específicos y no específicos. Una forma no específica de adhesión, es la atracción de las moléculas superficiales de *C. albicans* al sitio en que se producirá la fijación. Normalmente, la superficie del material se cubre rápidamente con proteínas provenientes de la saliva, las cuales junto a fuerzas electrostáticas, generan una proximidad entre los microorganismos y la superficie del hospedero, permitiendo la acción de los mecanismos de adhesión específicos, a través de una serie de adhesinas ubicadas en la superficie celular. En el caso de *Candida*, esta unión inicial se produce en la forma de levadura. Una vez que se ha formado una unión firme, a través de las adhesinas específicas y los receptores del hospedero, se produce la proliferación mediante un crecimiento de las levaduras y la generación de extensiones filamentosas. Se cree que son las hifas las que conformarán el mayor componente del biofilm y que las levaduras permiten solo la unión inicial. Este tipo de crecimiento de las levaduras para permitir la formación de las hifas está determinado por una serie de factores, entre ellos [14]:

1. La habilidad del hospedero de generar mecanismos de defensa innatos.
2. La competencia que exista en el medio por nutrientes necesarios para el crecimiento.
3. El espacio disponible, para la proliferación y la competencia que se generará con otros microorganismos presentes en la cavidad oral.
4. La regulación del biofilm, que se produce por las mismas levaduras del género *Candida*.

Prótesis removible y Candidiasis oral.

Las razones por las que el uso de prótesis removible funciona como un factor local, que puede facilitar el desarrollo de algunas formas de candidiasis oral son varias. Principalmente, se genera debido a que se produce un microambiente entre la mucosa y el acrílico, que se caracteriza por poseer una baja cantidad de oxígeno y bajo pH, generando un ambiente anaeróbico ideal para la proliferación de microorganismos [7, 8]. Además, se produce un menor flujo de saliva en la zona por el uso del aparato, impidiendo el arrastre de los microorganismos, esto sumado a una mala higiene oral, genera las condiciones ideales para que se produzca un sobrecrecimiento de levaduras del género *Candida* [6]. La limpieza inadecuada de las prótesis, permite que se desarrolle rápidamente un biofilm de agentes patógenos en la superficie, los que luego colonizaran la mucosa oral. Los pacientes que mantienen una adecuada higiene de la prótesis, presentan una menor incidencia de infecciones por este tipo de patógenos [6]. Desafortunadamente, los pacientes que utilizan prótesis removibles generalmente son adultos mayores, quienes pueden presentar una serie de impedimentos físicos y psicológicos, que dificultan realizar una adecuada limpieza de estas, permitiendo de esa forma la formación del biofilm en la superficie.

Otro factor importante de considerar al momento de evaluar la importancia del uso de prótesis removible en la incidencia de candidiasis, es el hecho de que el principal material de fabricación de prótesis removibles actualmente, son las resinas acrílicas. Este es el material preferido, debido a la facilidad con que adquieren la forma deseada y permanecen estables en el tiempo. Generalmente, para este proceso se realiza la mezcla de un polvo que contiene polímeros de metil metacrilato con un líquido que contenga monómeros de metil metacrilato en una proporción determinada [20], luego esta se adapta a un molde, que reproduce la anatomía del paciente para lograr una adaptación adecuada a los tejidos biológicos. Existe una gran cantidad de evidencia, que indica que los hongos del género *Candida* son capaces de adherirse a su superficie de este material, y que este por sus características facilitaría esta unión [21]. Esto permite la formación del biofilms, por lo que es el primer paso para colonizar al hospedero y generar distintos grados de estomatitis en la mucosa adyacente [22,23,24].

El proceso de adhesión de los microorganismos a los biomateriales, es distinto al que se produce en el proceso de colonización del hospedero [24]. Para que se produzca esta adhesión de los microbios a la superficie de biomateriales, se deben considerar una serie de factores. Por un lado, se deben tener en cuenta las propiedades del material, en este son relevantes las características de la superficie y su composición. Mientras que los microorganismos, también deben poseer ciertas características que permitan su adhesión al material, en este caso, las consideraciones más importantes son las propiedades fisicoquímicas de la superficie celular, además de su carga e hidrofobia [24]. Si se analiza la superficie del material que será colonizado, las características que lo hacen más o menos susceptible a la invasión por los microorganismos son:

- **Energía superficial:** Este es uno de los aspectos fundamentales a considerar en el desarrollo del biofilm. Se define como la interacción, entre fuerzas de cohesión y adhesión y predice si ocurrirá o no la humectación de la superficie del material. Mientras mayor sea la energía superficial, mayor será la adhesión de microorganismos y por el contrario, mientras ésta sea más hidrofóbica menor será la adherencia [24].
- **Rugosidad de la superficie:** esta se calcula como la desviación media aritmética entre los valles y picos de una superficie determinada. Influencia directamente la adherencia inicial de los microorganismos a la superficie, el desarrollo del biofilm y la colonización de especies del género *Candida*. Los materiales más rugosos, exhiben un mayor recuento de levaduras. Esto ocurre, porque las irregularidades proveen una mayor protección y retención de los microorganismos frente a fuerzas que puedan removerlos [24].

Estas características superficiales, son fundamentales en la adhesión inicial de los microorganismos a la superficie del sustrato, pero pueden ser modificadas en la cavidad oral, principalmente por la presencia de saliva. Esta, juega un papel importante en el proceso de colonización de las levaduras, ya que tiene la capacidad de cambiar las características iniciales del material. Esta modificación, se produce por la formación y composición de la película salival, que se formará en la superficie

del sustrato generando cambios en la capacidad de retener microorganismos. La influencia que tiene esta película es tal, que incluso puede llegar a ser más relevante que las propiedades del sustrato inicial [25]. Los estudios demuestran que la presencia de esta película es capaz de disminuir tanto la rugosidad como la energía superficial de las resinas acrílicas, lo que permitiría una menor adhesión de los microorganismos a la superficie. Sin embargo, se considera que el rol de la saliva en el proceso de adhesión de las levaduras es controversial. Por un lado permite, además de la modificación de la superficie, la remoción física de microorganismos y la acción de enzimas de la inmunidad innata, como las lisozimas, histatinas, lactoferrinas, calprotectinas y la IgAs que son cruciales para disminuir la carga de microorganismos en la cavidad oral. Pero por otro lado, existe una serie de moléculas presentes en la saliva como la mucina, estaterina y proteínas ricas en prolina que son capaces de adsorber a *C. albicans*, facilitando su adherencia inicial a la superficie del material [24].

Tratamiento de Candidiasis oral

El tratamiento y manejo de la candidiasis oral es complejo, ya que requiere de un análisis detallado del paciente y de un diagnóstico adecuado. Esto permite una correcta identificación, y si es posible la corrección de los factores de riesgo que presenta el paciente. El objetivo es disminuir la carga de microorganismos a niveles en que el sistema vuelva a estar en equilibrio. Si los factores que predisponen al paciente a padecer la patología no son modificados el tratamiento que se realice solo permitirá una remisión temporal de la infección, ya que una vez terminado éste el equilibrio se ve alterado nuevamente [14, 15].

Para tratar a un paciente con Candidiasis oral se deben manejar varios aspectos. Como parte esencial del tratamiento, se debe enseñar al paciente una técnica de higiene apropiada que permita la remoción completa del biofilm, tanto de la superficie de la mucosa como de la prótesis [15]. Esto es fundamental, ya que es la única forma de disminuir la carga microbiana, lo que permite la recuperación de los tejidos. Para una mejor desinfección de las mucosas se puede utilizar, además del cepillado, enjuagues bucales que posean actividad frente a *Candida* como la clorhexidina y el triclosan. Es importante explicar al paciente la importancia de dejar

de fumar, ya que el tabaco genera una mayor incidencia de candidiasis oral [26]. Finalmente, se deben detectar y corregir cualquier deficiencia en la dieta, como una inapropiada ingesta de carbohidratos [14]. En la mayoría de los pacientes, estas medidas son suficientes para controlar la infección, sin embargo existe un gran porcentaje en los que a pesar de que se cumplan estas intervenciones la enfermedad no se podrá controlar. La razón de esto es que existen otros factores involucrados, que no pueden ser modificados, como es el caso de pacientes con VIH o pacientes que han sido sometidos a trasplante de órganos, que se encuentran bajo tratamiento con inmunosupresores. En estos casos en particular y en otros en que la patología no se controla con las medidas iniciales se recurre al tratamiento en base al uso de agentes antifúngicos.

Actualmente, se conocen una serie de antifúngicos que han demostrado ser efectivos para el tratamiento de la candidiasis, estos se han clasificado en cuatro categorías:

1. Polienos: Entre los que están Nistatina y la Anfotericina B.
2. Triazoles: Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol y Posaconazol.
3. Equinocandinas: Caspofungina, Micafungina, Anidulafungina.
4. Flucitosina.

El tratamiento con cada uno de estos posee indicaciones especiales, por lo que los clínicos deben familiarizarse con el mecanismo de acción de cada uno de estos fármacos con el objetivo de lograr su mejor rendimiento [27]. Estos fármacos, pueden ser administrados de dos maneras, tópicamente o mediante su uso a nivel sistémico. En los pacientes con Candidiasis, los antifúngicos sistémicos son utilizados principalmente para el tratamiento de infecciones refractarias al uso de antimicóticos tópicos, o en pacientes inmunosuprimidos, los que poseen un riesgo elevado de que la infección se disemine por el organismo [8,15]. Sin duda, el desarrollo de este tipo de sustancias ha significado un gran avance en el manejo de este tipo de patologías. Sin embargo, es importante considerar que el uso de este

tipo de compuestos puede producir una serie de reacciones adversas en el paciente, debido a que los fármacos por sus diversos mecanismos de acción afectan, además de los microorganismos, a las células del hospedero. Entre las reacciones que se pueden generar como consecuencia del uso de estos antifúngicos las más importantes son: dolores de cabeza, náuseas, vómitos y malestar gastrointestinal en general. Algunos de estos compuestos pueden ser hepatotóxicos, debido a que su mecanismo de eliminación del organismo como el Ketoconazol y el Itraconazol, Posaconazol, por su parte puede generar neutropenia. Se debe considerar además, que en general estos fármacos pueden interactuar con otros medicamentos, por lo que se debe realizar una completa anamnesis antes de prescribirlos [15]. Por ello, se trata de evitar el uso de fármacos sistémicos a no ser que sea realmente necesario. Por esta razón, en casos de Candididiasis menos agresivas los antifúngicos tópicos son la primera línea terapéutica [8, 12, 15]. Estas sustancias, generalmente actúan bien al ser utilizadas directamente en contacto con la lesión. Sin embargo, debido a la forma en que se deben administrar suelen ser poco efectivos en comparación con el uso sistémico, por varias razones, como la necesidad de la aplicación frecuente del fármaco en la superficie afectada, lo que no siempre es realizado por los pacientes. Además, este tipo de fármacos se caracterizan por poseer mal sabor, generar incomodidad durante su uso y mantenerse por poco tiempo en contacto con la mucosa oral [15]. Por otra parte, también se pueden producir varias reacciones adversas por el contacto del fármaco con la lesión, en este caso las más importantes son la irritación de la mucosa o la piel, alteración en el gusto y ardor de la zona.

Considerando lo complejo que resulta el tratamiento de las infecciones fúngicas, y las complicaciones que produce el uso de fármacos, así como el aumento de la resistencia de estos microorganismos a los antifúngicos en el último tiempo; muchos investigadores han intentado desarrollar nuevos agentes que permitan prevenir la infección del hospedero [28]. Una de las estrategias que ha sido foco de las investigaciones durante los últimos años es modificar la superficie de los biomateriales con el objetivo de hacerlos menos susceptibles a la colonización por parte de los microorganismos, incluyendo levaduras del género *Candida*. Estos acercamientos incluyen una serie de modificaciones de los materiales, como por ejemplo el revestimiento de la superficie de estos con sustancias químicas como silanos [29], clorhexidina e histatina [30], para prevenir la colonización de la

superficie. Además, recientemente se ha visto que la formación de una película de polímero con antifúngicos incorporados en la superficie de acrílico dental han mostrado un menor desarrollo de *C. albicans* [31]. Estos avances, podrían permitir disminuir la colonización de los materiales y la formación de biofilms en la superficie de aparatos de uso médico, especialmente en aquellos en que su limpieza es difícil [14].

Metales antimicrobianos

En el contexto de la búsqueda de nuevos materiales aparecen los metales, las propiedades antimicrobianas de ciertos metales como la plata y el cobre son ampliamente conocidas. La plata ha demostrado ser un antimicrobiano de amplio espectro activo frente a bacterias gram negativo y gram positivo, hongos, protozoos y algunos virus, incluyendo cepas resistentes a antibióticos. Por esto ha sido utilizada para reducir el número de infecciones en el tratamiento de heridas, para prevenir la colonización de instrumentos de uso médico, e incluso para el tratamiento de aguas. Al ser usada como antiséptico, ha demostrado ser efectiva en una gran variedad de materiales, incluyendo el vidrio, titanio y polímeros [32]. El mecanismo por el que se produce el efecto antimicrobiano no está del todo claro, pero se cree que estos reaccionan con proteínas de la membrana de los microorganismos [33]. Esta acción se produce específicamente con los grupos –SH, generando una inactivación de estas y por consecuencia la muerte de estos microorganismo [34].

Por su parte el cobre ha sido utilizado como antimicrobiano desde hace siglos, los egipcios el año 2000 a.C. ya lo utilizaban para esterilizar el agua y en la desinfección de heridas. Por lo que a lo largo de la historia se han investigado sus propiedades y se le ha dado una serie de usos relacionados con el control y prevención de infecciones. Son varios los mecanismos mediante los cuales el cobre es capaz de actuar como antimicrobiano, estos producen la destrucción de los microorganismos incluso al estar en contacto con su superficie por pocos minutos. Se ha descrito que en la superficie de los patógenos es el primer lugar en el que el cobre tiene efectos, este daño inicial se produce en los lipopolisacaridos ubicados fuera de la membrana plasmática, estos se destruyen en un principio mientras que la

parte interior de las bacterias permanece intacta. Al parecer la presencia de cobre produciría un cambio importante en la permeabilidad de la membrana de los microorganismos, alterando el transporte de moléculas a través de esta. Estos cambios en la membrana permiten el paso de sustancias al interior de manera descontrolada, lo que genera como punto final la destrucción del microorganismo [35]. Al comparar qué tan significativo es el cambio en la permeabilidad de la membrana, se ha visto que esta depende de la cantidad de ácidos grasos que esta posea, mientras mayor sea la cantidad de estos mayor la permeabilidad.

El cobre, por otra parte posee la capacidad de alterar la función de un gran número de proteínas presentes en los microorganismos, tanto de la superficie celular como en su interior. El metal al estar en contacto con la célula, produce una alteración en sus proteínas, lo que lleva a una alteración de la estructura y función celular. Mientras mayor sea la concentración de cobre en el medio, más alta es la posibilidad de que las proteínas sean modificadas. Este efecto se explica a través de dos mecanismos [35]:

- El desplazamiento de metales esenciales desde los sitios de unión en las proteínas o mediante interacciones directas con alguna parte de esta. Lo que genera este proceso son cambios conformacionales de la proteína o de sus sitios activos, lo que impide que esta pueda cumplir su función.
- El cobre además altera la forma de las proteínas mediante el ataque de radicales libres contra aminoácidos, especialmente de histidina y prolina, causando alteraciones importantes en la estructura de la proteína que pueden llevar a su destrucción.

Otro mecanismo que permite explicar el potente efecto antimicrobiano del cobre es el daño que generan los iones de cobre en los ácidos nucleicos. Mediante la formación de enlaces, entre las cadenas y dentro de estas, el cobre es capaz de alterar la estructura en forma de hélice del ADN, generando la desnaturalización de la molécula. Se ha sugerido además que luego de la unión del cobre a las hebras de

ADN se producen ciclos repetidos de reacciones redox, estas llevan a la formación de muchos radicales OH en el lugar de la unión causando múltiples daños a los ácidos nucleicos que se encuentran alrededor [35].

Por otra parte el cobre es capaz de generar una gran cantidad de radicales hidroxilos libres a través de la reacción reducción de Cu^+ a Cu^{2+} , los cuales pueden dañar a las estructuras microbianas que se encuentran alrededor como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas fundamentales para la vida del microorganismo. Esta propiedad hace que los iones de cobre sean un antimicrobiano particularmente efectivo [35].

Dado el posible daño que puede producir el cobre en los microorganismos, estos han ido evolucionando para prevenir las alteraciones que este pudiera generar en su estructura. Por esto en la actualidad muchas bacterias y hongos poseen mecanismos para contrarrestar cualquier exceso de cobre que se presente en su ambiente. Entre estos se encuentran la exclusión mediante una barrera de permeabilidad, secuestros de cobre intra y extracelular, quelación extracelular, entre otros. Estos mecanismos son efectivos, sin embargo cuando se sobrepasa cierto umbral en la concentración presente y el tiempo de exposición, que difiere entre los distintos microorganismos, esta termina siendo letal para los microorganismos. Esto se da principalmente debido al hecho de que el cobre es capaz de actuar en múltiples sitios simultáneamente y que los mecanismos de acción no son específicos para ciertas proteínas o microorganismos. Lo que genera que la tolerancia al cobre sea relativamente baja si se compara con la resistencia que existe actualmente a los antibióticos. Por lo tanto, en contraste con la alta resistencia que se ha generado a los antibióticos en 50 años de uso, encontrar microorganismos resistentes al cobre es extremadamente raro, a pesar de que este mineral siempre ha estado presente en la tierra [35].

Nanopartículas metálicas

En general los agentes bactericidas metálicos han cobrado reciente interés con el desarrollo de la **nanotecnología**. Esta disciplina se basa en el control de las propiedades de los materiales a una escala nanométrica (1-100 nm) [36] [37] con el

propósito de explotar propiedades distintas a las que posee el material a una escala normal. Se han desarrollado una serie de métodos para la fabricación de partículas nanométricas, algunos de estos son la reducción química, la reducción electroquímica, la vaporización del metal, entre otros [38]. Estos avances en el desarrollo de la nanociencia y la nanotecnología en las últimas décadas han generado la oportunidad de estudiar el efecto bactericida de estas nanopartículas metálicas.

El término **nanopartícula** se debe entender como un clúster o conglomerado de unos pocos átomos de un metal, que no alcanzan un tamaño mayor a los 100 nm. Las nanopartículas metálicas a diferencia de los iones metálicos, se encuentran en general en estado de oxidación cero. Estas nanopartículas por su tamaño adquieren nuevas propiedades en relación a las que tienen los mismos materiales en estado macro (metal) ó micrométrico (metal en polvo) [39]. Este fenómeno se produce debido a que sin importar la naturaleza del metal, los nanomateriales poseen un área superficial muy elevada en relación a su volumen. Estas modificaciones en las propiedades físicas de los materiales en estado nano, están determinadas por el efecto que generan los átomos ubicados en la capa superficial de la estructura y por presentar una mayor área superficial en relación al volumen de las nanopartículas, en comparación a la que se da en las estructuras micro ó macrométricas. Por ejemplo el oro es un elemento inerte en escala macro, sin embargo las nanopartículas de oro son extremadamente reactivas y pueden ser usadas como catalizadoras en reacciones. Con una mayor área superficial aumenta el número de sitios en los que pueden ocurrir las interacciones con el medio, lo que permite una mayor actividad química, biológica ó física. El desarrollo de la nanotecnología en los últimos años ha permitido un mayor control de las técnicas para sintetizar, modificar y caracterizar las propiedades de estas nanopartículas y evaluar su potencial uso en diferentes aplicaciones [40].

Las nanopartículas metálicas al poseer actividad antimicrobiana y ser incluidas en un material o al cubrir la superficie de este, tienen una gran cantidad de aplicaciones, como el tratamiento de aguas, la fabricación de instrumentos médicos o quirúrgicos, el procesamiento y empaque de comida, aparatos domésticos antimicrobianos, entre otros. Se han desarrollado materiales compuestos utilizando nanopartículas metálicas que poseen una gran actividad antimicrobiana [36]. Esta

mayor actividad sería, como se explicó anteriormente, consecuencia del aumento del área superficial del metal por reducción de su tamaño de partícula, lo que en este caso permite una mayor área de contacto del metal con los microorganismos [41].

La síntesis de estas nanopartículas se ha realizado utilizando varios metales, tales como el oro, magnesio, aluminio, titanio y zinc. Las nanopartículas más estudiadas desde el punto de vista bacteriológico son las de plata (AgNPs) y en menor grado las de cobre (CuNPs). Sin embargo, al analizar los estudios existentes en la literatura acerca de las propiedades antifúngicas de estas partículas, se puede apreciar que la información que existe es limitada. Las nanopartículas de plata (AgNP) exhiben un gran efecto antifúngico contra levaduras del género *Candida*, incluso en concentraciones muy bajas, disminuyendo posibles efectos citotóxicos si éstas entran en contacto con células humanas [42]. Se ha encontrado actividades antifúngica comparables entre las que logran las AgNPs con la que poseen la amfotericina B y el fluconazol [43]. Existe también un estudio previo que considera el comportamiento de las AgNPs al ser incluidas en una resina acrílica como las que se utilizan para la fabricación de prótesis [20]. En este trabajo se demuestra que la incorporación las AgNPs en resinas acrílica, produce un fuerte efecto antimicrobiano frente a *Escherichia coli* y una baja toxicidad en presencia de células humanas.

En el caso de las CuNPs, al compararlas con las AgNPs la información que existe en la literatura es menor. Se ha encontrado que las CuNPs presentan una actividad antibacteriana contra patógenos como *E. coli* y *B. subtilis* [34]. Si se considera la evidencia que existe sobre el uso de CuNPs como antifúngicos esta es aún menor, encontrándose un efecto positivo en levaduras como *S. cerevisiae* [44]. En un trabajo de Ramyadevi et al. [45] se utilizan CuNPs para evaluar el halo de inhibición que se generaba en un cultivo de *C. albicans*, lográndose un resultado positivo, de 23 mm alrededor de estas. Las CuNPs han sido incorporadas a varios materiales de uso médico para evitar la colonización microbiana, como fibras, látex, poliéster, entre otros [46], y se han desarrollado compósitos en base a polímeros que han tenido buenos resultados en hongos y bacterias [44]. Sin embargo, en la literatura científica no se encuentran evidencias que demuestren el comportamiento antimicrobiano que tendría la incorporación de estas nanopartículas en una resina acrílica dental, ni cómo afectaría esto en la colonización de la superficie del acrílico. La incorporación de las CuNPs en la resina acrílica usada para

la fabricación de prótesis dentales, podría generar un efecto antifúngico que reduzca la colonización de especies de levaduras del género *Candida*, previniendo de esta manera, el desarrollo de las patologías asociadas.

El propósito de esta investigación es estudiar la preparación de un material antimicrobiano de resina acrílica incorporando en su interior nanopartículas de cobre (CuNP) y evaluar el efecto que esta modificación generaría sobre el desarrollo de *Cándida albicans* en la superficie protésica. Esto con el objetivo de avanzar en el desarrollo de métodos que permitan disminuir la incidencia de Candidiasis oral en la población portadora de prótesis removible.

HIPÓTESIS

La incorporación de nanopartículas de cobre en resinas acrílicas de uso odontológico inhibe el crecimiento de *Candida albicans*.

OBJETIVO GENERAL

Preparar resinas acrílicas cargadas con nanopartículas de cobre y evaluar su capacidad de inhibir el crecimiento de *Candida albicans*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar resina acrílica cargada con nanopartículas de cobre (compósito CuNP/PMMA).
2. Caracterizar estructuralmente el material acrílico CuNP/PMMA.
3. Evaluar el efecto del material acrílico cargado CuNP sobre el crecimiento de *Candida albicans*.
4. Evaluar el efecto del material acrílico cargado CuNP sobre el crecimiento de *Candida albicans* en función del tiempo de exposición

MATERIALES Y MÉTODOS

I.- Síntesis resina acrílica cargada con nanopartículas de cobre.

Las resinas cargadas con CuNPs se prepararon utilizando un método de simultánea formación de las partículas y polimerización de la resina, descrito en la **Figura 1**. Para esto, se prepararon soluciones acuosas de acetato de cobre ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) de distinta concentración (0,05 M, 0,1 M, y 0,2 M) de estas se tomaron 100 μL los que se agregaron sobre 2 mL de alcohol. Sobre esta solución, se adicionaron 2 mL de acrílico líquido (Monómero, Marché) bajo agitación y a temperatura ambiente. La solución se mantuvo bajo agitación hasta la formación de las nanopartículas, lo cual se evidenció mediante el cambio de color de la suspensión. Esta solución de acrílico líquido cargada con las nanopartículas se mezcló con 6 gr de acrílico en polvo (Marché), con esto se forma una pasta, la que posteriormente se llevó a moldes cilíndricos de teflón de 1 cm de diámetro y 5 mm de alto para completar el proceso de curado. Además se prepararon muestras de acrílico del mismo tamaño sin CuNPs para ser usadas como control.

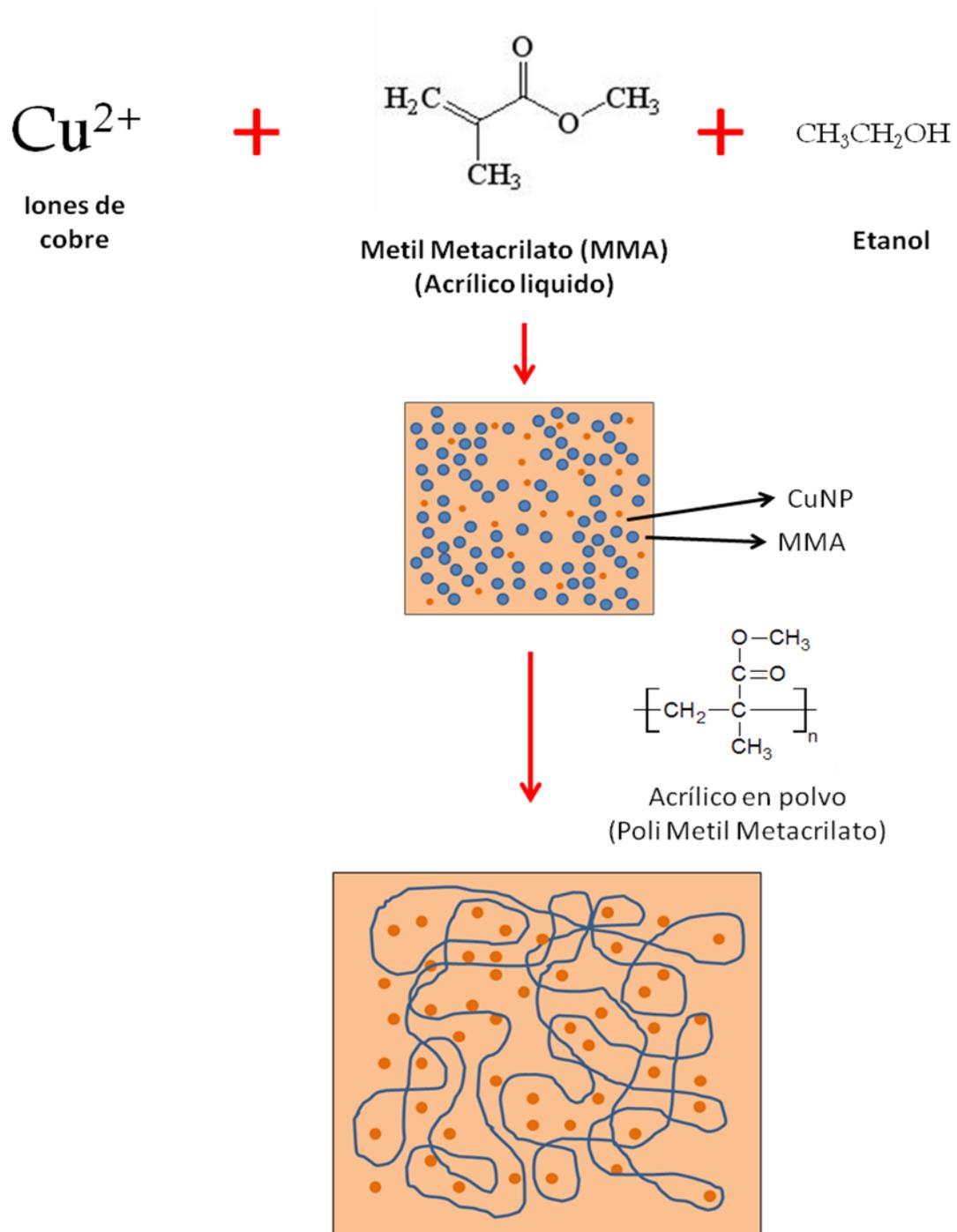


Figura 1. Esquema de síntesis de compósitos cargados con CuNPs.

A partir de las distintas concentraciones iniciales de las soluciones de acetato de cobre se obtuvieron tres diferentes compósitos con distintos contenidos de CuNPs en su interior: 38 µg/g (**Cu(38)/PMMA**), 75 µg/g (**Cu(75)/PMMA**) y 150 µg/g (**Cu(150)/PMMA**).

II.- Caracterización de las nanopartículas

II.1 Espectroscopia (UV-Vis).

La formación de CuNPs en la solución de acrílico líquido se confirmó mediante espectrometría de absorción molecular utilizando un espectrofotómetro (UNICAM UV2-100). La aparición de bandas de absorción en el espectro alrededor de longitudes de onda de 585 nm indican la presencia de partículas de cobre con tamaño nanométrico.

II.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) con Espectrometría de Energía Dispersiva (EDS).

Se utilizó un microscopio SEM Jeol JSM 5410 equipado con EDS. Este análisis fue usado con el propósito de examinar la superficie de los compósitos y detectar mediante microanálisis EDS la presencia de cobre en la muestra.

III.-Evaluación de las propiedades Fungicidas de los compósitos CuNP/PMMA

Obtención del inóculo.

Se sembraron colonias de *Candida albicans* (ATCC-90028) crecidas en agar Sabouraud con Cloranfenicol (0,5 mg/ml) en 10 ml de caldo Sabouraud con Cloranfenicol (CAF) (0,5 mg/ml), los que se incubaron durante 48 horas a 37°C en condiciones de aerobiosis (**Figura 2**). A partir de estos se prepararon nuevos cultivos con una concentración 0.5 de Mcfarland (equivalente a 1×10^6 a 5×10^6 UFC /ml),

para ello se utilizó un espectrofotómetro (HALO RB-10 UV-VIS RATIO BEAM) leyendo a una longitud de onda de 550 nm para obtener una densidad óptica de 0,125 en cada cultivo [47]. En cada uno de los tubos se sumergieron muestras de acrílico con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre (CuNPs/PMMA) y muestras sin CuNPs (PMMA) como control, la cuales se incubaron durante 48 horas a 37 °C en condiciones de aerobiosis (**Figura 3**).

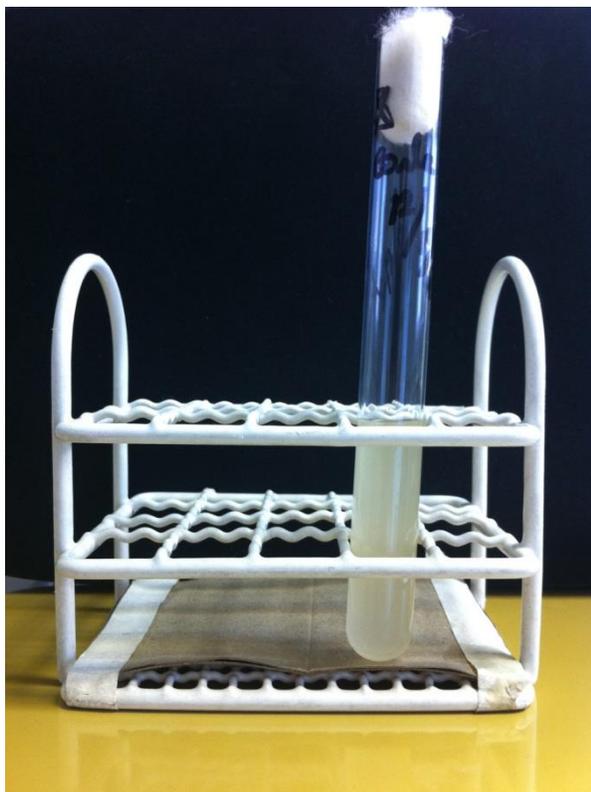


Figura 2. Cepa ATCC-90029 sembrada en caldo Sabouraud después de 48 horas.



Figura 3. Muestra de Cu(38)/PMMA incorporada en caldo de cultivo.

III.1 Evaluación del efecto antimicrobiano en líquido sobrenadante. (Método de recuento viable)

Pasado el tiempo de incubación, se sembraron en agar Sabouraud más CAF, 100 μ l sin diluir y 100 μ l de diluciones 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100.000 hechas en buffer fosfato estéril pH 7.4 de cada uno de los caldos en los cuales fueron sumergidas las muestras para recuento de colonias. Las placas de agar se incubaron (incubadora LabTech LBI-150M) durante 48 horas a 37°C en condiciones de aerobiosis.

III.2 Evaluación del efecto antimicrobiano en la superficie del compuesto CuNP/PMMA.

Completadas las 48 horas de incubación se retiraron las muestras de acrílico de los cultivos y se sometieron a un lavado con 10 ml de suero fisiológico durante 30 segundos agitando con Vortex (Thermolyne Maxi Mix 2). Posteriormente, con el propósito de remover las levaduras adheridas sobre la superficie del acrílico; cada muestra se sumergió en una solución surfactante estéril (NaCl 0.9% con Tween 80 al 1%) [48], durante 10 minutos. Pasado este tiempo se agitó el tubo en Vortex

(Thermolyne Maxi Mix 2) por 30 segundos. De la solución obtenida de cada muestra, se sembraron en placas de agar Sabouraud 100 µl sin diluir y 100 µl de diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 hechas en buffer fosfato estéril pH 7.4. Las placas se cultivaron durante 48 horas a 37°C en condiciones de aerobiosis para el recuento de colonias.

III.3 Evaluación de las propiedades antimicrobianas en el tiempo.

Con el objetivo de comprobar el efecto antimicrobiano de los compósitos en el tiempo, las muestras con la mayor concentración de CuNPs (Cu(150)/PMMA) se incubaron en caldos de cultivo con una concentración de levaduras igual a 0,5 McFarland durante 9 días. El efecto antimicrobiano se evaluó a los 2, 4, 7 y 9 días usando el mismo método antes descrito para la siembra de los eluidos de levaduras desde la superficie del acrílico. El medio de cultivo con levaduras en el cual estaban sumergidos los compósitos se fue renovando cada 48 horas por un cultivo fresco a una concentración igual a 0,5 McFarland.

Una vez pasado el tiempo de incubación se realizó el recuento de colonias crecidas en las placas de agar Sabouraud.

IV. Análisis de error de los ensayos.

Cada ensayo fue repetido en cinco oportunidades, procesando cuatro muestras por duplicado en cada ensayo, por otra parte cuando se estudio el efecto de las CuNPs en el tiempo se procesaron un total de 36 muestras. En el estudio se utilizó un total de 76 muestras entre CuNP/PMMA y PMMA. Los valores finales para cada muestra se expresaron como un **Promedio** (\bar{X}) de los valores de cada ensayo y con el correspondiente valor de **varianza** estadística (σ). Estos valores también se informaron a través de gráficos de barra, indicando la correspondiente **Barra de Error** calculada mediante la función del programa Excel.

RESULTADOS

I.- Síntesis resina acrílica cargada con nanopartículas de cobre.

Utilizando una combinación del monómero metacrilato y etanol se logró obtener una mezcla capaz de reducir los iones de cobre para formación de las nanopartículas. Esto se evidenció visualmente por la aparición de un color anaranjado/rojizo (CuNP) a partir de la solución de acrílico líquido con Cu^{2+} luego de un tiempo de reacción de 5 min a $\sim 40^\circ\text{C}$ (**Figura 4**).

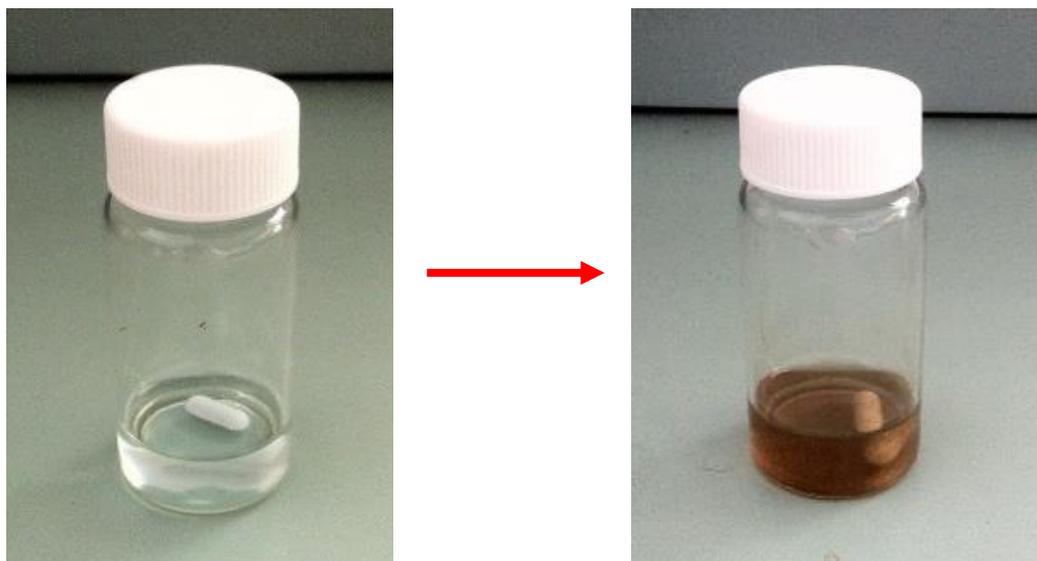


Figura 4. Formación de CuNP a partir de Cu^{2+} /acrílico líquido.

Al mezclar esta solución con el acrílico en polvo se logró la polimerización del monómero, permitiendo la producción de las muestras de acrílico con distintos contenidos de CuNP (**Figura 5**).

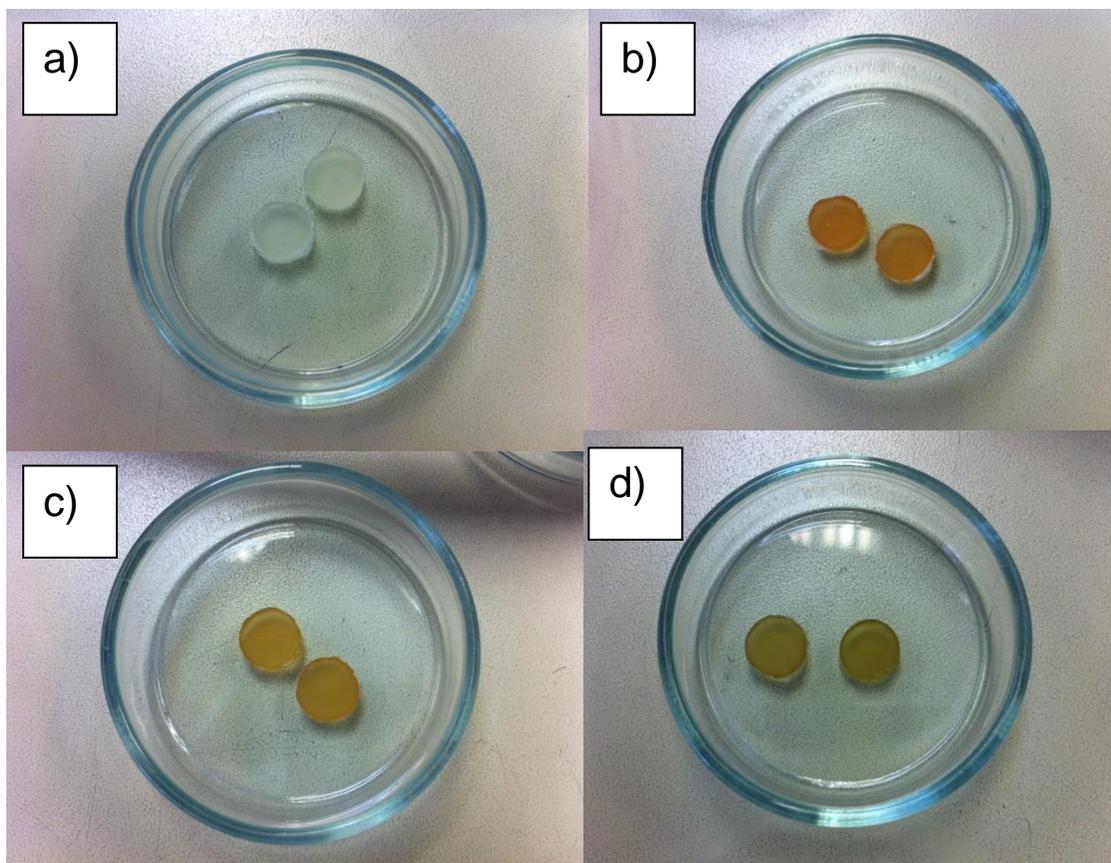


Figura 5. Materiales de CuNP/acrílico preparados en este trabajo: a) PMMA (Control), b) Cu(38)/PMMA, c) Cu(75)/PMMA, d) Cu(150)/PMMA

II.- Caracterización de las nanopartículas

En la **Gráfico 1** se muestra el espectro de absorción visible de CuNPs obtenidas mediante el producto de reducción con MMA. Se puede apreciar un peak alrededor de 585 nm que corresponde al plasmón de resonancia superficial de la CuNP. Esta es una propiedad física que únicamente exhiben los materiales metálicos cuando presentan dimensiones de tamaño nanométrico. Este análisis confirma la formación de nanopartículas de cobre mediante el procedimiento de reducción mediante el sistema de MMA líquido y etanol.

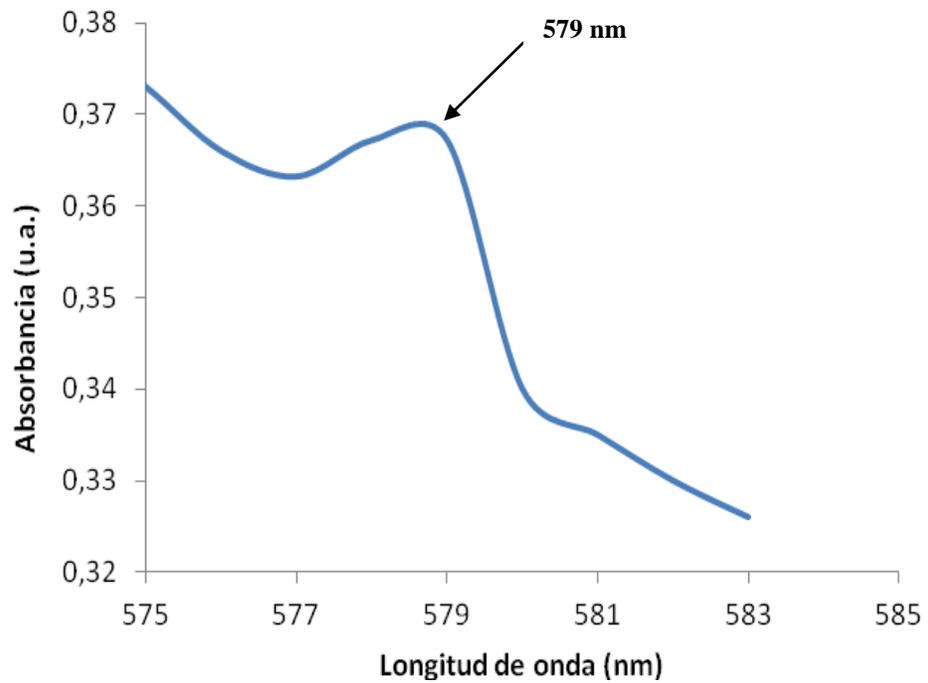


Gráfico 1. Espectro de absorción visible mostrando el plasmón de absorción de CuNPs en la solución.

En la **Figura 6** se muestra una imagen SEM de la superficie del compuesto CuNP/PMMA. Se puede apreciar que la superficie del acrílico presenta un importante grado de rugosidad.

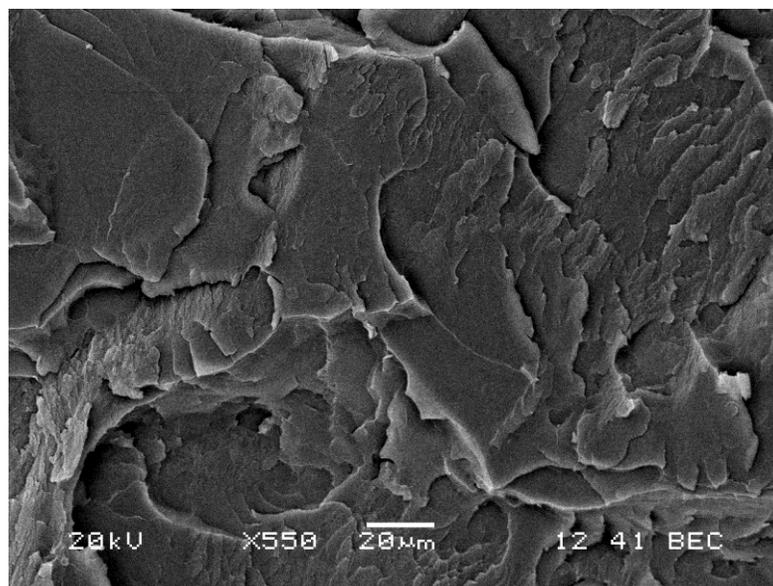


Figura 6. Imagen SEM de la superficie del compuesto CuNP/PMMA.

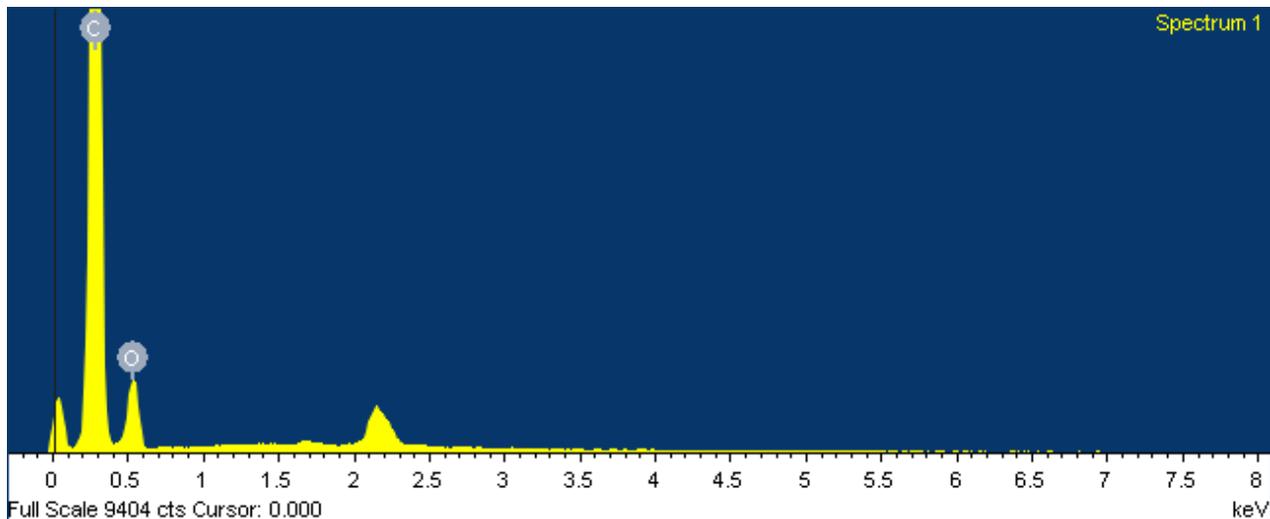


Figura 7. Espectro EDS del compuesto CuNP/PMMA.

Al analizar esta superficie mediante microanálisis EDS, no se detectó la presencia de Cu en la estructura, como se aprecia en el espectro EDS (**Figura 7**) y en los resultados del microanálisis (**Tabla 1**). Solo se detectó la presencia de Carbono y Oxígeno correspondiente a la estructura de la resina acrílica.

Tabla 1. Microanálisis EDS del compuesto CuNP/PMMA.

Elemento	Átomos (%)	Peso (%)
C	78.49	73.25
O	21.51	26.75
Total	100	100

III.-Evaluación de las propiedades fungicidas de los compósitos formados con nanopartículas de cobre.

III.1 Evaluación del efecto antimicrobiano en el líquido sobrenadante.

En la **Gráfico 2** se muestran los resultados del recuento de colonias de *C. albicans* en los sobrenadantes en contacto con las diferentes muestras de acrílico. Se puede observar que no existen diferencias significativas al comparar la muestra control con cada una de los materiales compósitos CuNP/PMMA, ni al comparar los distintos compósitos entre sí.

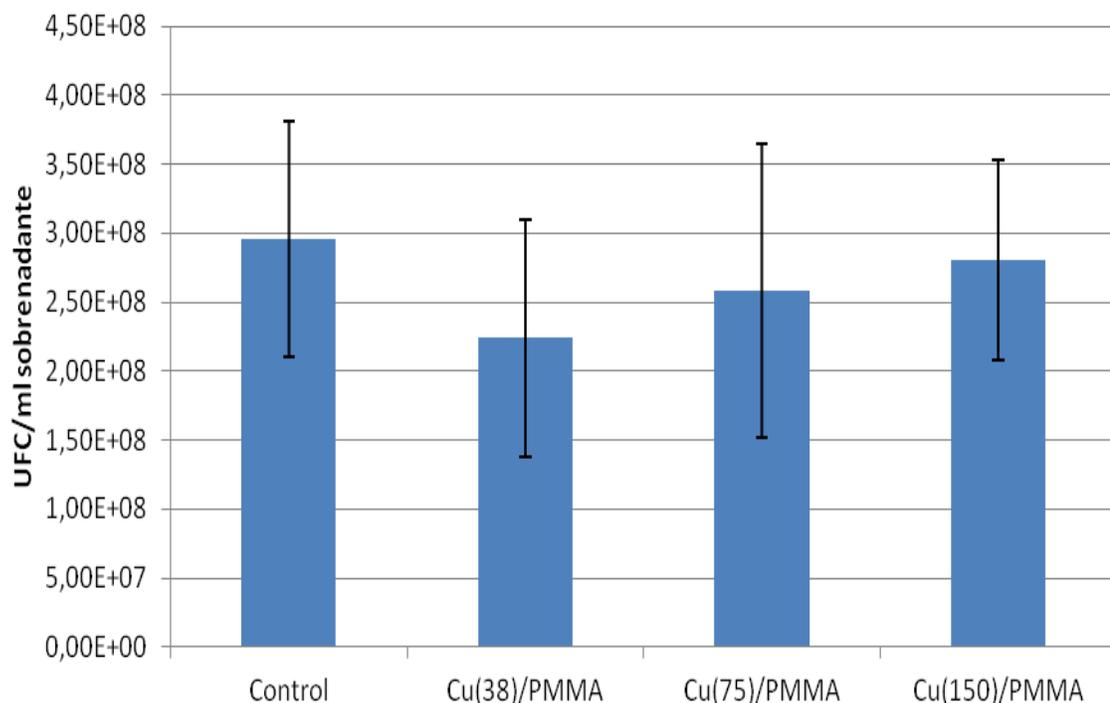


Gráfico 2. Comparación del número de unidades formadoras de colonia de *Candida albicans* presentes en los medios de cultivo en los que se sumergieron los distintos materiales.

III.2 Evaluación del efecto antimicrobiano en la superficie del material CuNP/PMMA.

Después de las 48 horas de incubación se realizó el recuento de las colonias obtenidas desde el eluido de la superficie de las muestras de acrílico (**Figura 8**).

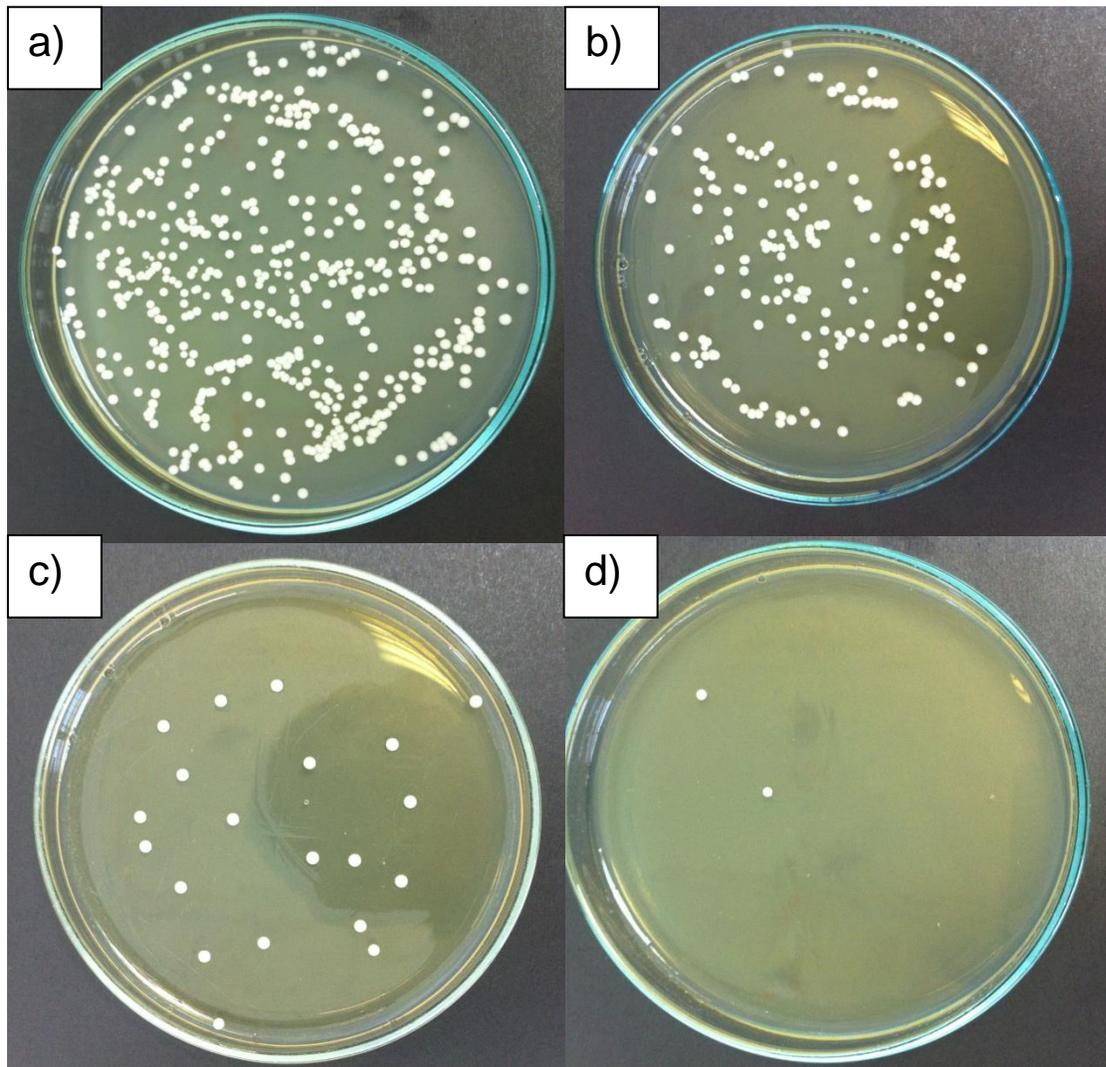


Figura 8. Comparación del número de unidades formadoras de colonias obtenidas desde la superficie de las distintas muestras de acrílico: a) PMMA (control), b) Cu(38)/PMMA, c) Cu(75)/PMMA, d) Cu(150)/PMMA.

Se puede apreciar una reducción significativa en el número de colonias de *C. albicans* formadas sobre la superficie del compuesto CuNP/PMMA con respecto a la superficie control sin CuNP. Este efecto antifúngico incrementa de acuerdo al contenido de CuNP en el acrílico. Este efecto fue también observado cuantitativamente mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (**Gráfico 3**). Los valores de UFC presentan diferencias estadísticamente significativas confirmando la reducción de la formación de colonias en la superficie de los materiales CuNP/PMMA.

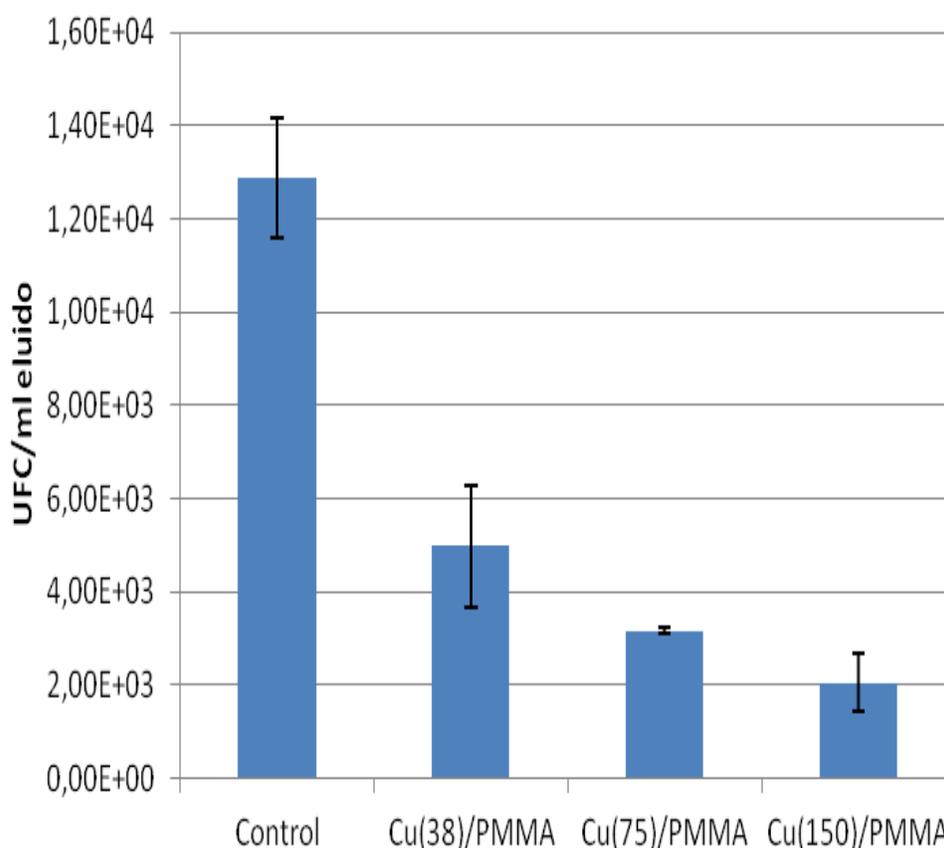


Gráfico 3. Comparación del número de unidades formadoras de colonias de *Candida albicans* ATCC-90029 obtenidas sobre las diferentes superficies de acrílico.

III.3 Evaluación de las propiedades antimicrobianas en el tiempo.

Se realizaron recuentos del eluido de las superficies de las muestras de acrílico a 2, 4, 7 y 9 días con el propósito de evaluar si el efecto antifúngico se mantiene en el tiempo. Estos resultados se presentan en la **Gráfico 4**.

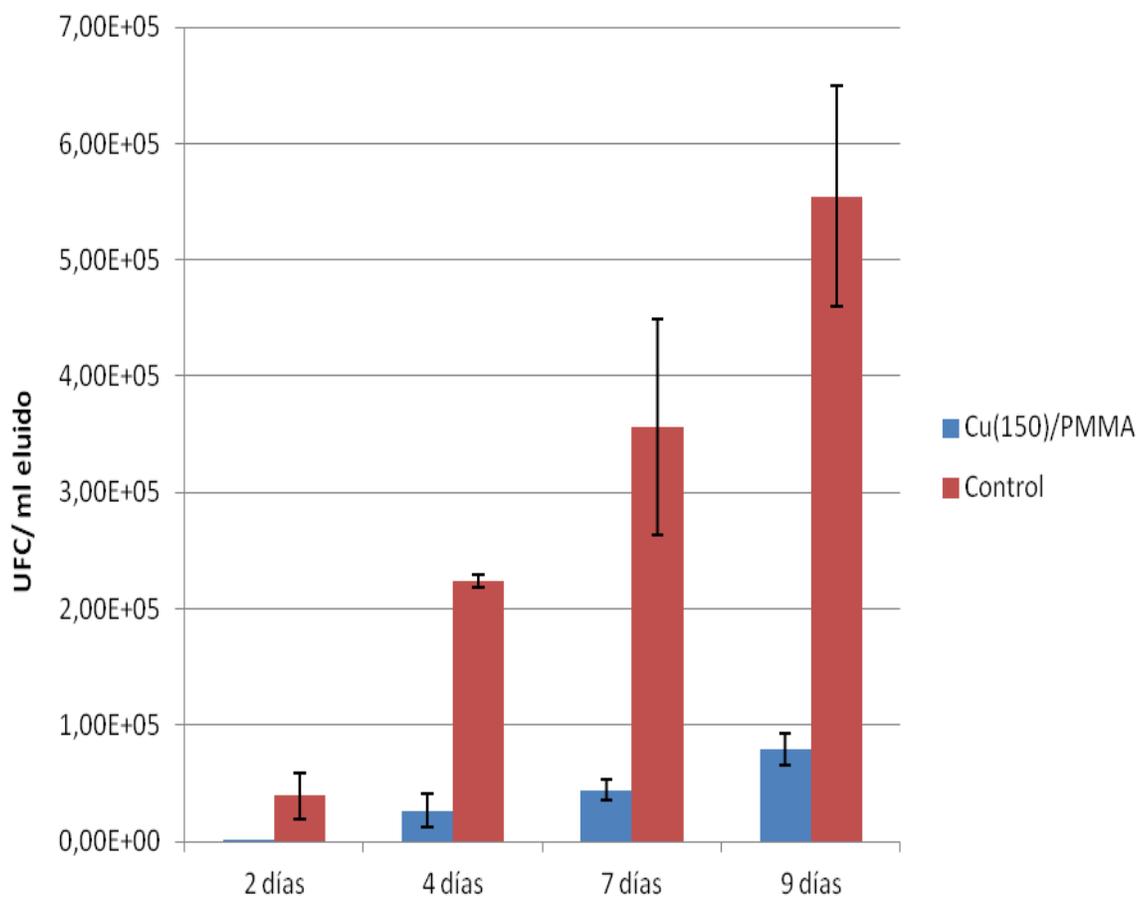


Gráfico 4. Comparación del número de unidades formadoras de colonias obtenidas en la superficie de las muestras de acrílico en función del tiempo.

Se puede apreciar una diferencia significativa en el número de UFC/ml de *Candida albicans* que se obtienen de la superficie de las muestras de acrílico con CuNPs con respecto al control en el transcurso de los días. En todos los casos se

observa que la cantidad de colonias obtenidas en las muestras de CuNP/PMMA es considerablemente menor que en la muestra de acrílico que no contiene CuNPs. El recuento de UFC de levaduras por ml de caldo fue aumentando levemente en el tiempo en las muestras con CuNPs, pero se aprecia que este aumento es sustancialmente mayor en la muestra control (> 80%).

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la posibilidad de incorporar nanopartículas de cobre en el acrílico utilizado para fabricar prótesis removibles, para determinar la capacidad de estas CuNPs de inhibir el crecimiento de *C. albicans*, una levadura comensal de la microbiota oral, analizando el fenómeno en la superficie de los compósitos como en el medio de cultivo en el cual se sumergieron las muestras.

A través de la caracterización se pudo detectar la presencia de las CuNPs en la solución de acrílico líquido. Esto permitió demostrar que las CuNPs efectivamente se formaron en el metil metacrilato, por lo que se puede asumir que el efecto antifúngico logrado es por la acción de estas nanopartículas. Sin embargo, el cobre incorporado en forma de nanopartícula no fue detectado mediante microanálisis EDS. Esto puede ser atribuido a que el contenido de CuNPs en el compósito se encuentra bajo los límites de detección del EDS. Sin embargo, estos bajos contenidos de CuNP serían suficientes para lograr un efecto antimicrobiano, y al mismo tiempo reducir posibles riesgos de toxicidad.

Es importante determinar que las CuNPs efectivamente se formen ya que según Guogang et al. [39], el efecto de las CuNP es mayor que cuando se contiene cobre en la forma de CuO. Es decir a una misma concentración las CuNPs serían más efectivas como antimicrobiano. En este trabajo a través de la espectroscopía VIS-UV se logró confirmar su presencia.

En este estudio se utilizó un método novedoso y relativamente fácil de fabricación de nanopartículas de cobre. Existe un estudio previo en el que se utilizó MMA como reductor, pero para la síntesis de nanopartículas de plata y utilizando alcohol isopropílico [20]. Además en aquel método las AgNP eran primero sintetizadas y luego separadas mediante centrifugación, para luego ser mezcladas con el sistema acrílico polvo/líquido. Sin embargo, no se había ensayado hasta ahora un procedimiento para el caso de las CuNP. Además, en el presente trabajo las CuNP fueron incorporadas directamente al acrílico sin ser separadas del líquido. Químicamente los iones de Ag^+ pueden ser más fácilmente reducidos para formar nanopartículas que los iones de Cu^{2+} , por lo que no siempre las condiciones de

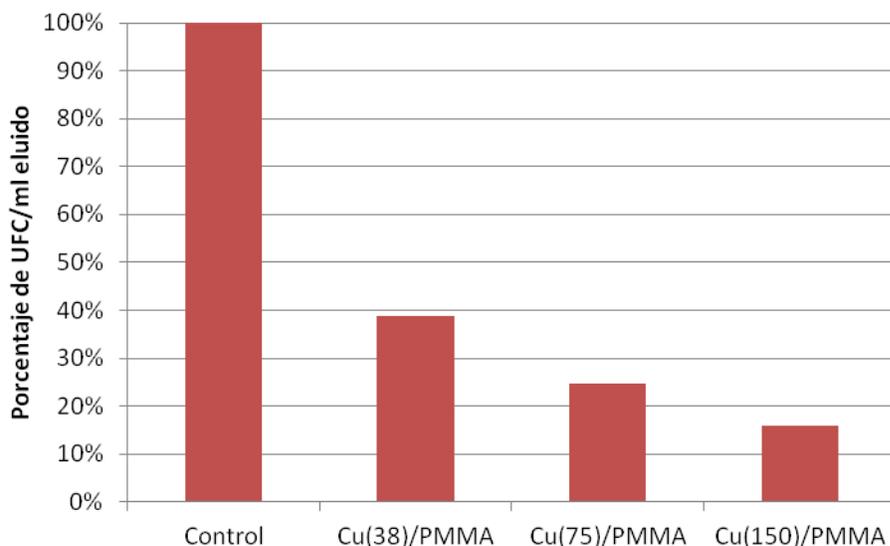
formación de AgNP son aplicables a las de CuNP. En nuestro caso a través de la reducción del acetato de cobre utilizando el metacrilato de metilo líquido permite que las partículas se formen en la misma solución que será utilizada para la polimerización. En la literatura se han descrito otros métodos para incorporar nanopartículas de cobre para formar compósitos, como agregar durante la mezcla del material en polvo de CuNPs formadas previamente mediante electrolisis [44]. En este caso la formación de las CuNPs se produce *in situ*, lo que permite eliminar un paso en la confección de la resina compósita. Esto puede ser relevante desde el punto de vista del tiempo de fabricación y costos si resulta aplicable la fabricación de prótesis removible con acrílico cargado con este tipo de nanopartículas.

Al analizar los resultados obtenidos en relación a la inhibición del crecimiento de levaduras en el caldo en el que fueron sumergidas las muestras CuNPs/PMMA, se encontró que no se genera ninguna diferencia significativa en el crecimiento de microorganismos en el medio de cultivo. Este resultado se puede deber a dos motivos. En primer lugar las CuNPs podría ser no liberadas desde la estructura del acrílico, lo que desde el punto de vista de la estabilidad del material es positivo, ya que se esperaría que el efecto antimicrobiano logrado por la presencia de las CuNPs se mantuviera en el tiempo. Otra explicación a este resultado es que en el caso que se produzca alguna liberación de las CuNPs, esta cantidad no lograría una concentración en el medio líquido sobrenadante lo suficientemente alta como para generar un efecto de inhibición del crecimiento de las levaduras. Esto último fue comprobado al no observarse inhibición en caldo sobrenadante en contacto con el material.

En relación a los resultados obtenidos con respecto al efecto antifúngico en la superficie de las muestras de acrílico, se comprobó que la presencia CuNPs inhibía el crecimiento de microorganismos en la superficie. Un resultado similar fue encontrado por Mohan et al. [28], quien también logró un efecto antimicrobiano positivo al fabricar un compósito con CuNPs, en este caso se utilizaron nanotubos de carbono y su efecto se probó con *E.coli*. Este efecto de inhibición en la superficie puede ser explicado por dos mecanismos distintos. En primer lugar por una menor adhesión de levaduras a la superficie, es decir las CuNPs evitarían la colonización de la superficie, lo cual está de acuerdo con las conocidas propiedades antiadherente (antifouling) del cobre [49]. Por otro lado, se puede atribuir un efecto

fungicida de las CuNP sobre las levaduras que logran adherirse sobre la superficie del acrílico. En este caso, deberían existir CuNP expuestas o accesibles en la superficie del compuesto CuNP/PMMA. Las propiedades antifúngicas presentadas por los materiales acrílicos dopados con CuNP, presenta un efecto ideal para su utilización en la fabricación de prótesis removibles. La superficie antifúngica lograría una menor colonización de *C. albicans* en la prótesis, lo cual reduciría la colonización posterior de la mucosa oral, debido a que la formación del biofilm en la superficie de la prótesis ocurre previo a la infección de la mucosa y es el puente para su colonización [22, 23, 24].

Otro punto importante a considerar en los resultados obtenidos con los materiales de acrílico CuNPs/PMMA, es el efecto del contenido de CuNP sobre la actividad antifúngica. Las muestras cargadas con una mayor cantidad de nanopartículas, es decir las Cu(150)/PMMA son capaces de disminuir en más de un 80% el crecimiento de levaduras medido en UFC en comparación con el control **(Gráfico 5)**. El efecto llega a un 75% en la disminución del desarrollo microbiano en las muestras muestras Cu(75)/PMMA, y disminuye a un 60% si se utiliza la menor concentración Cu(38)/PMMA. Este resultado se explicaría debido a que con un mayor contenido de CuNP, existiría una mayor cantidad de CuNP expuesta en la superficie del acrílico que estaría en contacto con los microorganismos ó se



produciría una mayor liberación de CuNP hacia el medio.

Gráfico 5. Comparación del porcentaje de reducción en la colonización/viabilidad de *C. albicans* en la superficie del acrílico en función del contenido de CuNPs.

Como ya fue comentado, este efecto antifúngico del acrílico CuNP/PMMA puede ser debido a la inhibición de la adherencia así como a la eliminación de los microorganismos por efecto biocida en la superficie del material, ó una combinación de ambos mecanismos. Si se determina que existe una liberación de CuNPs de la estructura, este efecto de superficie puede estar dado porque localmente, es decir en el medio líquido con el que se encuentra en contacto la muestra, se logra una concentración suficiente para evitar el desarrollo de los microorganismos. La otra razón que podría explicar este efecto antimicrobiano, se debería a que las levaduras entran en contacto con las CuNPs que se encuentran en la superficie del acrílico así como con aquellas partículas que van quedando expuestas al medio, producto del desgaste de la superficie por la erosión que genere el medio líquido.

Queda en evidencia que al ser mayor la concentración de CuNPs, menor es la adhesión o mayor es la mortalidad de los microorganismos en la superficie. Considerando solo estos resultados se podría pensar que se debería utilizar la mayor concentración de CuNPs para lograr el mayor efecto antimicrobiano. Sin embargo, se debería también considerar los aspectos de toxicidad de las CuNPs, ya que no se conoce todavía la cantidad de partículas liberadas desde el acrílico al medio. Por esta razón sería conveniente en estudios futuros determinar, tanto *in vitro* como *in vivo*, los contenidos de CuPNs adecuados para lograr el mayor efecto antimicrobiano por un lado y por otra parte minimizar los posibles efectos adversos. Una vez realizados estas pruebas se podría determinar si es posible

producir aparatos protésicos para ser probados en pacientes y realizar estudios clínicos en la cavidad oral. Las nanopartículas por las razones ya descritas poseen propiedades físico-químicas distintas a las que posee el mismo material en su estado macro [39], esto puede aumentar la unión e interacción de estas con los tejidos biológicos del organismo, generando respuestas adversas en células vivas que no se producen con el material en su estado normal [37]. En el caso de las CuNPs en estudios *in vivo* en ratas se ha demostrado que altas concentraciones estas partículas pueden generar daños en órganos específicos como los riñones, el hígado y el bazo [49]. En un estudio *in vitro* [50] en el que se evaluaron 24 distintas nanopartículas se llegó a la conclusión de que las más tóxicas para fibroblastos y macrófagos son el cobre y el zinc, estos solo necesitan una concentración de alrededor de 15 $\mu\text{g/ml}$ para producir alteraciones en las células [50]. Por esta razón es importante minimizar las concentraciones utilizadas en los materiales que entran en contacto con los tejidos de los pacientes y, evitar en lo posible que estas sean liberadas al medio oral. Sin embargo, los resultados del presente trabajo demuestran que los materiales de acrílico CuNP/PMMA no producen efecto fungicida detectable en el medio líquido que está en contacto con el material, además presentan contenidos muy bajos no detectados por EDS. Este antecedente sugeriría que las CuNP no son liberadas al medio ó si se liberan lo harían en muy bajas concentraciones, lo cual reduciría los riesgos de toxicidad. Adicionalmente, los contenidos de nanopartículas presentes en el material (38 $\mu\text{g/g}$ -150 $\mu\text{g/g}$), sugieren que es poco probable que las partículas liberadas alcance niveles tóxicos en el medio líquido en contacto con la prótesis. Con el propósito de llegar a utilizar clínicamente nuevos biomateriales, usualmente se requiere realizar algunos estudios previos. Estos futuros estudios generalmente incluyen ensayos *in vitro* con células humanas y/o estudios *in vivo* en animales, para posteriormente realizar estudios clínicos dirigidos a evaluar la incidencia de candidiasis en pacientes portadores de prótesis removible.

Al analizar el efecto que se produce al mantener las muestras durante varios días en contacto con los microorganismos, se puede apreciar que la actividad antimicrobiana se mantiene con el paso de los días, lo que es un efecto deseable si se pretende utilizar este nuevo material para fabricar prótesis en pacientes desdentados. Esta prueba permite apreciar que a pesar de que la colonización de la

superficie tiende a aumentar, tanto en a las muestras control como en las cargadas con CuNPs; este aumento es considerablemente mayor y sostenido en las placas control. Si se analiza con mayor detalle se puede apreciar que la diferencia de UFC de levaduras por ml en la superficie del control PMMA en relación con los compósitos CuNP/PMMA siempre es mayor al 80%. Aún cuando se trate de una evaluación preliminar, el efecto antifúngico sostenido mostrado por el material es el ideal al que se esperaría para su posible uso con fines protésicos. Este efecto sostenido indicaría que la estructura que se formó entre la resina y las nanopartículas es estable en el tiempo, y que las partículas incorporadas se mantienen accesibles y manteniendo su actividad antifúngica por periodo prolongado de tiempo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se puede suponer que el uso de CuNPs en la confección de prótesis removible podría disminuir la incidencia de candidiasis oral, en particular de candidiasis crónica atrófica que es la que se asocia al uso de prótesis removible [8]. De esta manera se podría evitar el tratamiento de una infección que algunos casos, como lo son los pacientes con factores de riesgo no modificables, resulta complejo. El tratamiento de este tipo de lesiones implica un gasto económico asociado al mayor número de atenciones dentales requeridas por el paciente, el uso de antisépticos para controlar la infección y en algunos casos el uso de antifúngicos. Por su parte estos fármacos pueden producir una serie de reacciones adversas tanto por su uso a nivel local como por su acción a nivel sistémico [15]. Es por estas razones, que alternativas basadas en materiales acrílicos antifúngicos diseñados con alternativas que ofrece la nanotecnología, podrían evitar la necesidad de tratamiento previniendo el desarrollo de esta patología oral de origen micótico.

CONCLUSIONES

- El método estudiado en este trabajo utilizando el metil metacrilato y etanol como agentes reductores permite la formación *in situ* de las nanopartículas de cobre y la obtención de un nuevo biomaterial acrílico dopado con CuNP.
- El material acrílico cargado con CuNPs posee una marcada actividad antimicrobiana frente a la especie *Candida albicans*, este efecto obedecería a una acción biocida de las CuNP ó a una propiedad antiadherente de la superficie del compuesto CuNP/PMMA.
- El mecanismo antifúngico del compuesto CuNP/PMMA se explicaría por efecto de contacto de las levaduras con su superficie ó por la liberación de CuNP desde el compuesto al medio.
- El efecto antimicrobiano resulta proporcional a la concentración de CuNPs que posea el compuesto, esto se explica por una mayor probabilidad de que las CuNPs entren en contacto con las levaduras.
- El efecto antimicrobiano del acrílico CuNP/PMMA es sostenido en el tiempo, lo cual indica que las CuNPs se mantienen al interior de la estructura y que su

liberación al medio es gradual.

- Las propiedades antifúngicas presentadas por este nuevo material CuNP/PMMA sugieren que podría ser una alternativa para la prevención de la estomatitis subprotésica en pacientes portadores de este dispositivo de rehabilitación oral de amplio uso.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ MINSAL (2011). Situación Actual de la Salud del Hombre en Chile.
- ² MINSAL (2003). Encuesta Nacional de Salud (ENS). Chile.
- ³ Eleni D, Roumanas D (2009) Feb;.The social solution-denture esthetics, phonetics, and function. *Journal of Prosthodontics*.(18)112–115.
- ⁴ Mallat DE, Mallat CE (2004). Prótesis Parcial Removible y Sobredentaduras. Capítulo 1. Editorial Elsevier. España.
- ⁵ Raber-Durlacher JE, Elad S, Barasch A (2010). Oral mucositis. *Oral Oncol* 46(6):452-6.
- ⁶ Gendreau L, Loewy ZG (2011). Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. *Journal of Prosthodontics* 20:251–260.
- ⁷ Preshaw PM, Walls AW, Jakubovics NS, Moynihan PJ, Jepson NJ, Loewy Z (2011). Association of removable partial denture use with oral and systemic health. *J Dent* 39(11):711-9.
- ⁸ Akpan A, Morgan R (2002). Oral candidiasis. *Postgrad Med J* 78:455–459

-
- ⁹ Farah CS, Lynch N, McCullough MJ (2010). Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust Dent J* 55 Suppl 1:48-54
- ¹⁰ Ship JA (2003). Diabetes and oral health: an overview. *J Am Dent Assoc* 134 Spec No:4S-10S.
- ¹¹ Frezzini C, Leao JC, Porter S (2005). Current trends of HIV disease of the mouth. *J Oral Pathol Med* 34(9):513-31
- ¹² Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L (2009). Oral mucosal fungal infections. *Periodontol 2000* 49:39-59.
- ¹³ Scully C, el-Kabir M, Samaranayake (1994). Candida and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 5(2):125-57.
- ¹⁴ Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA (2002). Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Postgrad Med J*;78:455–459.
- ¹⁵ Sharon V, Fazel N (2010). Oral candidiasis and angular cheilitis. *Dermatol Ther* 23(3):230-42.
- ¹⁶ Vazquez JA., Sobel JD (2011). Candidiasis. *Essentials of Clinical Mycology* 3:167-206.
- ¹⁷ Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW (2011) Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of Candida species in the oral cavity. *Aust Dent J* 39(11):711-9.
- ¹⁸ Yildirim MS, Hansareisog U, Hasirci N, Sultan N (2005). Adherence of Candida albicans to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. *J Oral Rehabil* 32; 518–525
- ¹⁹ Blankenship JR, Mitchell (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* 9:588–594.

-
- ²⁰ Kassae MZ, Akhavan A, Sheikh N, Sodagar A (2008). Antibacterial Effects of a New Dental Acrylic Resin Containing Silver Nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science* 110:1699–1703.
- ²¹ Fraunhofer JA, Loewy ZG (2009). Factors involved in microbial colonization of oral prostheses. *Gen Dent* 57(2):136-43.
- ²² Cannon RD, Chaffin WL (1999). Oral Colonization by *Candida Albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 10(3)359-383.
- ²³ Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW (2004). Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98(1):53-9.
- ²⁴ Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM (2008). Development Of *Candida*-Associated Denture Stomatitis: New Insights. *J Appl Oral Sci* 16(2):86-94.
- ²⁵ Sipahi C, Anil N, Bayramli E (2001). The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. *J Dent* 29(3):197-204.
- ²⁶ Soysa NS, Ellepola AN (2005). The impact of cigarette/tobacco smoking on oral candidosis: an overview. *Oral Dis* 11(5):268-73.
- ²⁷ Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD (2009) Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48(5):503-35.
- ²⁸ Mohan R, Shanmugaraj M, Hun RS (2011). An efficient growth of silver and copper nanoparticles on multiwalled carbon nanotube with enhanced antimicrobial activity. *Journal Of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* Vol 96B, Issue 1

-
- ²⁹ Price CL, Williams DW, Waters MG, Coulthwaite L, Verran J, Taylor RL, y cols (2005). Reduced adherence of *Candida* to silane-treated silicone rubber. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 74(1):481-7.
- ³⁰ Pusateri CR, Monaco EA, Edgerton M (2009). Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine. *Arch Oral Biol* 54:588–94.
- ³¹ Redding S, Bhatt B, Rawls HR, Siegel G, Scott K, Lopez-Ribot J (2009). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107(5):669-72.
- ³² Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, de Camargo ER, Barbosa DB (2009). The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int J Antimicrob Agents* 34(2):103-10.
- ³³ Jeon HJ, Yi SC, Oh SG (2003). Preparation and antibacterial effects of Ag–SiO₂ thin films by sol–gel method Department of Chemical Engineering. *Biomaterials* 24(27):4921-8.
- ³⁴ Yoon KY, Byeon JH, Park JH, Hwang J (2007). Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment* 373:572–575
- ³⁵ Borkow G, Gabbay J (2009). Copper, An Ancient Remedy Returning to Fight Microbial, Fungal and Viral Infections. *Current Chemical Biology* 3:272-278
- ³⁶ Ravishankar RV, Jamuna BA. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials.
- ³⁷ Arora S, Rajwade JM, Paknikar KM (2012). Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol* 258(2):151-65.

-
- ³⁸ Arul Dhas N, Paul Raj C, Gedanken A (1998). Synthesis, Characterization, and Properties of Metallic Copper Nanoparticles. *Chem. Mater.*10(5):1446–1452.
- ³⁹ Ren G, Hu D, Cheng EW, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP (2009). Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J Antimicrob Agents* 33(6):587-90.
- ⁴⁰ Theivasanthi T, Alagar M (2011). Studies of Copper Nanoparticles Effects on Micro-organisms. *Annals of Biological Research* 2(3):368-373.
- ⁴¹ Rai M , Yadav A, Gade A (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 27 76–83.
- ⁴² Ales Panacek, Milan Kolar, Renata Vecerova, Robert Pucek, Jana Soukupova, Vladimir Krystof y cols (2009). Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 30:6333–6340
- ⁴³ Kim KJ, Sung WS, Suh BK, Moon SK, Choi JS, Kim JG y cols. (2009). Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals* 22(2):235-42.
- ⁴⁴ Cioffi N, Torsi L, Ditaranto N, Tantillo G, Ghibelli L, Sabbatini L y cols. (2005). Copper Nanoparticle/Polymer Composites with Antifungal and Bacteriostatic Properties. *Chem. Mater* 17(21):5255–5262
- ⁴⁵ Ramyadevi J, Jeyasubramanian K, Marikani A, Rajakumar G, Rahuman AA. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Mater Lett* 71:114–6.
- ⁴⁶ Borkow G, Gabbay J (2004). Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. *FASEB J* 18(14):1728-30.
- ⁴⁷ Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (1999). Manual of Clinical Microbiology. 7ma Edicion. ed. Washington DC: ASM Press.

-
- ⁴⁸ Palza H, Gutiérrez S, Delgado K, Salazar O, Fuenzalida V, Avila JI, y cols. (2010) Toward Tailor-Made Biocide Materials Based on Poly(propylene)/Copper Nanoparticles. *Macromol Rapid Commun* 31(6):563-7.
- ⁴⁹ Dafforn KA, Lewis JA, Johnston EL (2011). Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation. *Mar Pollut Bull* 62(3):453-65.
- ⁵⁰ Lanone S, Rogerieux F, Geys J, Dupont A, Maillot-Marechal E, Boczkowski J y cols (2009). Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol*.