



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE NANOBIMATERIALES**

**“SÍNTESIS DE SUSPENSIONES DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE Y
QUITOSANO, Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS
FRENTE A *STREPTOCOCCUS MUTANS*”**

Diego Andrés Trepiana Fica

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

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Cristian Covarrubias
Gallardo**

FONDEF CA 13/10005

**Santiago – Chile
2015**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE NANOBIMATERIALES**

**“SÍNTESIS DE SUSPENSIONES DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE Y
QUITOSANO, Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS
FRENTE A *STREPTOCOCCUS MUTANS*”**

Diego Andrés Trepiana Fica

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

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Cristian Covarrubias
Gallardo**

FONDEF CA 13/10005

**Santiago - Chile
2015**

*A MI FAMILIA
Gracias por confiar en mí.*

AGRADECIMIENTOS

A mi padre y hermano por su incondicional apoyo, cariño y consejos. Y de manera muy especial a mi madre, que aunque ya no se encuentre físicamente conmigo, yo sé que en todo momento al desarrollar este trabajo estuvo presente, en mis desvelos, en mis momentos más difíciles, y que su estímulo fue mi impulso para llegar al final.

A mis tías Adriana, Patricia y Pilar que a lo largo de la carrera siempre creyeron en mí y me apoyaron de todas las formas posibles.

A mi docente y profesor guía, al Prof. Dr. Cristian Covarrubias, tanto por darme la oportunidad de trabajar con él en este proyecto, como también por su absoluta disponibilidad, por sus oportunas aclaraciones y preocupación a lo largo de todo este tiempo.

A todas las personas que trabajan en el laboratorio de nanobiomateriales, en especial a Carlita que siempre me ayudo en todo.

A mis amigos y compañeros de universidad, personas que hicieron esta etapa por lejos la mejor de mi vida, porque sin ustedes todo hubiese sido más difícil, porque más que amigos ustedes son como hermanos; Camilo, Carlitos, Camila, Javiera, Consuelo, Ange, Fabián, José; discúlpenme si me faltan nombres, la lista podría ser infinita. Simplemente son los mejores y es sólo el principio de una amistad para toda la vida.

Finalmente, a la persona más importante que conocí en la Universidad, a mi amiga, compañera y gran amor, Valentina. Porque agradezco una y otra vez haber llegado acá y conocerte, por tu apoyo y amor incondicionales, por tu inmensa paciencia, pero por sobre todo por permitirme ser parte de tu vida. Te amo infinitamente.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: En el biofilm dental se encuentran diversas bacterias, de las cuales *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) es considerada como una de las de mayor potencial cariogénico. Existen diversos métodos para el control del biofilm, entre los que se encuentran los métodos químicos. Estos métodos se basan en el uso de sustancias antisépticas y/o antibióticas que son utilizados como colutorios orales y que permiten disminuir o retardar la formación de la placa bacteriana. En la actualidad no existe un agente químico antimicrobiano ideal. Es por esto que constantemente se están realizando cambios a los agentes terapéuticos actualmente conocidos, ya sea mejorando sus propiedades antimicrobianas, sus propiedades de adhesión (sustantividad) o disminuyendo sus efectos adversos. Es aquí donde la Nanotecnología y el desarrollo de nanomateriales han adquirido especial importancia debido a la posibilidad de sintetizar materiales con propiedades antimicrobianas. Es sabido que nanopartículas de quitosano (QuitNP) y nanopartículas de cobre (CuNP) presentan propiedades antimicrobianas frente a diversas bacterias, tanto Gram negativas como Gram positivas. Sin embargo no se ha probado la efectividad de las CuNP sobre *S. mutans*. Por otra parte estudios demuestran que nanopartículas metálicas, como el cobre, soportadas en una matriz de quitosano, presentarían mejoras en sus propiedades de adhesión. El objetivo de este trabajo de tesis es la síntesis de nanopartículas de cobre y quitosano, y evaluar sus propiedades antimicrobianas frente a *S. mutans*.

MATERIAL Y METODOS: Se sintetizaron CuNP c/a utilizando almidón como agente reductor y estabilizante, CuNP s/a sin utilizar almidón, QuitNP y una nanopartícula híbrida (CuNP/QuitNP). Para esto se usaron reactivos biocompatibles, que permitieron la reducción a nanopartículas metálicas, y la gelificación iónica de nanopartículas poliméricas. Las muestras fueron caracterizadas mediante espectrofotometría de absorción molecular, microscopia electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (DRX), espectroscopia infrarroja de reflectancia total atenuada (FTIR-ART) y análisis termogravimétricos

(TGA). Se realizaron ensayos de actividad bactericida, para lo cual se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) utilizando el método de incubación de medio de cultivo líquido, y la concentración bactericida mínima (CBM) realizando el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de agar BHI, para las nanopartículas sintetizadas. Además se realizaron pruebas de actividad bactericida sobre un biofilm formado en superficies dentarias. Para esto se utilizaron fragmentos de terceros molares, con un biofilm formado, los que fueron tratados con distintas soluciones antimicrobianas y suspensiones de nanopartículas.

RESULTADOS: Utilizando el concepto de “química verde”, se sintetizaron y caracterizaron las partículas de carácter nanométrico; CuNP c/a, QuitNP y CuNP/QuitNP. Por otro lado, las partículas CuNP s/a presentaron dimensiones micrométricas. En los ensayos de actividad bactericida, las CuNP c/a fueron las que presentaron la menor CIM (20 µg/ml) y CBM (30 µg/ml) en comparación a las otras suspensiones. En los ensayos sobre un biofilm formado sobre una superficie dentaria, aquellas nanopartículas que tenían quitosano como parte de su composición fueron las que presentaron mejores resultados, siendo la nanopartícula híbrida (CuNP/QuitNP), que al probarla frente a *S. mutans*, se obtuvo el menor recuento de UFC.

CONCLUSIÓN: El método estudiado en este trabajo, utilizando reactivos biocompatibles permitió la formación de nanopartículas de cobre y quitosano de manera satisfactoria y con características compatibles para futuros estudios en control de biofilm. La incorporación de CuNP c/a durante el proceso de formación de las QuitNP, permitió la síntesis de una nanopartícula híbrida cobre-quitosano (CuNP/QuitNP). Tanto las nanopartículas de cobre, de quitosano y sus combinaciones presentaron actividad antimicrobiana frente al patógeno *Streptococcus mutans*. Por otra parte, todas las suspensiones de nanopartículas presentaron un efecto antibacteriano al tratar un biofilm de *S. mutans* previamente formado sobre una superficie dental.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEORICO	4
Caries dental	4
Biofilm o placa bacteriana	5
Grupo <i>Streptococi mutans</i>	8
<i>Streptococcus mutans</i>	9
Control de la placa bacteriana	10
Nanotecnología	14
Nanomateriales	15
Síntesis de nanopartículas	15
Nanopartículas metálicas con propiedades antimicrobianas	18
Nanopartículas de cobre (CuNP)	20
Nanopartículas poliméricas	21
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. Síntesis y caracterización de nanopartículas	25
1.1 Síntesis de nanopartículas de cobre y quitosano	25
1.2 - Caracterización de las Nanopartículas	28
1.3.- Preparación de una suspensión basada en una mezcla física de CuNP y QuitNP (CuNP+QuitNP).....	30
2. Evaluación de las propiedades bactericidas de las diferentes nanopartículas.....	30
2.1 Determinación de la CMI.....	31
2.2 Determinación de la CMB.....	32
2.3 Evaluación de las propiedades antibacterianas de una superficie dentaria tratada con las nanopartículas.	33
2.4 Evaluación de la capacidad antibacteriana de las suspensiones de nanopartículas frente a un biofilm formado en la superficie dentaria.	35
3. Análisis estadístico.....	37
RESULTADOS	38
1. Síntesis y caracterización de nanopartículas	38
1.1 Síntesis de nanopartículas de cobre y quitosano	38
1.2 Caracterización de las nanopartículas.	41

1.3 Preparación de una suspensión basada en una mezcla física de CuNP y QuitNP (CuNP + QuitNP).	59
2. Evaluación de las propiedades bactericidas de las diferentes nanopartículas	59
2.1 Determinación de la CMI.....	61
2.2 Determinación de la CBM	63
2.3 Evaluación de las propiedades antibacterianas de una superficie dentaria tratada con las nanopartículas.	73
2.4 Evaluación de la capacidad antibacteriana de las nanopartículas frente a un biofilm formado en la superficie dentaria.....	76
DISCUSIÓN	79
CONCLUSIÓN.....	87
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	89
ANEXOS.....	97

INTRODUCCIÓN

Dentro de las enfermedades crónicas más frecuentes en nuestro país se encuentran las patologías bucales. Las cuales representan un grave problema para la Salud Pública debido a su alta prevalencia, como también al impacto que generan tanto en los individuos como en la sociedad, y el alto costo que representa el tratamiento de dichas enfermedades (ENS, 2009-2010).

La caries dental se caracteriza por ser una patología crónica con componente infeccioso. Esta enfermedad se genera a través de una compleja interacción entre bacterias cariogénicas productoras de ácidos, factores individuales que incluyen las piezas dentarias, saliva, la dieta y el tiempo necesario para que se genere una desmineralización del diente. El desarrollo y progresión de esta patología se produce tanto en la superficie del esmalte como en tejidos dentarios más profundos como la dentina y pulpa dental (Selwitz R y cols., 2007).

En el proceso de caries actúan diversos factores, entre los cuales, desde el punto de vista infeccioso, encontramos las bacterias. Éstas se encuentran inmersas en el biofilm oral, y debido a su virulencia se adhieren a la superficie del diente, generando ácidos como producto metabólico y provocando la pérdida de minerales de la estructura dentaria (Featherstone J, 2008). Entre de estas bacterias podemos encontrar el grupo *Streptococci mutans*, del cual *Streptococcus mutans* ha sido considerado uno de los agentes involucrado en el inicio de la caries (Marsh P, 2006).

Numerosos estudios se han destinado a investigar sobre la prevención de enfermedades bucales, en especial la caries dental. Se ha puesto especial énfasis en las medidas que controlan la formación de placa bacteriana, con el fin de reducir la presencia de agentes patógenos; utilizando diversos compuestos antimicrobianos. Es así como, paralelo al desarrollo tecnológico de la industria farmacéutica, existe un gran interés por parte de los investigadores en estudiar

materiales en la forma de nanopartículas que posean propiedades antibacterianas. Es en este sentido que la Nanotecnología y el desarrollo de nanomateriales han adquirido especial importancia debido a la posibilidad de contar con nuevos agentes antimicrobianos (Pelgrift R, Friedman J, 2013).

La nanotecnología se ha definido como: “la creación de materiales, sistemas y dispositivos funcionales a través del control de la materia en la escala nanométrica y la explotación de nuevos fenómenos y propiedades (físicas, químicas y biológicas) a esa escala” (Delgado G, 2009).

El interés que ha tomado en este último tiempo el desarrollo y caracterización de compuestos nanoestructurados, como las nanopartículas, proviene del hecho que estos elementos adquieren propiedades físico-químicas nuevas al encontrarse en una escala de dimensiones nanométricas. En la actualidad son una herramienta de suma importancia en el ámbito de la industria tecnológica, y están presentando gran interés en diversos ámbitos de aplicación, tales como ingeniería de materiales, energía, medioambiente, alimentos, almacenaje y reproducción de información y aplicaciones biomédicas, entre otras (Pelgrift R, Friedman J, 2013).

Las nanopartículas por definición son entidades con un tamaño entre 1-100 nm y con propiedades específicas que dependerán de su tamaño. Existen diferentes formas de obtener nanopartículas, las cuales se clasifican en dos grandes grupos: el método **top-down**, en las que se va reduciendo el tamaño de las partículas hasta alcanzar la escala nanométrica y las de **bottom-up** que consiste en la construcción de nanomateriales a partir de sus constituyentes (Tolaymat T y cols., 2010). Por otro lado, la obtención de nanopartículas se puede clasificar en métodos de síntesis físicas, químicas o biológicas (Cruzat C, 2010).

Los métodos químicos son los más utilizados debido a su potencial para controlar adecuadamente el tamaño, la distribución de tamaño y la forma de las nanopartículas. Los métodos químicos tradicionales utilizan agentes reductores y estabilizadores durante la síntesis, que en alguna medida son tóxicos y

contaminantes. La tendencia desde hace años se ha focalizado en desarrollar métodos de síntesis bajo el concepto de “Química Verde”, que es aquella que utiliza químicos no tóxicos y amigables con el medio ambiente (Usman M y cols., 2012).

Actualmente, las nanopartículas metálicas y algunas obtenidas a partir de polímeros, están siendo exploradas y ampliamente investigadas como potenciales antimicrobianos. La actividad antimicrobiana de estas nanopartículas se relaciona con el área de superficie en contacto con los microorganismos. (Ravishankar R, Jamuna B, 2011).

Existen numerosas publicaciones científicas que evidencian las propiedades antimicrobianas de nanopartículas metálicas como el **cobre** (Chatterjee A, 2014. Li X y cols., 2014). Se ha probado su poder antimicrobiano frente *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* y *Candida albicans* (Li X y cols., 2014). Además, hay evidencia que demuestra las propiedades bactericidas de nanopartículas fabricadas a partir de polímeros naturales como el **quitosano**. Se ha encontrado que estas partículas de biopolímero presentan actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocitogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans* (Ikinci G y cols., 2002. Rhim J y cols., 2006). En la literatura disponible, existe evidencia de la actividad antimicrobiana nanopartículas de óxido de cobre (CuONP) frente a *Streptococcus mutans*, sin embargo no existen reportes de nanopartículas de cobre puro sobre este microorganismo (Farzaneh A y cols., 2015).

Además, estudios demuestran que nanopartículas metálicas, como el cobre, soportadas en una matriz de quitosano, presentan mejoras en sus propiedades (Cruzat C, 2010). Estos sistemas combinados quitosano-cobre podría tener mejores propiedades de sustentividad en la cavidad oral, por otra parte hasta ahora no existen estudios relacionados a la preparación de nanopartículas híbridas cobre-quitosano.

MARCO TEORICO

Caries dental

La OMS la ha definido como: “un proceso patológico localizado de origen multifactorial que comienza después de la aparición de los primeros dientes en boca, determinando el reblandecimiento del tejido duro del diente y que evoluciona hasta formar una cavidad” (Peterson P y cols., 2005).

Por otro lado, la caries dental se define como una enfermedad crónica, microbiológicamente inducida y multifactorial, en la que un amplio grupo de factores biológicos, socioeconómicos y culturales interactúan, directa o indirectamente en el establecimiento y desarrollo de ésta. Es producida por microbiota cariogénica (acidogénica) presente en la placa bacteriana dental, la cual por sus factores de virulencia, se adhiere a la superficie del diente produciendo ácidos, los que provocan la pérdida de minerales desde su estructura, generando un desequilibrio iónico en el proceso de desmineralización y remineralización. Dicho desequilibrio iónico resulta del metabolismo de los carbohidratos por parte de las bacterias presentes en el biofilm dental. Esto determina una disminución en el pH por debajo del valor crítico (5,0-5,5) que conduce a la desmineralización de los cristales de hidroxiapatita del esmalte dental. La desmineralización puede ser revertida en sus primeras etapas mediante el aporte de calcio, fosfato y fluoruro (Featherstone J, 2008. Selwitz R y cols., 2007).

Por otra parte, la remineralización natural del diente, es el mecanismo de reparación que consiste en la difusión de minerales desde la saliva a la superficie porosa del diente que se encuentra desmineralizada (Marsh P y cols., 2011). El proceso de remineralización ocurre cuando el pH es restaurado por la saliva, que actúa como buffer. Por lo tanto, el pH del medio ambiente bucal es el principal determinante de los cambios que se producen en la microbiota. Se considera un pH normal de la saliva de 6 a 7, lo que significa que es ligeramente

ácida. Para poder revertir la acidificación del medio, la saliva posee la función de amortiguación a través de los siguientes componentes: bicarbonato, fosfato, urea, proteínas y enzimas, siendo el bicarbonato el sistema tampón más importante. Además, se genera amoníaco y aminas que también sirven como un amortiguador neutralizando ácidos (Featherstone J, 2008).

El proceso de desmineralización y remineralización ocurre de manera continua desde la aparición de las primeras piezas dentales. Con el transcurso del tiempo esto conducirá ya sea a una cavitación dentaria o a una reparación y regresión de la lesión, dependiendo del balance existente entre ambos procesos (Selwitz R y cols., 2007).

Biofilm o placa bacteriana

Las bacterias existen en la naturaleza bajo dos formas o estados, bacterias planctónicas o de libre flotación, y bacterias agrupadas en biofilm. Tan solo una pequeña fracción de las bacterias se hallan en forma planctónica. Se postula que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biofilm, y el 1% restante en estado planctónico (Nazar J, 2007).

En el año 2002, Dolan efectuó una descripción ampliamente aceptada de un biofilm, estableciendo que “es una comunidad sésil, caracterizada por células que están adheridas de manera irreversible a un sustrato o unas a otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas mismas han producido y que exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica” (Dolan R, 2002).

En un biofilm se exponen propiedades que no son expresadas en cultivos planctónicos. No constituyen la suma de expresión de cada microorganismo que la

compone, sino más bien establecen una verdadera comunidad que es capaz de establecer vías de comunicación. (Fejerskov O, 2004).

Los biofilms están estructurados principalmente por grandes colonias de bacterias sésiles inmersas en una matriz polimérica extracelular o glicocalix. La matriz es muy hidratada debido a que incorpora grandes cantidades de agua a su estructura, llegando a representar hasta el 97% de esta. Además de agua y bacterias, la matriz está formada por exopolisacáridos (EPS), producido por los propios microorganismos (Strużycka I, 2014). En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y diversos productos de la lisis bacteriana. También pueden hallarse materiales no bacterianos, tales como cristales de sales minerales, partículas de corrosión o componentes sanguíneos, todo esto según sea el medio ambiente en el cual se estén desarrollando (Li J y cols., 2004).

El proceso de formación de biofilm sobre una pieza dentaria como se puede apreciar en la **Figura 1**, comienza a los pocos de minutos de haber realizado una profusa higiene. Inicia con el depósito sobre el esmalte dental de una capa acelular, libre de bacterias, llamada película salival adquirida. Esta fina capa es una membrana de composición química muy compleja y heterogénea. Mediante procedimientos químicos e inmunológicos se ha demostrado la presencia de proteínas, glúcidos y lípidos (Martínez-Pabón M, 2013). Una vez establecida esta película, se da paso a la agregación de colonizadores primarios como *Streptococcus sanguis* y *Actinomyces viscosus*, que se adhieren mediante uniones iónicas, electrolíticas o de tipo ligando-lectina. Estos microorganismos comienzan a elaborar el dextrán, un polisacárido extracelular de alto peso molecular, el cual se produce exclusivamente a partir de sacarosa (Bernimoulin J, 2003). A continuación otras especies bacterianas como *Streptococcus mutans* se adhieren a los colonizadores primarios. El crecimiento bacteriano posterior es en volumen, permitiendo que otros microorganismos como bacterias filamentosas y espirales se adhieran, ya que de otro modo no podrían fijarse a la superficie dentaria (Marsh P, 2006).

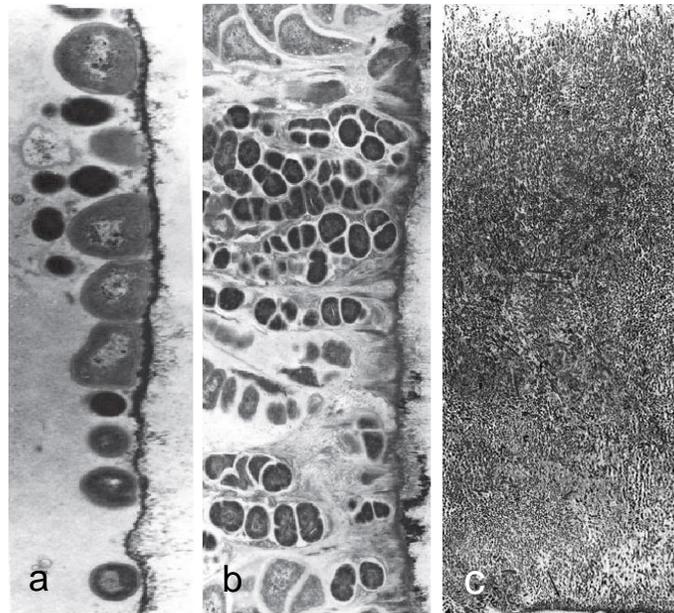


Figura 1. Estados de formación de placa bacteriana supragingival. (a) Paso 1: la evolución de la placa bacteriana comienza con la formación de la película salival adquirida. En esta imagen, se ve como una línea negra. (b) Paso 2: colonizadores primarios se unen a la película y forman colonias. Esta imagen muestra una placa bacteriana de 2 días de evolución sobre el esmalte de un diente humano. Ellas han crecido en ángulo recto a la superficie dentaria. (c) Paso 3: en las etapas finales de la maduración de la placa bacteriana, aparecen formas espirales y espiroquetas, y la placa bacteriana madura está compuesta principalmente por organismos filamentosos (Bernimoulin J, 2003).

Grupo *Streptococci mutans*

Es un grupo de bacterias genéticamente heterogéneo, que en base a su composición y enlaces de los polisacáridos presentes en la pared celular se pueden clasificar en 8 serotipos: *Streptococcus mutans* (serotipos c,e,f,k), *Streptococcus rattus* (serotipo c), *Streptococcus cricetus* (serotipo a), *Streptococcus sobrinus* (serotipo d,g), *Streptococcus ferus* (serotipo c), *Streptococcus macacae* (serotipo c) y *Streptococcus downei* (serotipo h) (Marsh P, 2006). Estas especies son diferenciables mediante pruebas serológicas y bioquímicas, cuyas características se detallan en la **Tabla 1** (Coykendall A, 1989).

Tabla 1. Características de los miembros del grupo *Streptococci mutans*.

Especie	Serotipo	Hidrólisis de Arginina	Fermentación		Producción de H ₂ O	Crecimiento aeróbico	Susceptibilidad a la bacitracina	Hidrólisis de Esculina
			Rafinosa	Melobiosa				
<i>S.mutans</i>	c,e,f	-	+	+	-	+	-	+
<i>S. rattus</i>	b	+	+	+	-	+	-	-
<i>S. cricetus</i>	a	-	+	+	-	-	+	+
<i>S.sobrinus</i>	d,g	-	-	-	+	+	-	-
<i>S.ferus</i>	c	-	-	-	-	-	+	+
<i>S.macacae</i>	c	-	+	-	-	-	+	+
<i>S.downei</i>	h	-	-	-	-	-	+	-

Especies del grupo *Streptococci Mutans* se encuentran en el biofilm. Son anaerobios facultativos, capaces de fermentar hidratos de carbono, de cuyo metabolismo deriva la producción de ácidos y la síntesis de polisacáridos extra e intracelulares (Marsh P, 2006).

Dentro de este grupo, las especies *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* son las más fuertemente implicadas en el inicio de la lesión de caries dental.

Streptococcus mutans

Streptococcus mutans (*S. mutans*) es una bacteria cocácea, Gram positivo, microaerofílica. Para poder crecer y desarrollarse “*in vitro*” necesita de medios enriquecidos y un ambiente con baja tensión de oxígeno. Posee los polisacáridos antigénicos definidos para los serotipos c, e, f, y k, siendo el serotipo c el más predominante de la cavidad oral en seres humanos (Seki M, 2006).

Su capacidad de virulencia está asociada a varios factores, como son su poder **acidogénico**, ya que metaboliza hidratos de carbono a ácidos; poder **acidofílico** debido a que es capaz de crecer a pH 5.2 y su carácter **acidúrico**, ya que puede mantenerse metabólicamente activo a pesar de un pH bajo (Banas J, 2004). Las propiedades de patogenicidad permiten su adaptación y crecimiento sobre la película salival adquirida y así la colonización del diente. En esta etapa también influyen factores exógenos como el mayor o menor consumo de sacarosa en la dieta. Para que *S. mutans* se disemine entre las superficies dentarias debe estar presente en cantidad suficiente en la saliva, para poder vencer la resistencia a la colonización que opone la microbiota bucal normal (Park J, 2006).

La habilidad de *S. mutans*, en cuanto a su participación en la formación de placa bacteriana, está relacionada con la producción de las glucosiltransferasas, enzimas que tienen un rol principal en la adherencia y expresión de virulencia de estos microorganismos debido a que catalizan la síntesis de polisacáridos extracelulares (glucanos solubles e insolubles en agua) que promueven la adhesión de estreptococos cariogénicos a la superficie del diente (Banas J, 2004. Huerta J y cols., 2010). Dichas enzimas proporcionan a la célula un sustrato de dónde obtener energía y mantener la producción de ácido durante largos periodos de tiempo. A partir del metabolismo de la sacarosa estos microorganismos producen principalmente ácido láctico, el cual es fundamental en la virulencia debido a que, aparentemente, es el ácido más potente que interviene en la desmineralización del diente. Otra característica del *S. mutans* es su corto efecto post-pH, que puede definirse como el tiempo necesario para recuperar su

actividad de crecimiento habitual tras estar sometido a un bajo pH. Es debido a esto que estas especies bacterianas sean las que consiguen alcanzar más rápidamente el pH crítico 4.5 necesario para iniciar el proceso de desmineralización. *S. mutans* forma parte de la microbiota normal de la boca y aparece junto con la erupción de las piezas dentarias, pero se hace patógeno al aumentar su proporción relativa en la boca (Selwitz R y cols., 2007).

Se ha demostrado que existe una asociación entre un alto recuento de colonias de *S. mutans* y la posibilidad de desarrollar nuevas lesiones de caries, sin embargo, en ciertos casos es posible encontrar individuos con bajo recuentos de *S. mutans* que desarrollan lesiones de caries o pacientes con altos recuentos de colonias de *S. mutans* que no presentan lesiones de caries. Esto último se debe a que la caries dental es una enfermedad multifactorial, en la que participan otros factores aparte del número de colonias, tales como: factores protectores individuales, características del medio ambiente oral y factores de virulencia microbiana (Aguilera L y cols., 2005. Klein M y cols., 2015). Por otra parte estudios demuestran que el *S. mutans*, es un microorganismo con una alta diversidad genotípica, lo que se vería reflejado en que algunos serotipos son más cariogénicos que otros. Esto explicaría porque individuos con un alto recuento no presentan lesiones de caries (Pieralisi F y cols., 2010).

Control de la placa bacteriana

El control de la placa bacteriana es la eliminación de la placa o biofilm en forma regular y la prevención de su acumulación sobre los dientes y superficies gingivales adyacentes. Existen diversos métodos para la eliminación del biofilm y generar la muerte de los microorganismos que lo componen. El **control mecánico** de la placa constituye la base para prevenir los problemas de salud bucodental. Este mecanismo comprende la remoción de la placa por medio del cepillado, la limpieza interdental y el raspado y alisado radicular, ya sea con instrumentos manuales, sónicos, ultrasónicos o rotatorios. El principio de la

limpieza mecánica consiste en eliminar regularmente los microorganismos, no en esterilizar la superficie dentaria, sino en limitar la masa microbiana y por ende, su complejidad (Claydon N, 2008) .

Por otra parte, existe un método para el **control químico** de la placa, que se basa en la utilización de sustancias antisépticas y/o antibióticas que permiten disminuir o retardar la formación de la placa bacteriana, aunque dentro de sus funciones también se encuentra la de evitar la adherencia de las bacterias a la superficie dental. Este método es una medida efectiva en aquellos pacientes que no colaboran en el tratamiento o que por razones sociales, culturales, creencias, edad o limitación física, no pueden llevar a cabo una prevención adecuada (Platt C, 2004).

Considerando la naturaleza microbiana de la placa, los agentes químicos se caracterizan por ser efectivos en el control de esta, debido a sus propiedades bactericidas y su capacidad de reducir o retardar su formación. Se establece que algunos interfieren en la adsorción de la película salival adquirida y la adherencia de bacterias (colonizadores primarios) a la superficie dentaria (Platt C, 2004).

Lindhe refiere que las sustancias químicas influyen sobre la placa cuantitativa y cualitativamente por varias vías. Estos mecanismos podrían ser los siguientes: generar la lisis bacteriana (agentes bactericidas), evitar la adherencia bacteriana (agentes antiadhesivos), detener o retrasar la proliferación bacteriana, extraer la placa establecida y alterar su patogenia (Lindhe J, Newman S, 2000).

El control químico de la placa a nivel supragingival está dado por diversas sustancias químicas que son utilizados como colutorios orales, entre los cuales destacan:

Compuestos de amonio cuaternario

Entre ellos se encuentra el cloruro de cetilpiridinio. El mecanismo de acción es aumentar la permeabilidad de la pared bacteriana favoreciendo la lisis de la misma, disminuyendo el metabolismo de las bacterias produciendo pérdida de adhesión de ellas. Entre las desventajas de estos antimicrobianos están: presentan una menor sustentividad que la clorhexidina, generación de tinciones y aumento de formación de cálculo, sensación de quemazón y algunos estudios han reportado descamaciones en la mucosa oral (De Grado P y cols., 2007).

Fenoles y aceites esenciales

El producto comercial característico de este grupo es el Listerine®. Este colutorio está compuesto por una mezcla de aceites esenciales como: fenol, timol, eucaliptol y mentol combinados con metilsalicilato con un 26,9% de alcohol. El mecanismo de acción de fenoles y aceites esenciales es la ruptura de la pared celular e inhibición de enzimas bacterianas. Estos antimicrobianos pueden reducir la placa entre 20 y 34% (Platt C, 2004). Entre las desventajas de estos antimicrobianos están: sensación de quemazón y un sabor inicial amargo. Además se describe cierto grado de tinción y cálculo supragingival (Bascones A y Morante S, 2006).

Triclosán

El triclosán es un derivado del fenol. Tiene una sustentividad antimicrobiana de alrededor de cinco horas, cuya acción se ve reforzada por el agregado de citrato de zinc o por el copolímero éter polivinilmetacrílico del ácido maleico. Su mecanismo de acción es interrumpir la síntesis de ácidos grasos por inhibición de la enzima enoil-ACP reductasa, provocando la salida de sustancias celulares al alterar la membrana plasmática (Heath R y cols., 1999).

Productos Naturales

Durante años una gran cantidad de productos como hierbas y extractos de plantas se han utilizado en productos para la higiene oral. Uno de los productos que se comercializa es la sanguinarina, un extracto alcaloide tomado de una planta, *Sanguinarina canadienses*. Los estudios han mostrado resultados contradictorios en su eficacia contra la gingivitis y no se conoce en profundidad sus mecanismos de acción (González M, 1999. Da Silveira A y cols., 2009). Los efectos adversos asociados a su utilización son sensación de quemadura y tinciones (Platt C, 2004).

Clorhexidina (Bisguanidas):

El gluconato de clorhexidina corresponde a una bisbiguanida catiónica simétrica, con dos cargas positivas en sus extremos, que le confieren gran actividad frente a los aniones. Posee un amplio espectro de acción antimicrobiana, siendo fuertemente activa contra un gran número de bacterias Gram (-) y Gram (+), además de ciertos hongos. Su mecanismo de acción deriva de una fuerte unión a las membranas celulares bacterianas que en bajas concentraciones produce un aumento de la permeabilidad con filtración de componentes intracelulares (efecto bacteriostático) y a mayores concentraciones ocasiona precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular (Stanley A y cols, 1989).

Una de las propiedades más importantes de este agente es su elevada sustentividad. La clorhexidina adsorbida se libera en su forma activa durante 8-12 horas y después de 24 horas aún es posible encontrarla en bajas concentraciones, evitando la colonización bacteriana durante ese tiempo (Stanley A y cols, 1989).

Sin embargo su efecto adverso más común es la pigmentación marrón de los dientes, de algunos materiales de restauración y de las mucosas, sobre todo del

dorso de la lengua. Además otro efecto secundario descrito frecuentemente es la alteración del gusto, que podría reducirse evitando enjuagarse con agua después de la aplicación de clorhexidina. Por lo que su aplicación en productos de higiene oral de uso diario es cada vez menos frecuente (Bascones A y Morante S, 2006).

En la actualidad no existe un agente químico antimicrobiano ideal. Es por esto que constantemente se están realizando cambios a los agentes terapéuticos actualmente conocidos, ya sea mejorando sus propiedades antimicrobianas, sus propiedades de adhesión (sustantividad) o disminuyendo sus efectos adversos.

Paralelo al desarrollo tecnológico de la industria farmacéutica, se ha desplegado un gran interés de parte de los investigadores por estudiar materiales con propiedades antimicrobianas. En este sentido la nanotecnología y el desarrollo de nanomateriales han adquirido especial importancia debido a la posibilidad de contar con nuevos agentes antimicrobianos.

Nanotecnología

El concepto de nanotecnología fue presentado en 1959 por el físico Richard Feynman, quien exploró la posibilidad de manipular el material en la escala de átomos individuales y moléculas, introduciendo la capacidad creciente de examinar y controlar el material a escalas nanométricas (Pájaro N y cols., 2013).

La nanotecnología se define como el diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a escala nanométrica (Brune H y cols., 2006).

Para entender el potencial de esta tecnología es necesario saber que las propiedades físicas y químicas de la materia cambian a escala nanométrica, lo cual se denomina efecto cuántico. Esto se debería al área de contacto/volumen (razón de aspecto), en donde el área de contacto aumenta dramáticamente permitiendo un mayor número de interacciones con otras moléculas. La

conductividad eléctrica, el color, la resistencia, la elasticidad, la reactividad, entre otras propiedades, se comportan de manera diferente que en los mismos elementos a mayor escala. Por lo tanto, científicos utilizan nanotecnología para crear materiales, aparatos y sistemas más eficientes y poco costosos con propiedades únicas (Ruparelia J, Chatterjee A 2008).

Nanomateriales

Los nanomateriales son una clase de materiales (cerámicos, metales, polímeros, o una combinación de estos), en donde alguna de sus dimensiones se encuentran entre 1 y 100 nm. Estos a su vez pueden ser de diferentes tipos, entre ellos nanocristales, nanofibras, nanocables, nanopartículas y nanotubos (Gajewicz A y cols., 2012). Estos son una transición entre moléculas y átomos, y un material con dimensiones de sólido volumétrico (Tolaymat T y cols., 2010).

Síntesis de nanopartículas

Existen diferentes formas de obtener nanopartículas, las cuales se clasifican en dos grandes grupos, el método top-down, que es el continuo rompimiento de un material y las de bottom-up que consiste en la construcción de nanomateriales a partir de sus constituyentes. Por otro lado, la obtención de nanopartículas se puede clasificar en métodos de síntesis físicas, químicas o biológicas. Entre éstas se encuentran los siguientes métodos (Cruzat C, 2010):

- **Métodos físicos:** condensación con un gas inerte, descarga al arco eléctrico, corte por láser, pirólisis y pirólisis por aerosol.

- **Métodos químicos:** reducción del metal, síntesis solvotermal, síntesis fotoquímica, síntesis electroquímica, rutas termolíticas, rutas sonoquímicas, micelas y micro emulsiones, interfaces líquido-líquido.

- **Métodos biológicos:** microorganismos son los reactores y realizan la síntesis de las nanopartículas.
- **Métodos híbridos:** es una mezcla de los métodos anteriores; como la síntesis láser, el procesamiento selectivo de tamaño post sintético y la dispersión atómica de metal solvatados (DAMS).

En la gran mayoría de los métodos y rutas sintéticas, la formación de las nanopartículas depende de la nucleación que se efectúa al momento de la síntesis de éstas y la estabilidad que se le otorgue a la partícula nanométrica cuando se forma. Es por esto que los métodos químicos son los más utilizados debido a su potencial para controlar adecuadamente el tamaño, la distribución de tamaño y la forma de las nanopartículas. Los métodos químicos tradicionales utilizan agentes reductores y estabilizadores durante la síntesis que en alguna medida son tóxicos y contaminantes. La tendencia desde hace años se ha focalizado en desarrollar métodos de síntesis bajo el concepto de “Química Verde”, que es aquella que utiliza químicos no tóxicos y amigables con el medio ambiente (Usman M y cols., 2012).

Caracterización de nanomateriales

La caracterización de elemento de estructura nanométrica se puede llevar a cabo mediante diversas técnicas, dentro de las cuales destacan:

Espectrofotometría de absorción molecular

La espectrofotometría es una técnica que se basa en el análisis de la cantidad de radiación electromagnética (en el rango de longitudes de onda del ultravioleta y visible) que puede absorber o transmitir una muestra en función de la cantidad de sustancia presente. La aparición de bandas de absorción en el espectro alrededor de longitudes de onda de 550 a 600 nm permite identificar la naturaleza nanométrica de partículas metálicas. Estas bandas se deben a la absorción del

plasmón de resonancia superficial (una característica física de las nanopartículas metálicas) debido a flujo de electrones en la superficie del metal).

Microscopia Electrónica de barrido con microanálisis de energía dispersiva de rayos X y electrones retrodispersados (SEM-EDX-BS)

La microscopia SEM es una técnica que utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen ampliada de la superficie de un objeto. El microscopio electrónico de barrido además de magnificar una imagen tiene dentro de sus funciones el microanálisis de energía dispersiva de rayos X (EDX). Este análisis se realiza mediante un receptor de rayos X incorporado, con el cual se captan los rayos X provenientes de cada uno de los puntos de la superficie sobre los que pasa el haz de electrones. Como la energía de cada rayo X ($k\alpha$) es característica para un elemento en particular, podemos obtener información analítica cualitativa y cuantitativa de la superficie analizada. A su vez el análisis EDX, tiene la opción de mapeo químico de superficie, la cual permite identificar con distintos colores los diferentes elementos presentes en una muestra de tal modo de identificar la distribución de estos.

Difracción de Rayos X (DRX)

La DRX es una técnica que permite analizar la estructura cristalina de los materiales. El principio se basa en medir los ángulos de difracción del rayo X que se producen por los diferentes planos de la estructura del cristal, que genera un patrón característico para cada tipo de sólido cristalino

Espectroscopia infrarroja de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

El FTIR-ATR es una técnica que permite la identificación de grupos funcionales de la estructura química de los materiales.

Análisis Termogravimétrico (TGA)

El TGA es una técnica en la cual se mide la variación de masa de una muestra mientras se somete a un programa de temperatura controlado en una atmósfera específica. El TGA permite observar la descomposición térmica de los materiales, en especial cuando esta descomposición ocurre a temperaturas muy separadas, permite calcular la pérdida en porcentaje de masa a distintas temperaturas de descomposición.

Nanopartículas metálicas con propiedades antimicrobianas

Se sabe que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas metálicas, es una función del área de superficie en contacto con los microorganismos. Se ha demostrado una relación inversa entre el tamaño de las nanopartículas y su actividad antimicrobiana, donde las nanopartículas en el rango de tamaño de 1-10 nm han mostrado tener la mayor actividad antibacteriana (Tolaymat T y cols., 2010). La transición de micropartículas a nanopartículas involucra un incremento en la relación área de contacto/volumen (razón de aspecto), en donde el área de contacto aumenta dramáticamente permitiendo un mayor número de interacciones con moléculas orgánicas, inorgánicas y bacterias (Zhang L y cols., 2010).

Existen reportes de actividad antimicrobiana de distintas nanopartículas metálicas como el oro, plata, **cobre**, titanio y zinc (Chatterjee A, 2014. Rai M, 2009. Li X y cols, 2014). Pese a esto, los mecanismos bactericidas de estas aún no se entienden completamente. Tres mecanismos hipotéticos son los más aceptados y reportados en la literatura:

- Acumulación y disolución de nanopartículas metálicas en la membrana plasmática generan un cambio en su permeabilidad, con la consecuente liberación de lipopolisacáridos, proteínas de membrana y biomoléculas intracelulares (Khan S y cols., 2012).

- Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) generando daños oxidativos a las estructuras celulares como el DNA, la membrana plasmática y las proteínas de membrana (Fang J y cols., 2007).
- Adsorción de iones metálicos derivados de las nanopartículas o las mismas nanopartículas en el interior de las células, seguido por el agotamiento de la producción de ATP intracelular y la interrupción de la replicación del ADN (Lok C y cols., 2006).

En la **Figura 2** se esquematizan las interacciones entre las nanopartículas de plata (AgNP) y los iones de plata con una célula bacteriana.

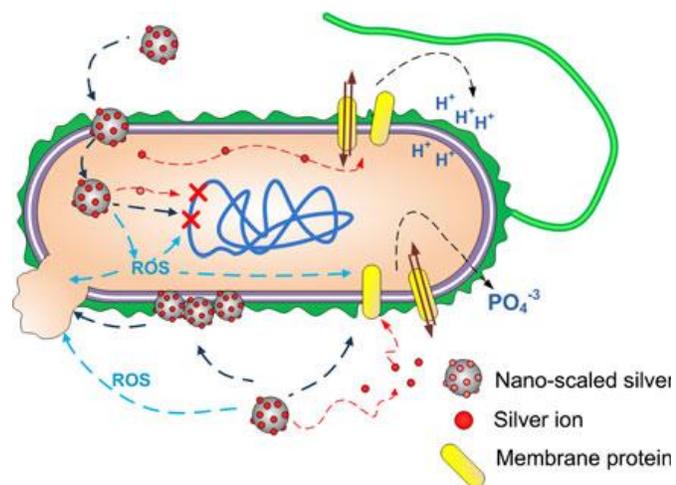


Figura 2. Esquema de la interacción entre AgNP y células bacterianas. Las AgNP pueden liberar iones de plata y generar ROS; interactuar con proteínas de membrana; afectando su permeabilidad; y entrar en la célula, donde puede generar ROS, liberar iones de plata y afectar el DNA (Neal A, 2008).

Nanopartículas de cobre (CuNP)

En el contexto de los estudios del cobre como biocida surge el interés por las CuNP. Estas nanopartículas como todo compuesto nano, tienen una gran área superficial con respecto a su volumen lo que hace resaltar las propiedades del cobre y favorece la liberación de iones cobre siendo aún más nocivo para microorganismos patógenos.

Varias son las publicaciones científicas que evidencian las propiedades bactericidas de las CuNP (Chatterjee A, 2014. Rai M, 2009, Li X y cols, 2014). Se ha probado su poder antimicrobiano frente *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* y *Candida albicans* (Li X y cols, 2014). Sin embargo en la literatura disponible, no hay evidencia de la actividad antimicrobiana que pudiesen tener estas nanopartículas frente a *Streptococcus mutans*.

Son escasos los estudios que reportan sobre el mecanismo bactericida específico de las CuNP. Algunos autores sugieren que los iones Cu provenientes de las nanopartículas pueden interactuar con fósforo y azufre. Es por esto que biomoléculas como el ADN y proteínas pueden distorsionar sus estructuras y por lo tanto perturbar los procesos bioquímicos frente a la presencia de las CuNP (Raffi M y cols., 2010. Ruparelia J y cols., 2008).

Un estudio realizado por Chatterjee reveló que se genera una filamentación bacteriana, causada por la despolarización de la membrana celular mediada por las CuNP y los iones de Cu²⁺. Por otra parte la muerte celular se produce por generación de ROS en las células, lo que resulta en peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, y degradación del ADN (Chatterjee A, 2014).

Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas se definen como partículas de tamaño inferior a 1 μm generalmente entre 10 y 500 nm, elaboradas a partir de materiales poliméricos de diferente naturaleza. El método de fabricación y la composición química de éstos influenciarán su funcionalidad y efectividad (Brigger I y cols., 2002).

Las nanopartículas poliméricas fueron elaboradas por primera vez durante la década de los 70, pensando en desarrollarlas como medio de liberación de moléculas activas y vacunas (Kreuter J, 2007). Actualmente sus aplicaciones terapéuticas son tan diversas como las vías por las cuales pueden ser administradas, destacando dentro de ellas las vías oral, pulmonar, oftálmica, endovenosa, intramuscular, intraocular e intraarticular, entre otras (Viswanathan S y cols., 2010).

Existen diversos materiales empleados como componente principal de la matriz que formará las nanopartículas biodegradables encapsulantes de moléculas terapéuticas, dentro de éstos se incluyen fosfolípidos y ácidos grasos, proteínas (gelatina, albúmina) y polímeros, naturales (dextrano, quitosano), semisintéticos (derivados de celulosa) o sintéticos poli(acrilatos), poli(anhídridos), poli(acrilamidas) y poli(ésteres) (Brigger I y cols., 2002).

El quitosano es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, corresponde a un polisacárido transformado que se obtiene por la desacetilación de quitina natural (N-acetilglucosamina), constituyente del caparazón de los crustáceos y de muchas paredes celulares (Dash M y cols, 2011). El quitosano ha adquirido mucha atención, porque es un polisacárido con excelentes propiedades, como biocompatibilidad, biodegradabilidad, poca toxicidad, además de poseer propiedades de adsorción, resultando en muchos casos sintetizado como microesferas, hidrogeles, películas, entre otras (Cafaggi S, 2007).

Existe evidencia que demuestra que nanopartículas fabricadas a partir de polímeros naturales como el **quitosano (QuitNP)** poseen propiedades bactericidas. Se ha evaluado la efectividad de estas nanopartículas frente a *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocitogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans* (Ikinci G y cols., 2002. Rhim J y cols., 2006).

El mecanismo de acción de las QuitNP no ha sido estudiado en profundidad, escasos son los reportes que hablan de método que tienen estas nanopartículas para interactuar con las bacterias. Se propone que existe una interacción entre la carga positiva de las moléculas de quitosano, proveniente de los grupos amino y la carga negativa de la membrana plasmática de los microorganismos. Esto determinaría un aumento en la permeabilidad de la membrana bacteriana, conduciendo a una fuga de proteínas y otros elementos intracelulares (Chávez de Paz L y cols., 2011).

Si bien las QuitNP pueden ser utilizadas como un material antimicrobiano, estas nanopartículas al igual que otras nanopartículas poliméricas también son utilizadas como un vehículo para ciertas moléculas terapéuticas. Dentro de los objetivos que se pueden alcanzar empleando nanopartículas cargadas con moléculas terapéuticas destacan (De Jong W, Borm P, 2008):

- Mejorar la estabilidad física y química de los principios activos encapsulados.
- Aumentar la absorción de moléculas activas, lo que se traduce en una mejor biodisponibilidad.
- Actuar como sistemas de liberación controlada, reduciendo fluctuaciones de concentración de principios activos en sangre.
- Alcanzar tejidos/barreras específicas y penetrar células inalcanzables por principios activos convencionales gracias a su pequeño diámetro.
- Disminuir los efectos adversos y toxicidad asociada a la administración de fármaco libre.

Variados son los usos comerciales que actualmente tiene el quitosano, dentro de ellos destacan su aplicación en la industria cosmética (espumas de afeitar y cremas para la piel), productos dietéticos (adelgazantes) y la industria alimentaria (espesante de alimentos y agentes preservantes) (Velásquez C. 2003). Sin embargo en el ámbito odontológico no existen referencias de productos comerciales que lo incorporen como un ingrediente principal. Estudios preliminares de quitosano en sistema acuosos investigan su capacidad de adhesión a mucosas orales, para la liberación controlada de fármacos. Esto se debería a que el quitosano posee una carga positiva, por lo que interactúa con moléculas cargadas negativamente, incluidas proteínas, polisacáridos aniónicos y ácidos nucleicos y la membrana plasmática de bacterias, todos presentes en la superficie de las mucosas orales (Senel S y cols., 2000).

Actualmente no existe evidencia de la síntesis de una nanopartícula de quitosano (hasta 1000 nm) cargada con nanopartículas metálicas (hasta 100 nm). Es por esto que resulta atractiva la idea de sintetizar una **nanopartícula híbrida cobre-quitosano**, ya que la combinación de las CuNP con las QuitNP podría mejorar la capacidad de adhesión a los tejidos orales de las nanopartículas metálicas y a su vez obtener una partícula con propiedades antimicrobianas potenciadas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Suspensiones compuestas a base de nanopartículas metálicas (CuNP) y poliméricas (QuitNP) presentan propiedades bactericidas frente a *Streptococcus mutans*.

Objetivo General

Sintetizar suspensiones basadas en nanopartículas de cobre y quitosano, y evaluar sus propiedades antimicrobianas sobre el patógeno *Streptococcus mutans*.

Objetivos Específicos

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas de cobre y quitosano utilizando reactivos biocompatibles.
2. Sintetizar y caracterizar nanopartículas híbridas de cobre-quitosano.
3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las nanopartículas sintetizadas frente a *Streptococcus mutans*.
4. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB), de las nanopartículas sintetizadas frente a *Streptococcus mutans*.
5. Evaluar las propiedades antimicrobianas de una superficie dentaria tratada con nanopartículas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Síntesis y caracterización de nanopartículas

1.1 Síntesis de nanopartículas de cobre y quitosano

Se sintetizaron nanopartículas de cobre y quitosano bajo el concepto de “química verde”, basados en métodos inicialmente desarrollados en el Laboratorio de Nanobiomateriales para suspensiones acuosas de CuNP (González J, 2012), los que fueron adecuados y modificados en el presente trabajo para la obtención de nanopartículas en polvo.

1.1.1 Síntesis de nanopartículas de cobre sin almidón (CuNP s/a)

Se sintetizó una suspensión de 1.000 ml de CuNP 1.000 $\mu\text{g/ml}$. Esta suspensión se formó mezclando 920,6 ml de ácido ascórbico 10% y 79,4 ml de una solución de acetato de cobre 0,2 M. Luego se calentó la mezcla en un microondas marca Samsung® modelo M1610N (Malasia), a 600 W de potencia durante 10 minutos en diez series de 60 segundos cada uno y se obtuvo la suspensión de CuNP.

La suspensión de CuNP se dejó decantar por 2 días y luego se eliminó el sobrenadante. Las CuNP fueron centrifugadas durante 7 ciclos de 45 minutos cada uno, a 12.000 rpm utilizando una centrifuga marca Hermle® modelo z 326 (Alemania). Entre cada ciclo se eliminó el sobrenadante y las nanopartículas fueron lavadas y resuspendidas en agua destilada.

La suspensión de CuNP c/a se congeló a -80°C durante 24 horas en un congelador marca ilShinBioBase® modelo DF8514 (Corea) y luego fue liofilizada por 48 horas utilizando un liofilizador marca ilShinBioBase® modelo FD5508 (Corea) hasta la obtención de nanopartículas en polvo.

1.1.2 Síntesis de nanopartículas de cobre con almidón (CuNP c/a)

Se sintetizó una suspensión de 1.000 ml de CuNP c/a 1.000 $\mu\text{g/ml}$. Esta suspensión se formó mezclando 920,6 ml de ácido ascórbico 10 %, 10 g de almidón y 79,4 ml de una solución de acetato de cobre 0,2 M. Luego se calentó la mezcla en un microondas por 10 minutos en diez series de 60 segundos y se obtuvo la suspensión de CuNP c/a.

La suspensión de CuNP c/a se dejó decantar por 2 días y luego se eliminó el sobrenadante. Las CuNP c/a fueron centrifugadas durante 7 ciclos de 45 minutos cada uno, a 12.000 rpm. Entre cada ciclo se eliminó el sobrenadante y las nanopartículas fueron lavadas y resuspendidas en agua destilada para eliminar el almidón presente en la suspensión. Para verificar esto se agregó tintura de yodo al sobrenadante para detectar la presencia de almidón.

La suspensión de CuNP c/a se congeló a -80°C durante 24 horas y luego fue liofilizada por 48 horas hasta la obtención de nanopartículas en polvo.

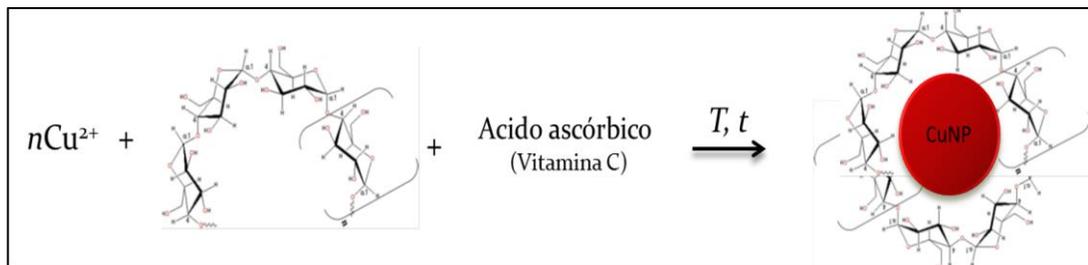


Figura 3. Esquema de la síntesis de CuNP.

T: Temperatura; t: Tiempo; n: Cantidad de veces de Cu^{2+} .

1.1.3 Síntesis de nanopartículas de quitosano (QuitNP)

Las QuitNP se sintetizaron basándose inicialmente en el método reportado por Qi L y cols., 2004 (figura 4). El procedimiento original descrito por el autor consideraba la utilización de ácido acético. Sin embargo en el presente trabajo se optó por utilizar ácido láctico, debido a su biocompatibilidad y el olor desagradable del ácido acético, que no sería compatible en potenciales aplicaciones odontológicas.

Se sintetizó una suspensión de 100 ml de QuitNP. Esta suspensión se preparó disolviendo 0,5 g de quitosano de alto peso molecular (310.000–375.000 Da, Sigma-Aldrich) en 100 ml de ácido láctico 1%. Se ajustó el pH de la solución entre 4,6-4,8 utilizando hidróxido de sodio (NaOH) 10 N. Se agregó 25 ml de polimetafosfato de sodio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) 0,25 % a 75 ml de la solución de quitosano en agitación y espontáneamente se formaron las QuitNP.

Las QuitNP se centrifugaron durante 5 ciclos de 45 minutos cada uno, a 12.000 rpm. Entre cada ciclo se eliminó el sobrenadante y las nanopartículas fueron lavadas y resuspendidas en agua destilada.

La suspensión de QuitNP se congeló a -80°C durante 24 horas y luego fue liofilizada por 48 horas, hasta la obtención de nanopartículas en polvo.

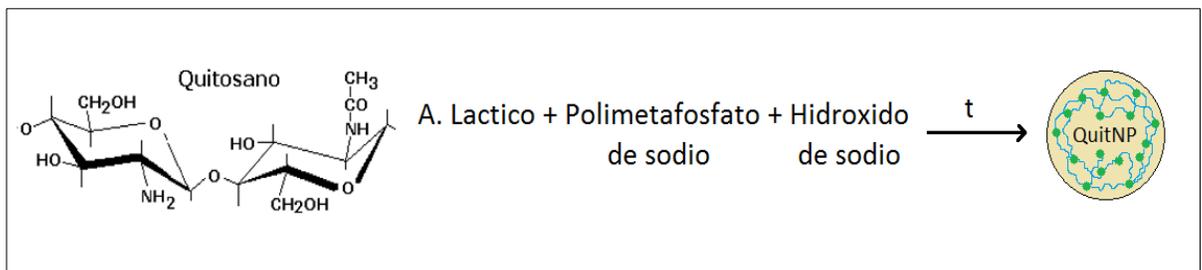


Figura 4. Esquema de la síntesis de QuitNP.

t: Tiempo.

1.1.4 Síntesis de nanopartículas híbridas (CuNP/ QuitNP)

Se sintetizó una suspensión de 100 ml de CuNP/QuitNP. Esta suspensión se preparó disolviendo 0,5 g de quitosano de alto peso molecular (310.000–375.000 Da, Sigma-Aldrich) en 100 ml de ácido láctico 1 %. Se ajustó el pH de la solución entre 4,6-4,8 utilizando NaOH 10 N y se agregó 0,4 g de CuNP c/a en polvo. Se agregó 25 ml de polimetafosfato de sodio 0,25 % a 75 ml de la solución de cobre-quitosano en agitación y espontáneamente se formaron las CuNP/QuitNP.

Las CuNP/QuitNP se centrifugaron durante 5 ciclos de 45 minutos cada uno, a 12.000 rpm. Entre cada ciclo se eliminó el sobrenadante y las nanopartículas fueron lavadas y resuspendidas en agua destilada.

Las CuNP/QuitNP se congelaron a -80°C durante 24 horas y luego fueron liofilizadas por 48 horas, hasta la obtención de nanopartículas en polvo.

1.2 - Caracterización de las Nanopartículas

1.2.1 Espectrofotometría de absorción molecular

El espectro de absorción se obtuvo usando suspensiones de CuNP s/a y CuNP c/a en agua destilada, utilizando un rango de longitud de onda entre 400 y 800nm. Para esto se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible UNICAM modelo UV-2, (Inglaterra).

1.2.2 Microscopia Electrónica de barrido con microanálisis de energía dispersiva de rayos X y electrones retrodispersados (SEM-EDX-BS)

Mediante análisis SEM se examinó el tamaño y la morfología de las CuNP s/a, CuNP c/a, QuitNP y CuNP/QuitNP. Para la preparación de los especímenes las nanopartículas en polvo fueron suspendidas en alcohol etílico 96 % y se dejaron

en ultrasonido por 10 minutos. Luego se depositó una gota de cada suspensión sobre la grilla recubierta con un film de carbono para ser analizada una vez evaporado el solvente. Mediante el análisis EDX se estudió la composición química de las diferentes nanopartículas, y se realizó un mapeo químico de superficie a las CuNP/QuitNP para conocer la disposición de los elementos constituyentes. Para realizar todos estos análisis se utilizó un Microscopio electrónico de barrido/microanálisis EDX modelo Jeol 5410 (República Checa)

1.2.3 Difracción de Rayos X (DRX)

Mediante DRX se identificó la presencia de la nanopartículas metálicas, mediante señales producidas en la estructura cristalina de la muestra en polvo. Para esto se utilizó un difractor de rayos X de polvo, SIEMES modelo D 5.000 con radiación $\text{CuK}\alpha$ (Alemania).

1.2.4 Espectroscopia infrarroja de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

Mediante FTIR-ATR se analizó la estructura de las CuNP/QuitNP, identificando señales con frecuencias que corresponden a la vibración de enlaces específicos. Para esto se utilizó un espectrómetro Agilent Technologies modelo Cary 630 FTIR (Estados Unidos).

1.2.5 Análisis Termogravimétrico (TGA)

Mediante este análisis se determinó el porcentaje de cobre presente en las CuNP/QuitNP. Se midió la pérdida de peso producto de la calcinación del quitosano. Para esto 200 mg de CuNP/QuitNP fueron expuestos a un programa de calentamiento desde 10 a 900 °C. Para este estudio se utilizó un analizador termogravimétrico NETZSCH TG 209 F1 Libra® thermo-microbalance (Alemania).

1.3.- Preparación de una suspensión basada en una mezcla física de CuNP y QuitNP (CuNP+QuitNP)

Se preparó una suspensión de nanopartículas de cobre-quitosano 1.000 ppm. Para esto se realizó una mezcla física de CuNP c/a (polvo) y QuitNP (polvo) conservando la misma proporción de cobre y quitosano encontrada en las CuNP/QuitNP.

2. Evaluación de las propiedades bactericidas de las diferentes nanopartículas

Se utilizó en esta investigación una cepa de *Streptococcus mutans*, American Type Culture Collection (ATCC) 25175, con la que se hizo una suspensión en caldo BHI (Infusión Cerebro- Corazón). La suspensión bacteriana se incubó en jarras BBL gaspak jar (Estados Unidos), con un ambiente de microaerofilia y fue dejado en estufa MEMMERT® modelo 400 (Alemania) a 37 °C por 48 horas. La pureza bacteriana se comprobó sembrando en placa Petri en Agar BHI, por las características morfológicas propias de las colonias del *S. mutans* y ausencia de contaminantes en la placa y observación microscópica de frotis realizados de colonias cultivadas en el Agar y de la suspensión en BHI, teñidos con Tinción Gram.

La determinación de la **CMI** y la **CBM** se realizaron basándose en los métodos reportados por Andrews J, 2001.

2.1 Determinación de la CMI

Las bacterias se sembraron en condiciones estériles, bajo campana de flujo laminar marca Labtec® en una serie de tubos de ensayos.

En cada tubo se depositó 1 ml de suspensión de nanopartículas en diferentes concentraciones (CuNP s/a 10-60 µg/ml, CuNP c/a 10-60 µg/ml, QuitNP 50-500 µg/ml, CuNP/QuitNP 10-60 µg/ml y CuNP+QuitNP 10-60 µg/ml), obtenidas por dilución de una suspensión madre de 1.000 µg/ml. También se depositó 1 ml de medio de cultivo BHI doble concentrado, y 100 µl de una suspensión bacteriana de 48 horas de crecimiento ajustado a un estándar de 0,5 Mcfarland (aprox. 10^8 UFC/ml) de modo visual y con espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro JENWAY® modelo 63200 (Inglaterra). Los tubos se incubaron en jarras con un ambiente de microaerofilia en estufa a 37 °C por 48 horas. Transcurrido este periodo se identificó de modo visual la concentración más baja de nanopartículas que fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. El ensayo se realizó 3 veces por duplicado para cada una de las nanopartículas.

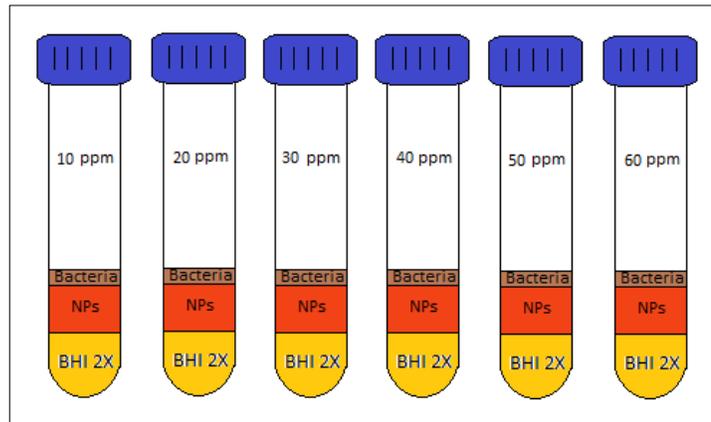


Figura 5. Determinación de la concentración inhibitoria mínima. Serie de tubos con medio de cultivo líquido BHI doble concentrado, suspensión bacteriana y distintas concentraciones de nanopartículas.

2.2 Determinación de la CMB

Se realizó una serie de tubos en cada uno de los cuales se depositó 1 ml de suspensión de nanopartículas en diferentes concentraciones (CuNP s/a 10-60 $\mu\text{g/ml}$, CuNP c/a 10-60 $\mu\text{g/ml}$, QuitNP 50-500 $\mu\text{g/ml}$, CuNP/QuitNP 10-60 $\mu\text{g/ml}$ y CuNP+QuitNP 10-60 $\mu\text{g/ml}$), obtenidas por dilución de una suspensión madre de 1.000 $\mu\text{g/ml}$. También se depositó 1 ml de medio de cultivo BHI doble concentrado, y 100 μl de una suspensión bacteriana de 48 horas de crecimiento ajustado a un estándar de 0,5 Mcfarland (aprox. 10^8 UFC/ml) de modo visual y con espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro. Los tubos se incubaron por 48 horas en estufa a 37°C en microaerofilia. Transcurrido este tiempo se realizó la siembra sobre placas de Petri con agar BHI utilizando spots de 5 μl de las diluciones 1/100, 1/1.000, 1/10.000 y 1/100.000 de cada tubo, preparadas en buffer fosfato estéril pH 7,4. Las unidades formadoras de colonias (UFC) fueron contadas utilizando un contador de colonias marca BOECO® modelo cc1. El recuento de UFC se realizó 3 veces por duplicado para cada dilución de las nanopartículas.

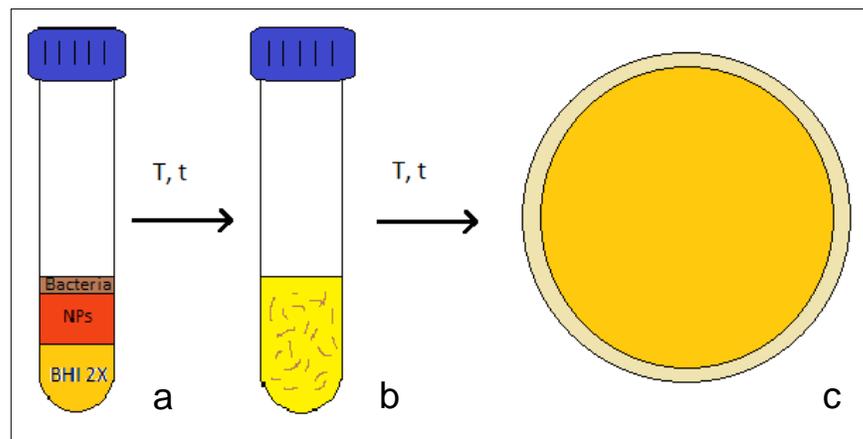


Figura 6. Determinación de la concentración bactericida mínima. a) tubo con medio de cultivo líquido BHI, suspensión bacteriana y nanopartículas. b) crecimiento bacteriano en medio de cultivo líquido. c) siembra de bacterias en medio de cultivo sólido. T: temperatura, t: tiempo.

2.3 Evaluación de la capacidad antibacteriana de una superficie dentaria tratada con las nanopartículas

Para este ensayo se utilizaron terceros molares de pacientes a los cuales fue indicada la extracción por razones quirúrgicas, protésicas u ortodóncicas, sin enfermedad periodontal ni otras enfermedades generales bajo previa firma del consentimiento informado (anexo). Como se puede ver en la **Figura 7**, se cortaron fragmentos de los terceros molares (caras mesiales y distales)(**a**) de 6x4x2 mm de dimensiones (**b**), utilizando un disco de carburundum DENTORIUM bajo refrigeración.



Figura 7. a) área delimitada en tercer molar. b) fragmentos dentales cortados.

Las muestras se esterilizaron bajo luz ultravioleta durante 20 minutos por cada lado. Luego fueron sumergidas por 45 segundos bajo agitación magnética utilizando un agitador magnético marca VETO® modelo 801, en distintas diluciones de las nanopartículas (CuNP c/a 40 $\mu\text{g/ml}$, CuNP s/a 40 $\mu\text{g/ml}$, QuitNP 60 $\mu\text{g/ml}$, CuNP/QuitNP 100 $\mu\text{g/ml}$, CuNP+QuitNP 100 $\mu\text{g/ml}$), como se puede ver en la **Figura 8**. Se utilizaron también soluciones de clorhexidina 0,12% (CHX), cloruro de cetilpiridinio 0,07% (CPC) y agua destilada. Los fragmentos se incubaron en tubos de ensayos, los cuales contenían 1 ml de medio de cultivo BHI y 100 μl de una suspensión bacteriana de 48 horas de crecimiento ajustado a un estándar de 0,5 Mcfarland de modo visual y con espectrofotometría.



Figura 8. Fotografía de fragmento dental sumergido en agua destilada.

Los tubos se cultivaron por 48 horas en estufa a 37 °C, transcurrido este tiempo se formó un biofilm sobre los fragmentos (Zhu M, 2001). Las muestras fueron removidas de los tubos y lavadas con suero fisiológico (NaCl 0,9 %). Luego de lavarlas cada una fue sumergida en un tubo con solución surfactante estéril (Tween 80 al 1 % en NaCl 0,9%) durante 20 minutos. Pasado este tiempo se agitó el tubo en un Vortex QUIMIS® modelo Q-220286 (Brasil) durante 30 segundos. De la suspensión que contenía las muestras, se sembraron en placas de agar BHI spots de 5 μ l de las diluciones 1/100, 1/1.000, 1/10.000 y 1/100.000, hechas en buffer fosfato (K_2HPO_4) estéril pH 7,4 para realizar el recuento bacteriano. Las placas se cultivaron por 48 horas a 37 °C, en jarras con un ambiente de microaerofilia. En la **figura 9**, se puede ver una representación esquemática de la evaluación de la capacidad antibacteriana de una superficie dentaria tratada con las nanopartículas.

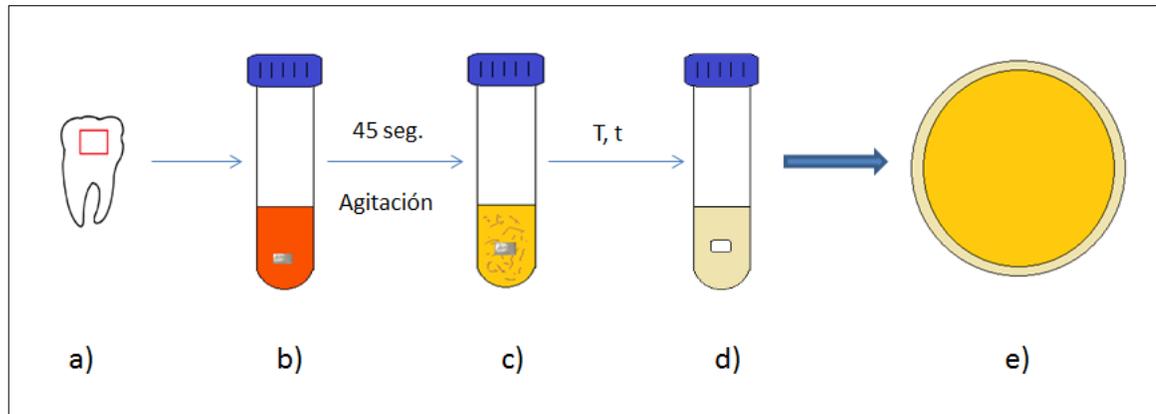


Figura 9. Esquema de la evaluación de las propiedades antibacterianas de una superficie dentaria tratada con las nanopartículas. a) En rojo, sección de la pieza dentaria que se cortó. b) Fragmento dental sumergido por 45 segundos en la suspensión de nanopartículas bajo agitación magnética. c) Fragmento dental incubado con *S. mutans* a 37°C por 48 horas. d) Fragmento dental sumergido en tween 80 durante 20 minutos. e) Siembra en agar BHI, para recuento bacteriano. T: temperatura, t: tiempo.

2.4 Evaluación de la capacidad antibacteriana de las suspensiones de nanopartículas frente a un biofilm formado en la superficie dentaria

Se utilizaron los fragmentos obtenidos a partir de terceros molares. Estos fueron esterilizados bajo luz ultravioleta durante 20 minutos por cada lado. Luego se incubaron en tubos de ensayos, los cuales contenían 1 ml de medio de cultivo BHI y 100 μ l de una suspensión bacteriana de 48 horas de crecimiento ajustado a un estándar de 0,5 Mcfarland de modo visual y con espectrofotometría. Los tubos se cultivaron por 48 horas en estufa a 37 ° C, transcurrido el cual se formó un biofilm sobre los fragmentos (Zhu M, 2001). Para comprobar esto, una de las muestra fue teñida utilizando una solución de cristal violeta.

Cada muestra fue sumergida por 45 segundos bajo agitación magnética, en distintas diluciones de las nanopartículas sintetizadas (tabla 3), además se utilizaron soluciones de Clorhexidina 0,12 % (CHX), cloruro de cetilpiridinio 0,07 % (CPC), agua destilada y una muestra que no fue tratada. Los fragmentos fueron lavados con suero fisiológico (NaCl 0,9 %). Luego de lavar las muestras, cada una fue sumergida en una solución surfactante estéril (Tween 80 al 1 % en NaCL 0.9%) durante 20 minutos. Pasado este tiempo se agitó el tubo en Vortex por 30 segundos y, de la solución que contenía las muestras, se sembraron en placas de agar BHI, spots de 5 μ l de las diluciones 1/100, 1/1.000, 1/10.000 y 1/100.000, hechas en buffer fosfato estéril pH 7,4 para realizar el recuento bacteriano. Las placas se cultivaron por 48 horas a 37 °C, en jarras con un ambiente enriquecido en dióxido de carbono. En la **figura 10**, se puede ver una representación esquemática de la evaluación de la capacidad antibacteriana de las suspensiones de nanopartículas frente a un biofilm formado en la superficie dentaria

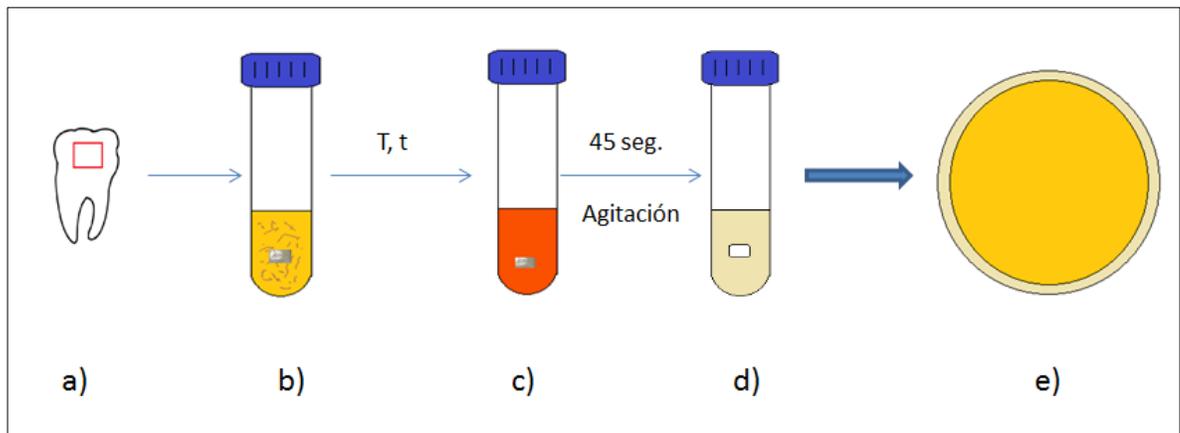


Figura 10. Esquema de la evaluación de la capacidad antibacteriana de las suspensiones de nanopartículas frente a un biofilm formado en la superficie dentaria. a) En rojo, sección de la pieza dentaria que se cortó. b) Fragmento dental incubado con *S. mutans* a 37°C por 48 horas. c) Fragmento dental con biofilm formado, sumergido por 45 segundos en la suspensión de nanopartículas bajo agitación magnética d) Fragmento dental sumergido en tween 80 durante 20 minutos. e) Siembra en agar BHI, para recuento bacteriano. T: temperatura, t: tiempo.

3. Análisis estadístico

Se aplicó el análisis estadístico a los resultados obtenidos de las pruebas microbiológicas. Para esto se realizó la prueba estadística de Shapiro Wilks con el objetivo de comprobar la normalidad de distribución. Debido a que la distribución de los datos no tuvo un comportamiento normal, se aplicó el test de Kruskal Wallis, para ver diferencias entre los distintos grupos de concentraciones de nanopartículas y las UFC formadas. Se consideró un nivel de significancia de 95 % ($p < 0.05$ %). El análisis se realizó mediante el paquete de estadística Stata v11.1

RESULTADOS

1. Síntesis y caracterización de nanopartículas

1.1 Síntesis de nanopartículas de cobre y quitosano

Como se puede apreciar en la **Figura 11**, la formación tanto de las CuNP c/a **(a)** como de las CuNP s/a **(b)**, se evidenció visualmente por la aparición de un color rojizo característico y propio del cobre. La formación de las QuitNP también se evidenció de manera visual por la aparición de un color blanco lechoso al añadir el polimetafosfato de sodio a la solución de quitosano **(c)**, pero además por un aumento en la densidad de la solución.

Tanto la suspensión de CuNP s/a como de CuNP c/a presentaron un pH ácido debido al uso de ácido ascórbico durante su síntesis. La primera registró un pH de 2,2 y la segunda un pH de 2,8. En el caso de la suspensión de QuitNP, también presentó un pH ácido, aunque ligeramente más alcalina que las suspensiones de cobre, registrando un pH de 4,8 debido a que el ácido láctico fue neutralizado utilizando hidróxido de sodio 10 N.

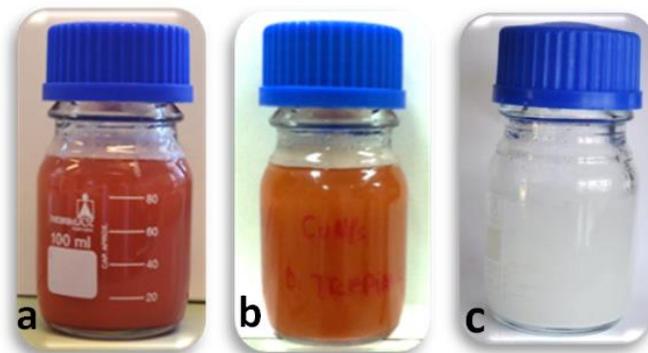


Figura 11. Suspensiones sintetizadas. a) CuNP c/a 1.000 $\mu\text{g/ml}$, b) CuNP s/a 1.000 $\mu\text{g/ml}$, c) QuitNP.

Una vez sometidas las suspensiones al proceso de liofilización, se logró obtener las nanopartículas en forma de polvo, como se puede apreciar en la **Figura 12**. Las CuNP s/a **(a)**, presentaron un color rojizo, característico del cobre. En cambio las CuNP c/a **(b)** presentaron un color marrón oscuro. Por otro lado, como se puede apreciar en la **Figura 13**, las QuitNP presentaron la apariencia de un material sólido **(a)** que al tacto se deshacía fácilmente. Se trituro el material sólido utilizando un mortero **(b)** hasta la obtención de nanopartículas en forma de polvo fino **(c)**.

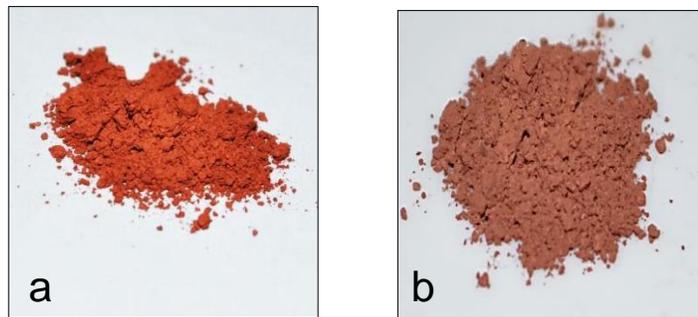


Figura 12. Nanopartículas en polvo de a) CuNP s/a, b) CuNP c/a.

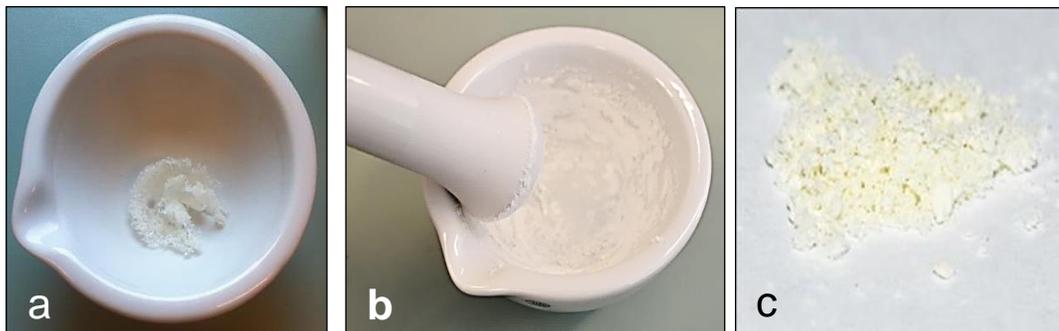


Figura 13. a) Material sólido obtenido del proceso de liofilización. b) trituración de material sólido. c) QuitNP.

En la preparación de las CuNP/QuitNP, se utilizó las CuNP c/a en polvo obtenidas anteriormente. La formación de nanopartículas híbridas se evidenció luego de añadir el agente entrelazante a la solución de cobre-quitosano por un cambio en la densidad de la solución como se puede ver en la **Figura 14**. La suspensión de nanopartículas presentó un pH de 4,8.



Figura 14. Suspensión CuNP/QuitNP.

Las CuNP/QuitNP al ser retiradas del liofilizador presentaron la apariencia de un material sólido al igual que las QuitNP. El material sólido fue triturado utilizando un mortero hasta la obtención de nanopartículas en forma de polvo fino como se aprecia en la **Figura 15**.



Figura 15. Nanopartículas en polvo CuNP/QuitNP.

Se prepararon suspensiones en agua destilada de las 4 nanopartículas obtenidas en polvo. Con esto se logró obtener una suspensión de CuNP c/a 1.000 $\mu\text{g/ml}$, una suspensión de CuNP s/a 1.000 $\mu\text{g/ml}$, una suspensión de QuitNP 1.000 $\mu\text{g/ml}$ y una suspensión de CuNP/QuitNP 1.000 $\mu\text{g/ml}$. Todas ellas con un pH de 6,5.

1.2 Caracterización de las nanopartículas

1.2.1 Espectrofotometría de absorción molecular

Como se puede apreciar en la **Figura 16** las **CuNP c/a** exhibieron un máximo de absorción a 593 nm correspondiente al plasmón de resonancia superficial característico de las nanopartículas de cobre. Esta es una propiedad física que únicamente exhiben los materiales metálicos cuando presentan dimensiones de tamaño nanométrico.

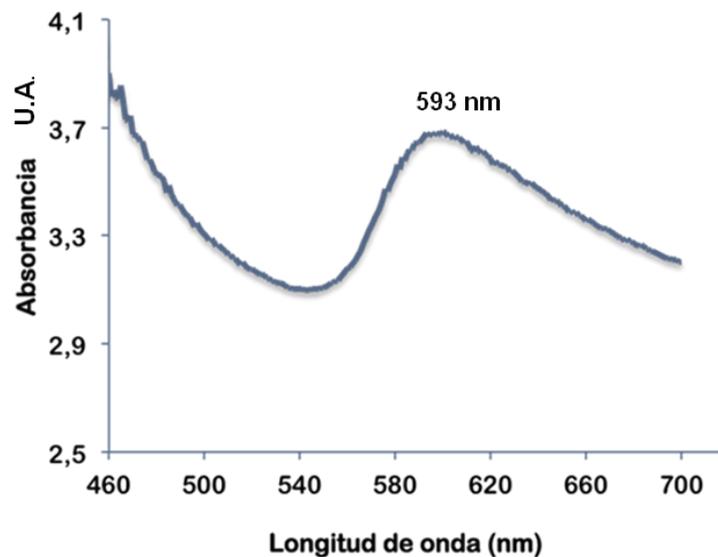


Figura 16. Espectro de absorción de suspensión de CuNP c/a.

Para el caso de las **CuNP s/a**, no fue posible obtener el plasmón de resonancia superficial.

1.2.2 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM/EDX)

1.2.2.1 Análisis SEM/EDX de partículas CuNP s/a

Con esta técnica se determinó la morfología y el tamaño de las CuNP s/a. En la imagen SEM de la **Figura 17**, se aprecia que las nanopartículas presentaron una morfología variable, con formas redondeadas a hexagonales (**a**) y un tamaño promedio de las nanopartículas más pequeñas era de 530 ± 80 nm (**b**). En la **Figura 18** se muestra la distribución de tamaño de las CuNP s/a.

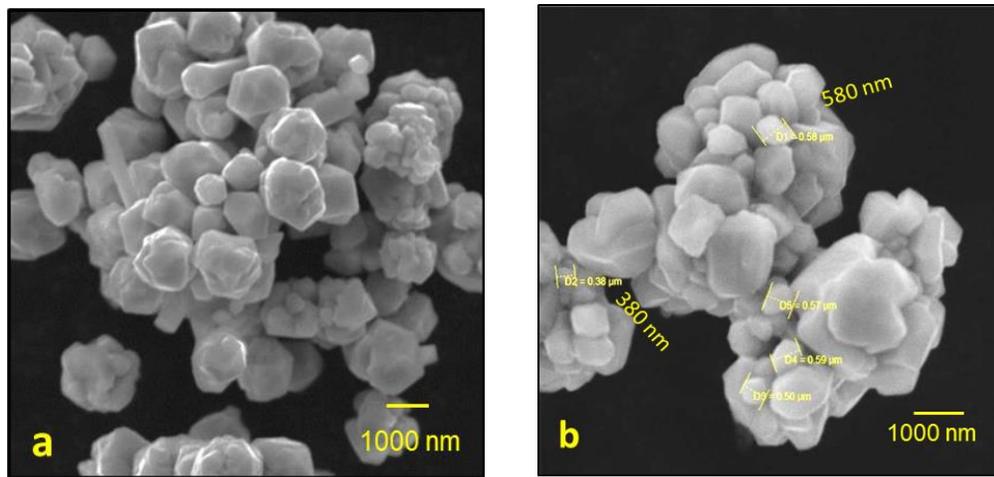


Figura 17. Micrografías SEM; a) morfología CuNP s/a. b) medidas diámetro CuNP s/a

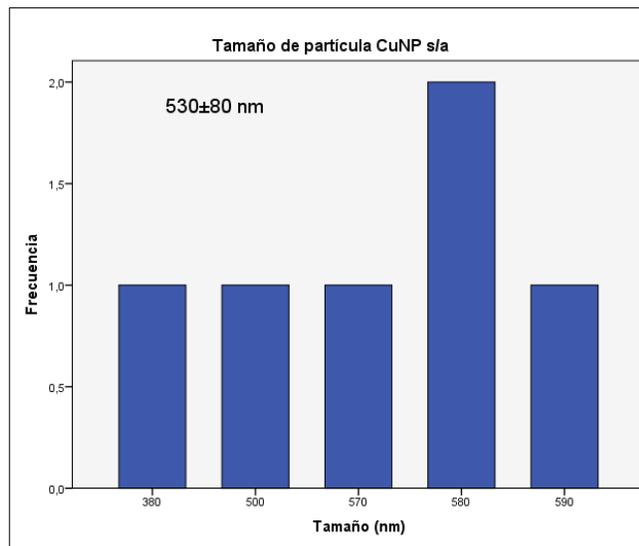


Figura 18. Distribución de tamaño partícula CuNP s/a.

En la **Figura 19** se muestra el espectro EDX de las CuNP s/a, mediante el cual se determinó que la composición elemental de la muestra correspondía en un 100% a cobre.

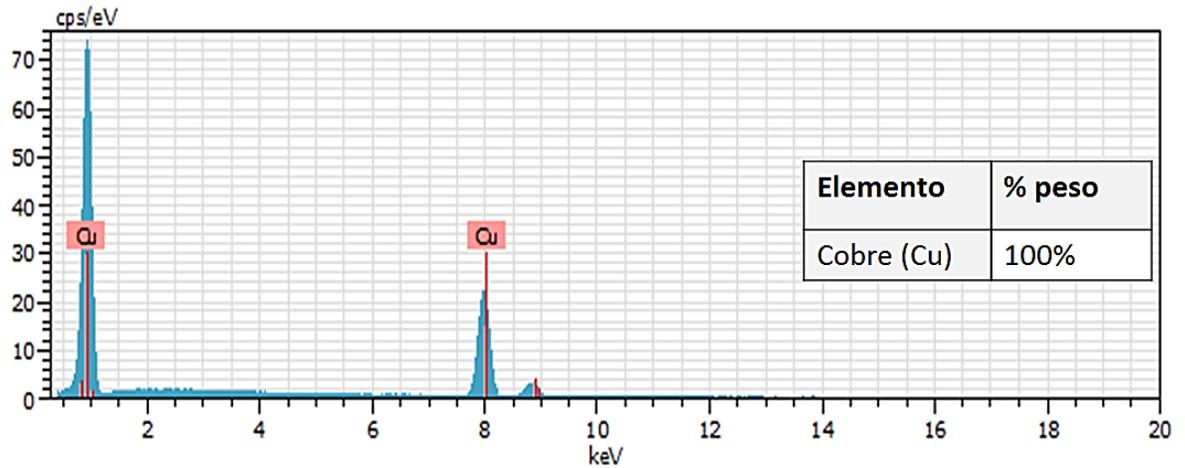


Figura 19. Espectro EDX zonal de CuNP s/a correspondiente al área de la Fig. 17a.

1.2.2.2 Análisis SEM/EDX de partículas CuNP c/a

Como se puede observar en la imagen SEM de la **Figura 20**, las CuNP c/a presentaron una morfología ovalada a esférica y con un tamaño homogéneo entre ellas(**a**), además se determinó el tamaño promedio de las nanopartículas estableciéndose que median aproximadamente 100 ± 20 nm (**b**). En la **Figura 21** se muestra la distribución de tamaño de las CuNP c/a.

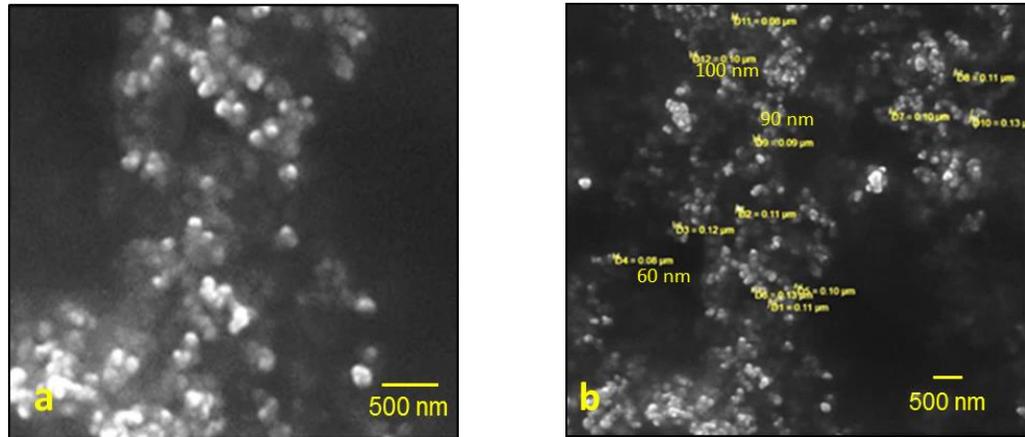


Figura 20. Micrografías SEM; a) morfología de CuNP c/a. b) medidas diámetro CuNP c/a

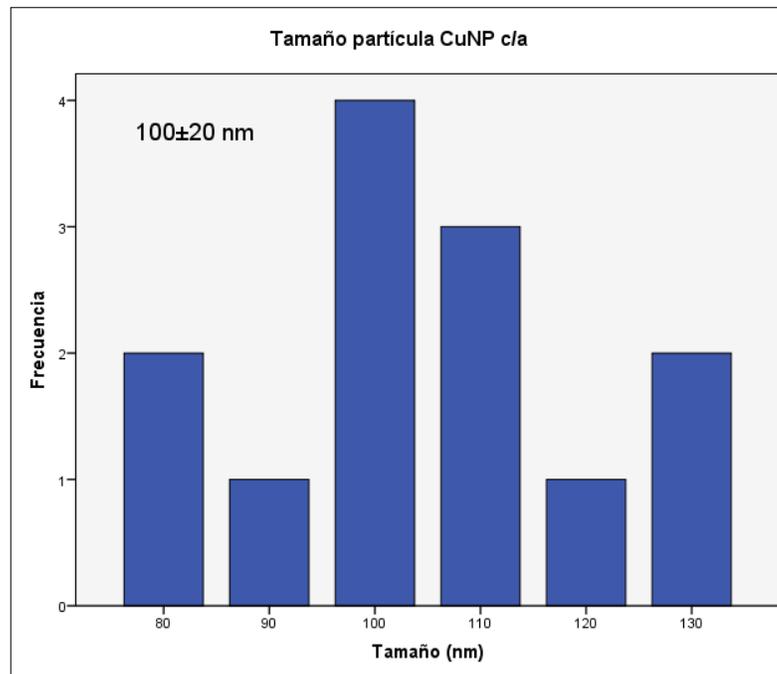


Figura 21. Distribución de tamaño partícula CuNP c/a.

En la **Figura 22** se muestra el espectro EDX de las CuNP c/a, mediante el cual se determinó que la composición elemental de la muestra correspondía en un 100 % a cobre.

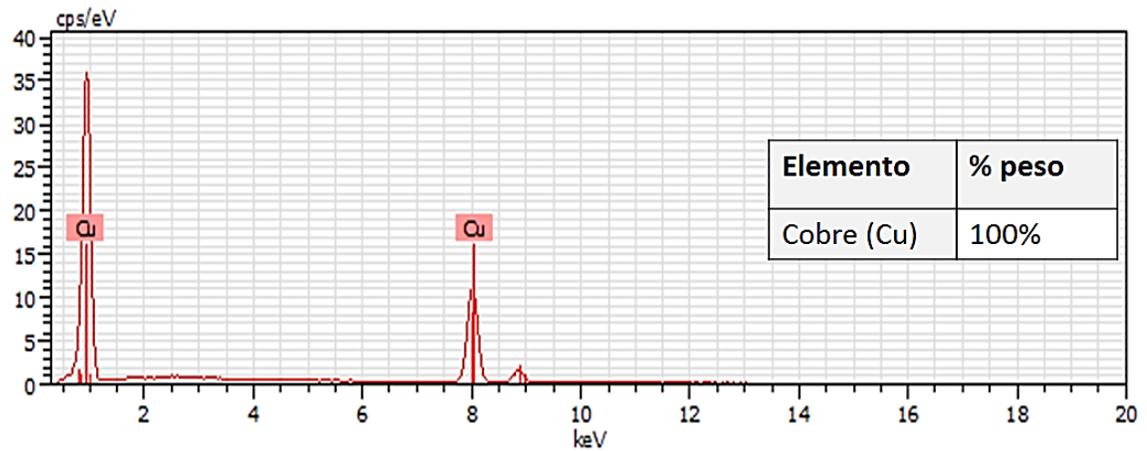


Figura 22. Espectro EDX zonal de CuNP s/a correspondiente al área de la Fig. 20a.

1.2.2.3 Análisis SEM/EDX de partículas QuitNP

Como se puede apreciar en la imagen SEM de la **Figura 23**, las QuitNP sintetizadas, presentaron una morfología ovalada a esférica (**a**) y un tamaño promedio de 93 ± 20 nm (**b**). En la **Figura 24** se muestra la distribución de tamaño de las QuitNP.

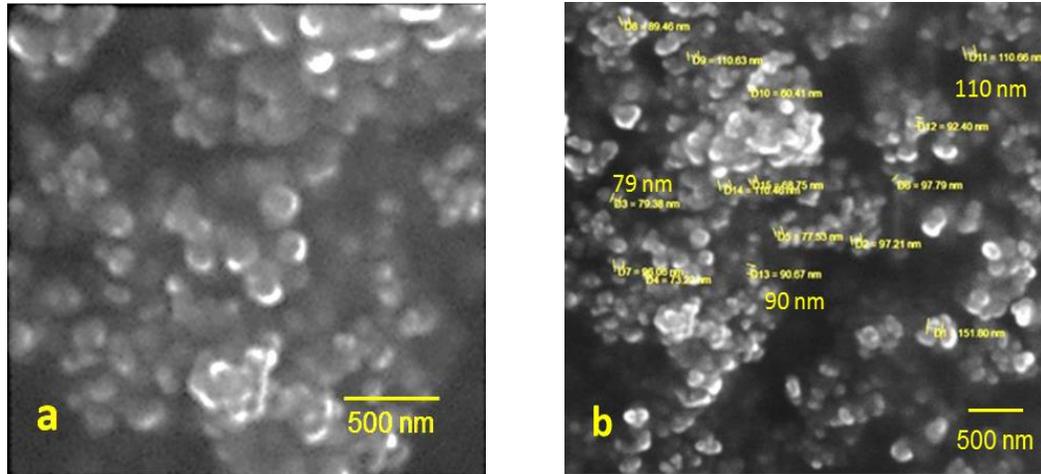


Figura 23. Micrografías SEM, a) morfología de QuitNP b) medidas diámetro QuitNP

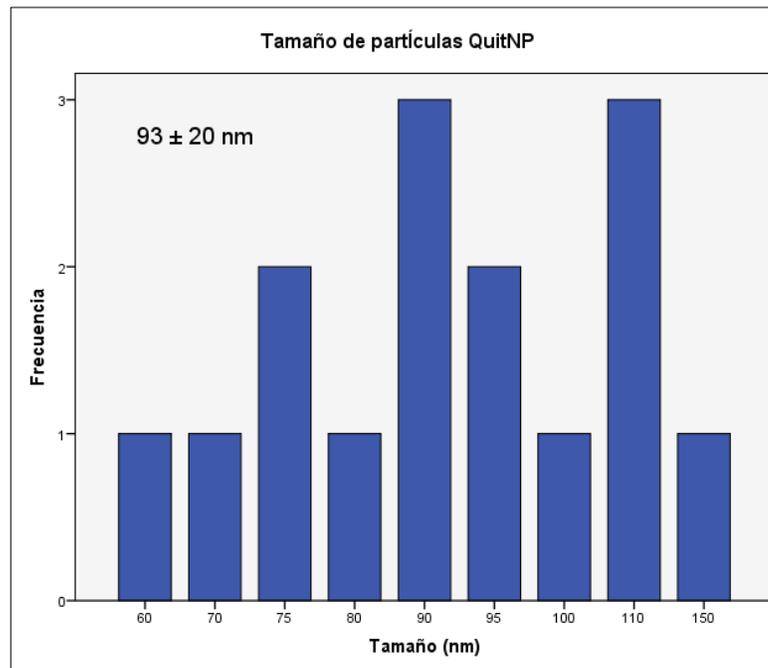


Figura 24. Distribución de tamaño partícula QuitNP.

En la **Figura 25** se muestra el espectro EDX de las QuitNP, mediante el cual se determinó que la composición elemental de la muestra, encontrándose que los elementos predominantes correspondían al carbono con 53,29 % y el oxígeno con 38,15 % de la masa total de las QuitNP. En menor porcentaje aparecen el fósforo con 4,47 % y el sodio con 3,52 %, elementos provenientes del agente entrelazante utilizado en la formación de las QuitNP, el polimetafosfato de sodio.

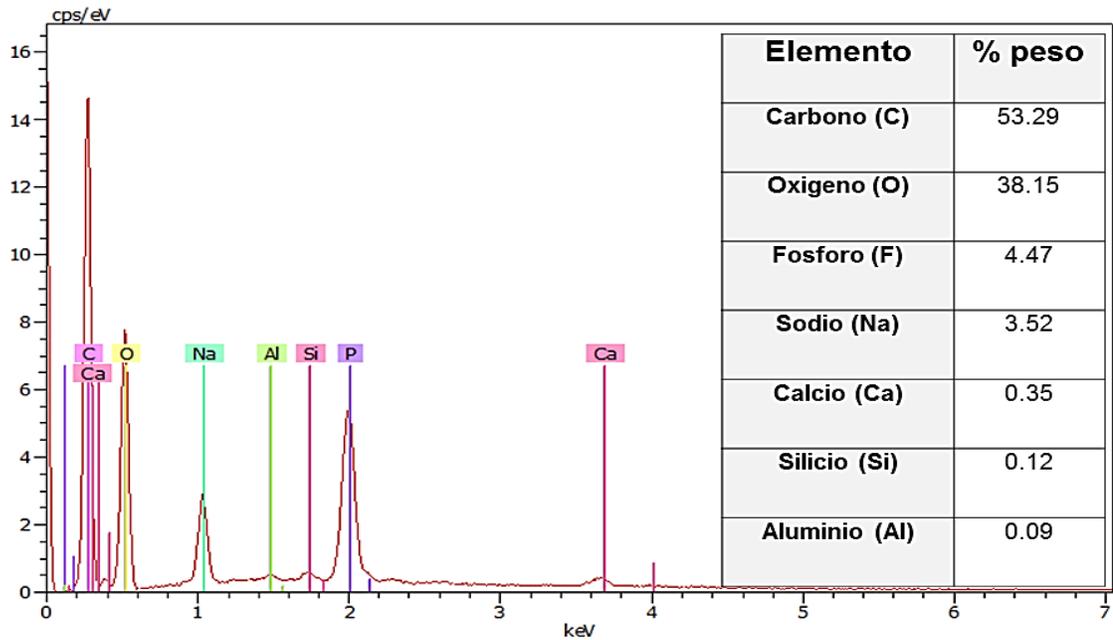


Figura 25. Espectro EDX zonal de QuitNP correspondiente al área de la Fig. 23a.

1.2.2.4 Análisis SEM/EDX de partículas CuNP/ QuitNP

Como se puede apreciar en la imagen SEM de la **Figura 26**, las CuNP/ QuitNP sintetizadas, presentaron una morfología ovalada a esférica (**a**) y un tamaño promedio de 131 ± 36 nm (**b**). En la **Figura 27** se muestra la distribución de tamaño de las CuNP/QuitNP.

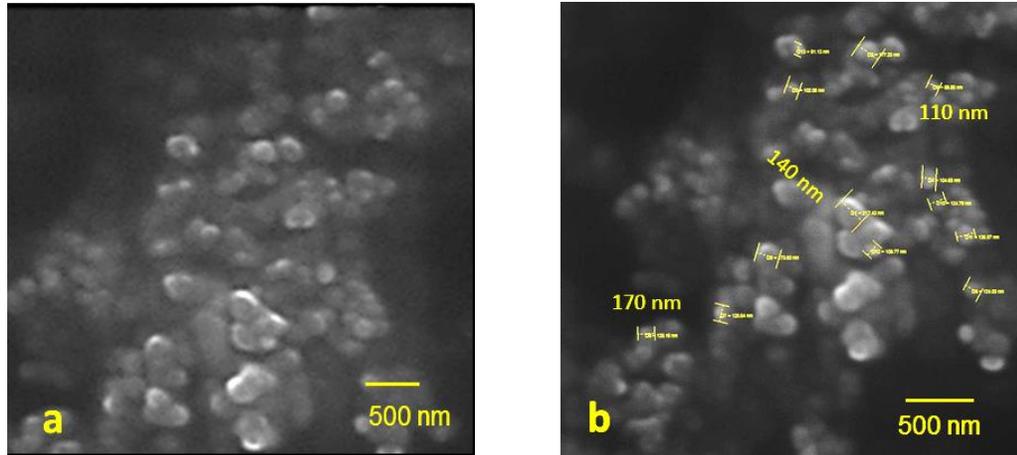


Figura 26. Imágenes SEM, a) morfología de CuNP/QuitNP b) medidas diámetro CuNP/QuitNP

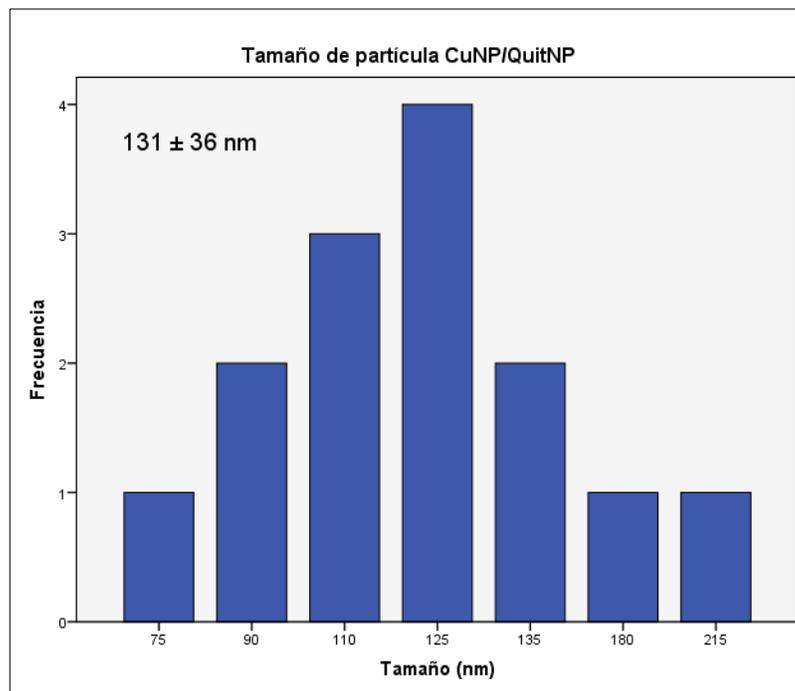


Figura 27. Distribución de tamaño partícula CuNP s/a.

En la **Figura 28** se ve la imagen SEM de las partículas CuNP/QuitNP (**a**) y la misma imagen tomada en modo de contraste de fase (**b**), la cual muestra zonas de mayor densidad electrónica que se representan como áreas de color blanco difuso. Esto se debe a la presencia de cobre al interior de la nanopartícula híbrida.

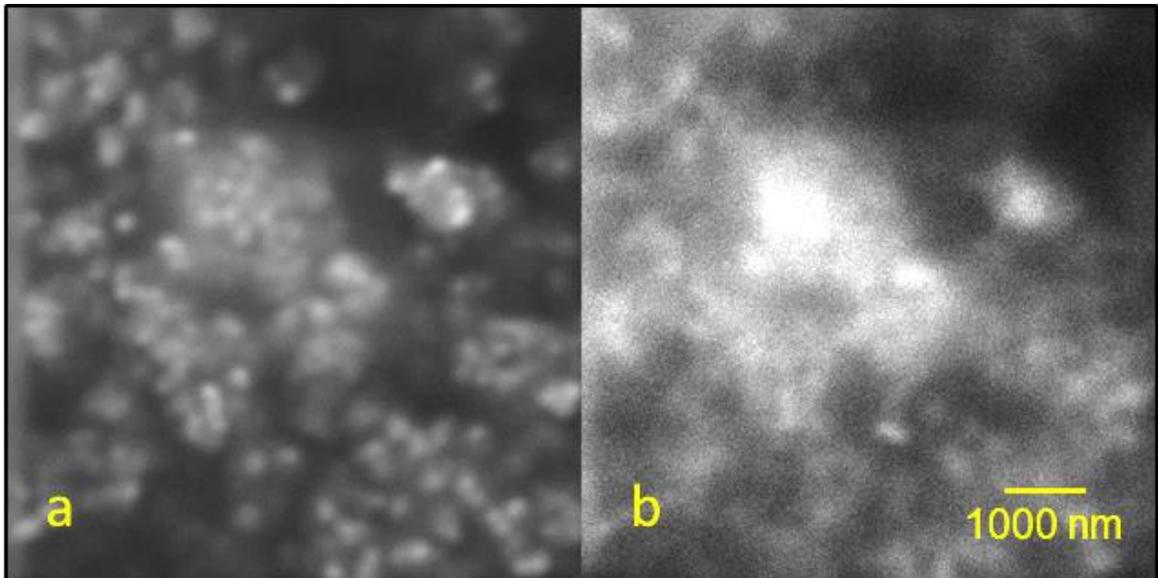


Figura 28. a) Imagen SEM CuNP/QuitNP. b) imagen SEM/BS CuNP/QuitNP

En la **Figura 29** se muestra el espectro EDX de las CuNP/QuitNP, mediante el cual se determinó que la composición elemental de la muestra, encontrándose que los elementos predominantes correspondían al carbono con 53,29 % y el oxígeno con 38,15 % de la masa total de las CuNP/QuitNP. En menor porcentaje aparecen el silicio con 4,47 % y el cobre con 3,52 %.

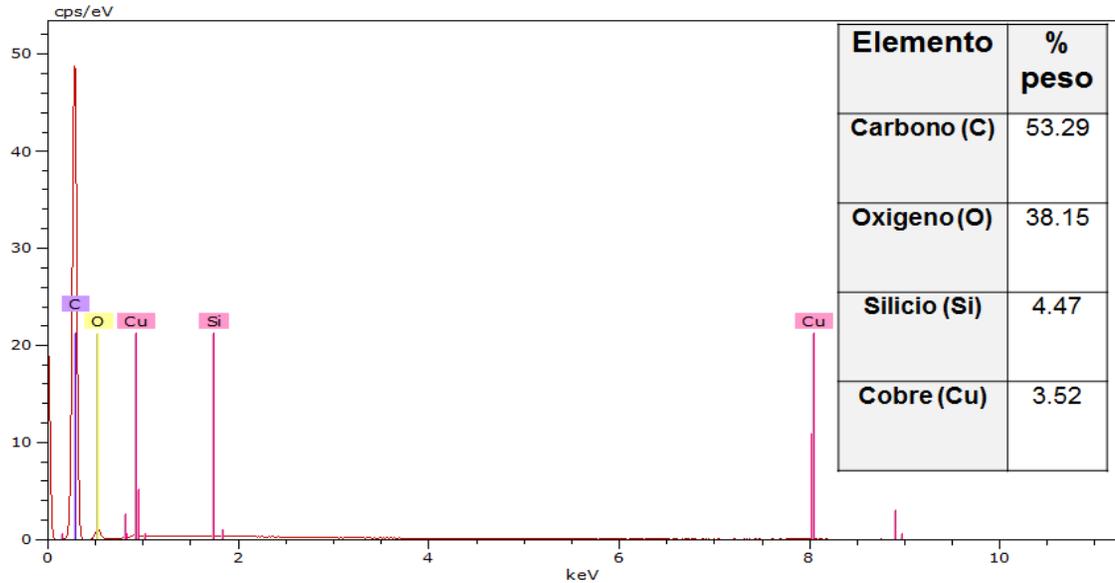


Figura 29. Espectro EDX zonal de CuNP/QuitNP correspondiente al área de la Fig. 26a.

Se realizó un mapeo de elementos químicos a la muestra CuNP/QuitNP, lo cual permitió identificar mediante puntos de colores la radiación ($K\alpha$) emitida por los distintos elementos, determinando la disposición que tenían estos en la muestra CuNP/QuitNP. Es así como en la imagen SEM de la **Figura 30** se pudo detectar puntos de diversos colores **(a)**, aunque se decidió quitar la identificación del carbono, debido a que su gran predominio en la imagen impedía distinguir otros colores. La distribución del carbono se representó con puntos de color rojo, los cuales cubren casi por completo la imagen **(b)**. El resto de los elementos que componen la muestra se representaron de diferente color cada uno **(c-h)**.

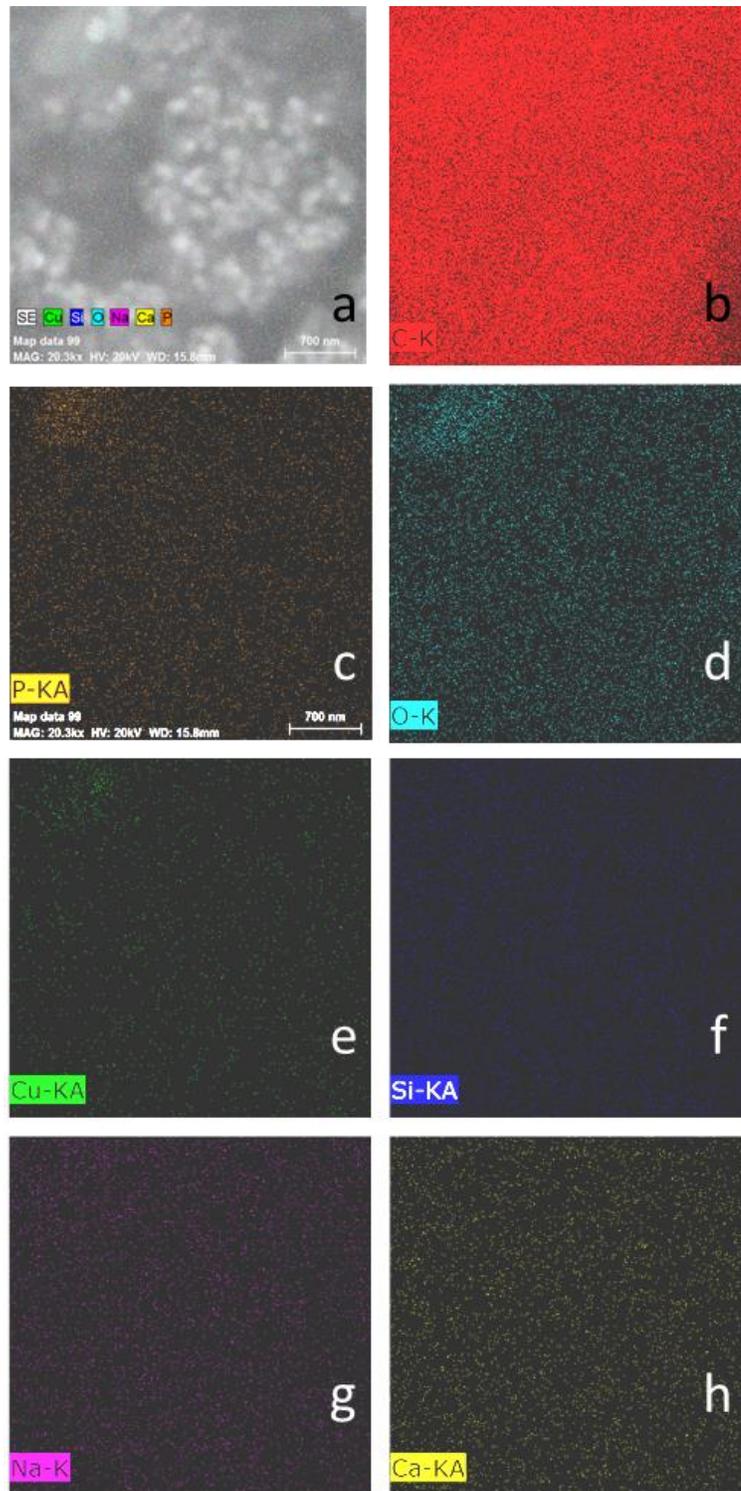


Figura 30. Micrografías SEM-MAPPING CuNP/QuitNP. a) Mapeo químico superficial CuNP/QuitNP. b) ka carbono. c) ka fosforo d) ka oxígeno. e) ka cobre. f) ka silicio. g) ka sodio. h) ka calcio.

En las micrografías SEM de la **Figura 31**, se puede ver una zona marcada con línea amarilla **(a)** en la cual se encuentran un conglomerado de CuNP/QuitNP. En el interior de esta zona se encuentra demarcada un área delineada que contiene cuatro nanopartículas **(b)**. Estas partículas se delimitan con una línea punteada y es posible observar en su interior puntos de color verde que corresponden a densidades de átomos de cobre **(c)**. Esto permite confirmar la naturaleza híbrida de las CuNP/QuitNP.

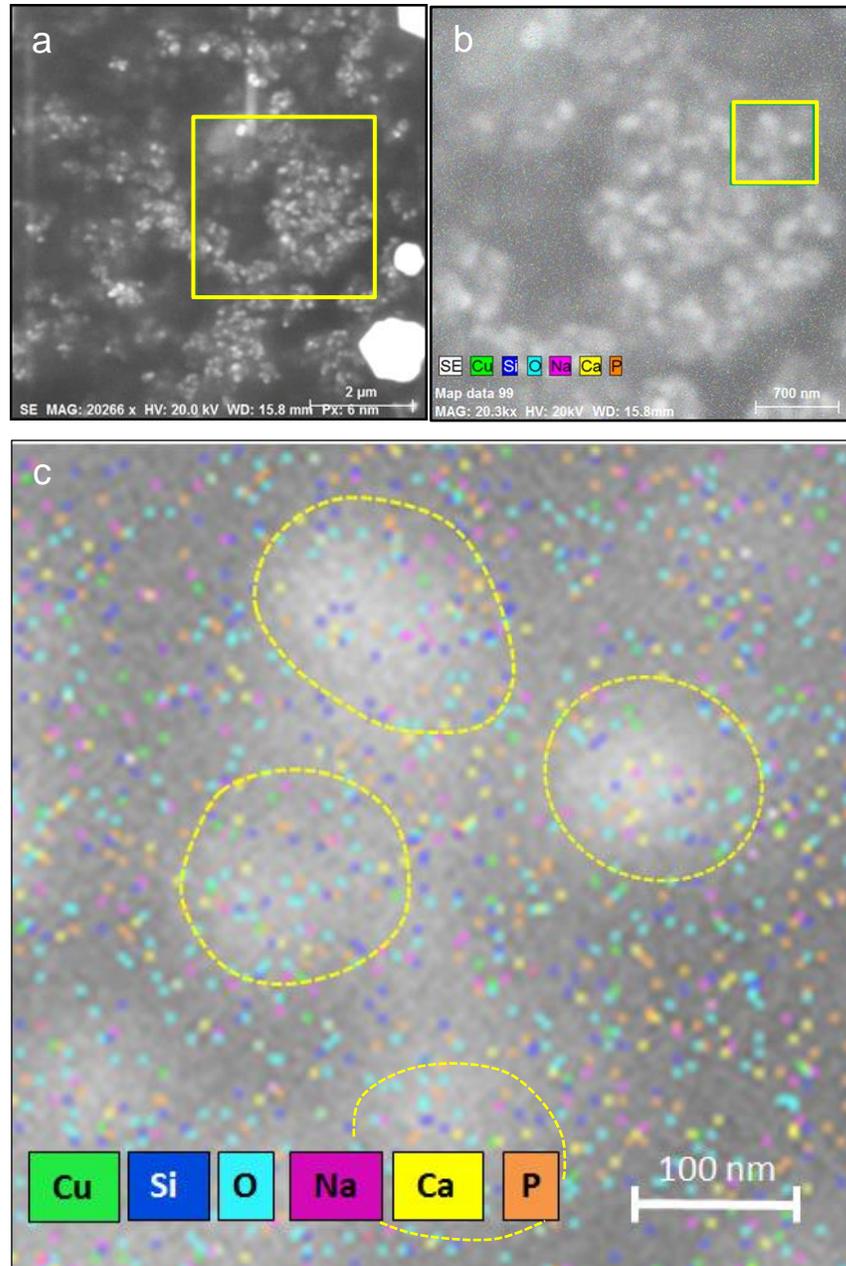


Figura 31. Mapeo químico de superficie CuNP/QuitNP.

1.2.3 Difracción rayos-X

En la **Figura 32** se muestra el patrón DRX de las CuNP c/a, QuitNP y CuNP/QuitNP. En este intervalo aparecieron señales correspondientes al cobre y al quitosano.

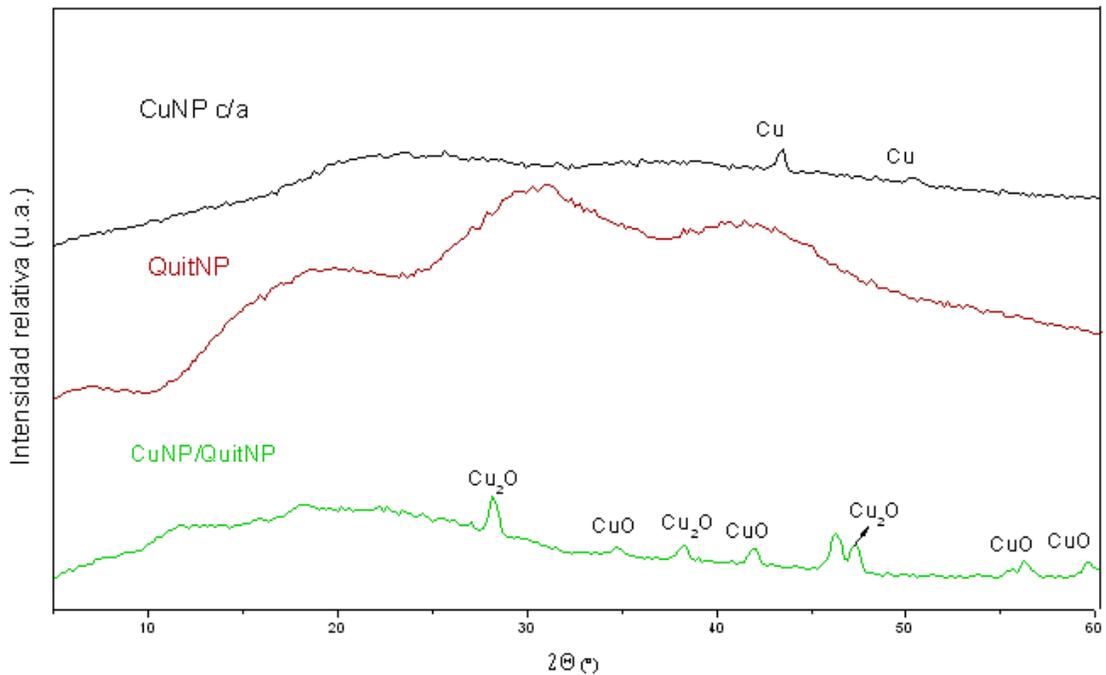


Figura 32. Análisis DRX de partículas CuNP c/a, QuitNP y CuNP/QuitNP.

En el patrón de las CuNP c/a se destaca la aparición de 2 picos característicos de las nanopartículas de cobre a $43,43^\circ$ y $50,38^\circ$ 2θ , correspondientes a los planos (111) y (200) respectivamente de la estructura cristalina del cobre metálico con estado de oxidación cero.

A partir del patrón DRX de las CuNP c/a se realizó una estimación del tamaño medio de partícula utilizando la señal con mayor intensidad (**Figura 33**) y aplicando la fórmula de Scherrer.

$$d = \frac{0.9 \lambda}{\Delta \cos \theta}$$

Ecuación 1. Formula de Scherrer

Siendo:

λ = Longitud de onda de los rayos (en este caso cobre, 0,1541 nm)

Δ = FWHM (Anchura total a la mitad de altura del pico de difracción)

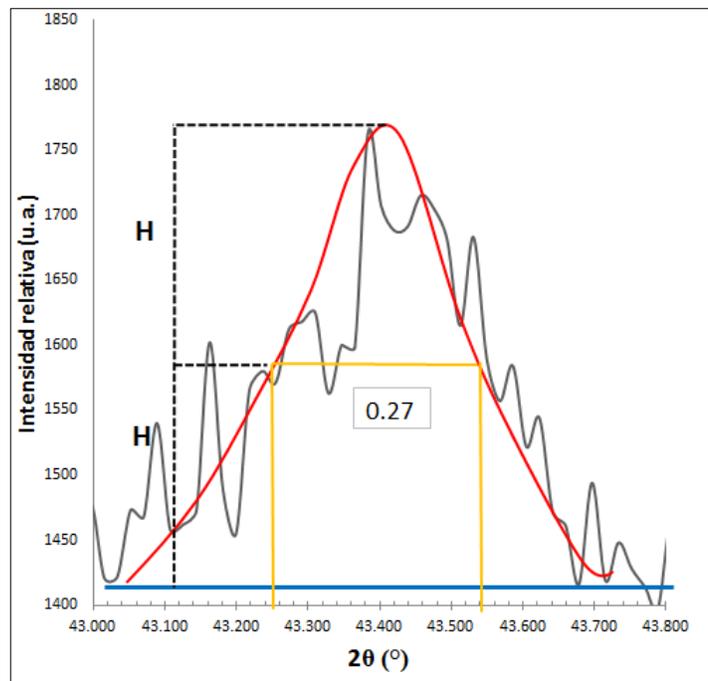


Figura 33. Determinación del parámetro FWHM (anchura total a la mitad de altura del pico máximo) para CuNP c/a

Aplicando la fórmula de Scherrer a las CuNP c/a se tiene un tamaño medio de partícula en torno a los 70 nm. Este diámetro es menor que el obtenido de las medidas de microscopía SEM.

Para el caso de las QuitNP pese a estar compuestas por un polímero con estructura semicristalina, se comportaron como una estructura amorfa. Debido a esto no fue posible encontrar picos definidos y característicos del quitosano en polvo.

Para las CuNP/QuitNP las difracciones de rayos X, no fueron posibles de refinar completamente, ya que al ser una partícula metálica recubierta por una matriz polimérica, se produce una difracción que es una mezcla de las nanopartículas metálicas del cobre y el quitosano, mostrando picos no definidos y señales amplias debido a la estructura semicristalina del polímero o provocados por estructuras cristalinas muy pequeñas para el caso de las nanopartículas metálicas (CuNP). Pese a esto como se puede apreciar en la **Figura 32** destaca la aparición de diversos picos. Entre ellos se evidenció la presencia de Cu_2O debido a los valores de 2θ en los ángulos $28,4^\circ$, $38,0^\circ$ y $47,2^\circ$ correspondiente a los planos (110), (111) y (200) respectivamente. También se encontró la presencia de CuO en los ángulos $34,4^\circ$, $42,5^\circ$, $56,1^\circ$ y $59,4^\circ$ correspondientes a los planos cristalográficos (110), (111), (200) y (202).

1.2.4 Espectroscopia infrarroja de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).

La **Figura 30** muestra el análisis FTIR-ATR para las muestras QuitNP y CuNP/QuitNP. El espectro del QuitNP presenta las bandas de absorción características de la estructura del polímero. Se puede apreciar un pico ancho de absorción en la muestra de QuitNP en los 3.258 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento del grupo $-\text{NH}_2$ y grupo $-\text{OH}$. La banda de absorción a los 2.870 cm^{-1} corresponde a la vibración de C-H. La banda de absorción a los 1.680 cm^{-1} es asignada al grupo acetamida en el quitosano de poco grado de desacetilación y la absorción a los 1580 cm^{-1} se le asigna al grupo amino libre.

Para el caso del análisis FTIR-ATR de las CuNP/QuitNP, en general se mantienen las mismas bandas, a excepción de las correspondientes a los grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$ que aparecen de menor intensidad a los 3.260 cm^{-1} .

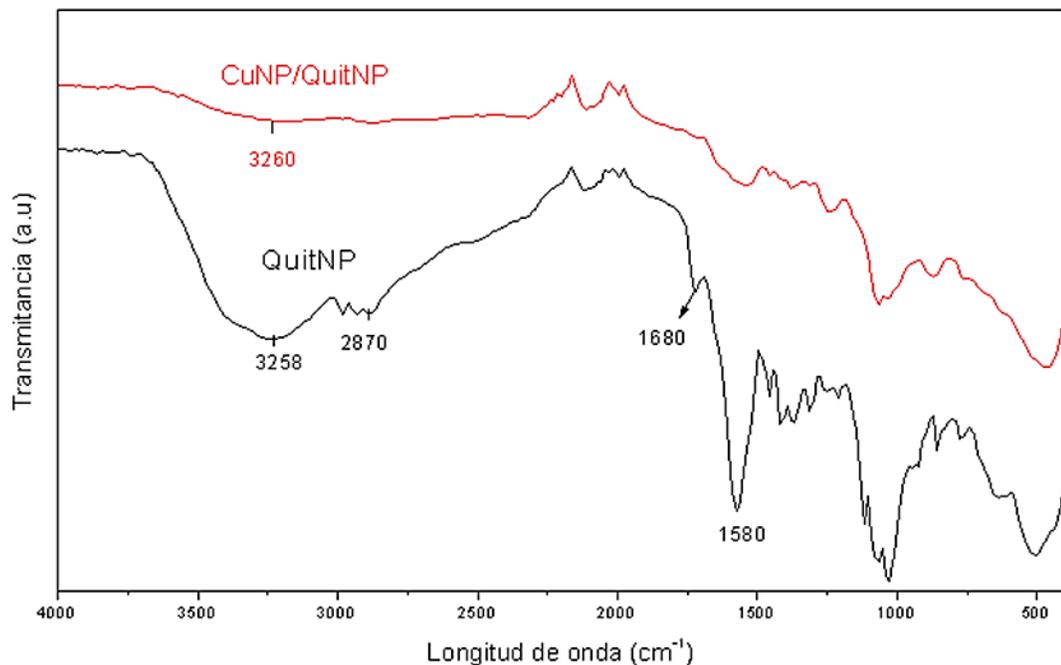


Figura 34. Análisis FTIR-ART de partículas QuitNP y CuNP/QuitNP

1.2.5 Análisis Termogravimétrico (TGA)

En la **Figura 35** se puede apreciar el TGA realizado a las QuitNP. Estas presentaron un primer evento o cambio de masa que es asociado a la descomposición del solvente en el quitosano (agua) o a cadenas de quitosano con menor peso molecular. La muestra presentó una temperatura de descomposición que comenzó a los 152,4 °C y terminó a los 197,5 °C. El segundo evento corresponde a la descomposición de la materia orgánica que se produjo en el rango de los 249,4- 318,4 °C.

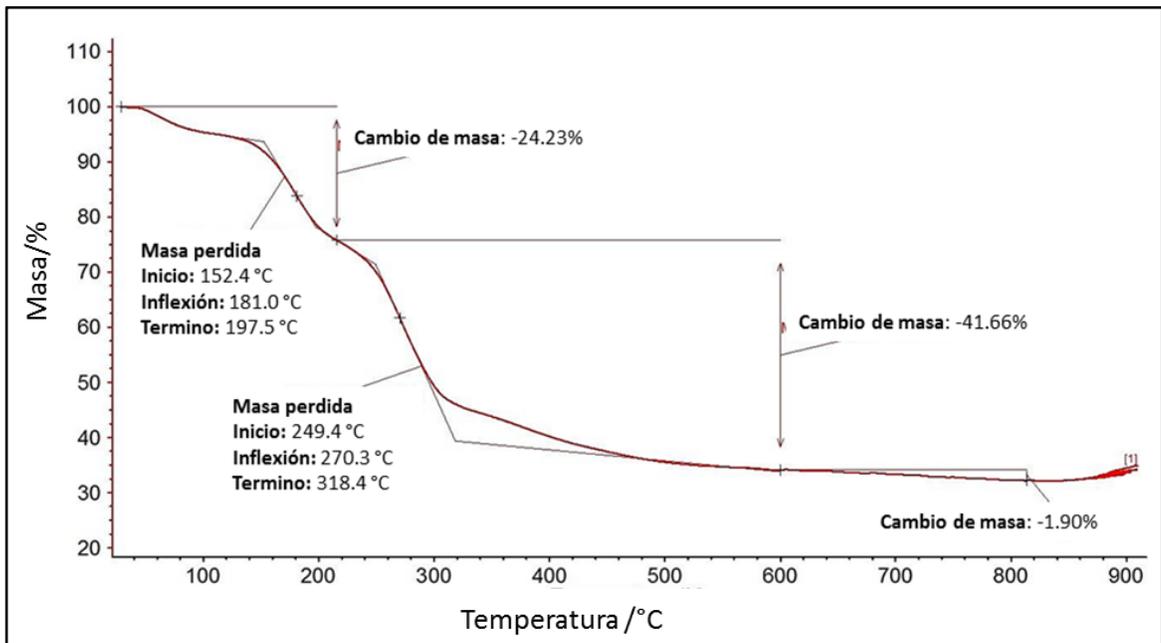


Figura 35. Análisis TGA de partículas QuitNP

En la **Figura 36** se muestra la curva termogravimétrica obtenida de las CuNP/QuitNP, la cual registró un primer evento asociado a la descomposición del solvente o cadenas de quitosano de menor peso molecular. El primer evento de descomposición ocurrió entre 213,9-280,6 °C. Un segundo evento se presentó y correspondió a la descomposición de la materia orgánica del polímero de quitosano. Esta descomposición se produjo a entre los 444,1-514 °C.

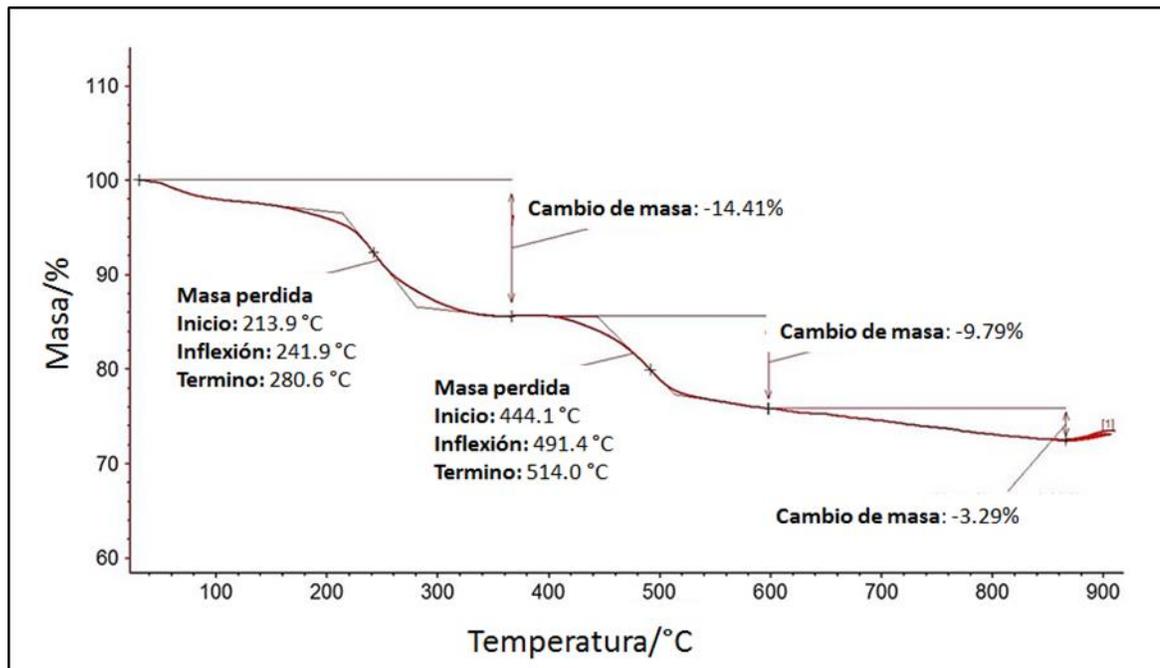


Figura 36. Análisis TGA de partículas CuNP/QuitNP

Utilizando ambas curvas gravimétricas, se puede apreciar que en la muestra QuitNP hay una pérdida total de masa correspondiente al 67,79 %. En el caso de las CuNP/QuitNP hay una pérdida total del 27,49 % de la muestra. Esto permitió determinar que el cobre presente en la partícula híbrida representa un 40,3 % de la masa total de CuNP/QuitNP.

1.3 Preparación de una suspensión basada en una mezcla física de CuNP y QuitNP (CuNP + QuitNP)

Como se puede ver en la **Figura 37**, se logró preparar una suspensión combinando CuNP c/a polvo y QuitNP polvo. Para esto se preparó una suspensión de 1.000 µg/ml mezclando 60 mg de QuitNP con 40 mg de CuNP c/a en 100 ml de agua destilada. De esta forma se obtuvo una mezcla física de ambas nanopartículas (CuNP + QuitNP) manteniendo la proporción de cobre presente en la nanopartícula híbrida.



Figura 37. Suspensión CuNP + QuitNP 1.000 µg/ml.

2. Evaluación de las propiedades bactericidas de las diferentes nanopartículas

Utilizando medio de cultivo sólido agar BHI, se logró el crecimiento de la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Una vez transcurridas 48 horas desde su incubación a 37 °C, se obtuvieron colonias aisladas del microorganismo en cuestión. Lo que permitió confirmar la pureza de la cepa mediante el análisis morfológico de las colonias y la adherencia de estas al agar. Como se puede ver en la **Figura 38**, las colonias se presentaban de forma redondeada, con un color blanquecino característico y una superficie rugosa, además se encontraban fuertemente adheridas a la superficie del agar.

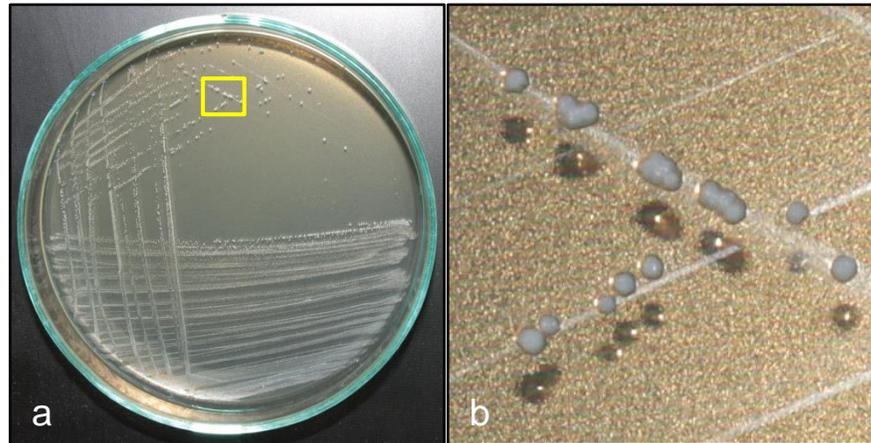


Figura 38. Placa sembrada con *S. mutans*; a) aislamiento por cuadrante. b) morfología de colonias aisladas.

En la **Figura 39** se muestra el frotis realizado a partir de una colonia de *Streptococcus mutans* teñido con Gram, el cual mostró formas cocáceas, Gram positivo y agrupadas en cadenas, característico de bacterias del grupo *Streptococci Mutans*.

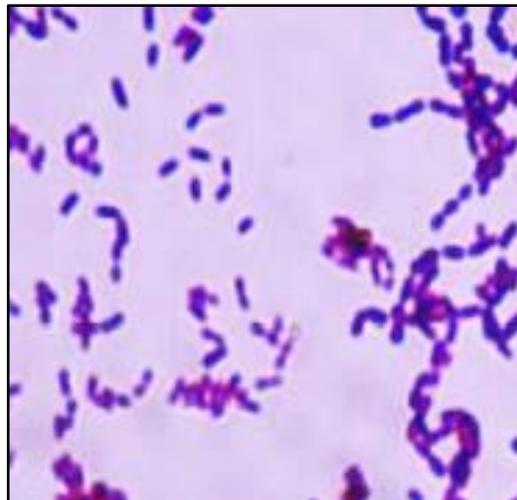


Figura 39. Tinción Gram efectuada a colonias de *Streptococcus mutans*. Se observan formas cocáceas Gram (+), dispuestas en cadenas.

2.1 Determinación de la CMI

Como se muestra en la **Figura 40**, la CMI se determinó de modo visual identificando la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo transcurridas 48 horas desde su incubación a 37°C en presencia de las distintas nanopartículas.

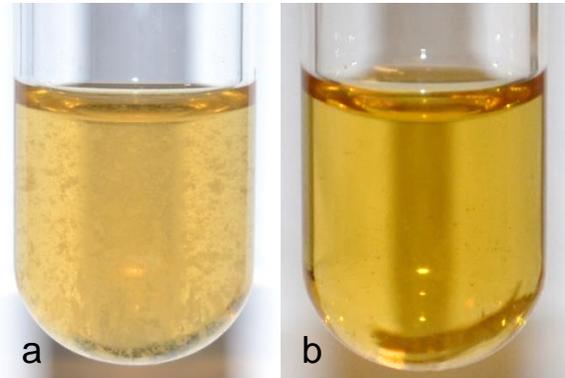


Figura 40. a) Crecimiento bacteriano, b) ausencia de crecimiento bacteriano.

Al comparar las concentraciones inhibitorias mínimas entre las 5 suspensiones de nanopartículas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un $p=0,0001$. Como se ve en la **Figura 41**, los valores para las CuNP c/a fue de 20 (10) $\mu\text{g/ml}$, para las CuNP s/a fue de 30 (5) $\mu\text{g/ml}$, para las CuNP/QuitNP fue 35 (3) $\mu\text{g/ml}$ y para las CuNP + QuitNP fue 50 (4) $\mu\text{g/ml}$ que corresponden a mediana (recorrido intercuartil). Para el caso de las QuitNP no se logró determinar la MIC a las concentraciones utilizadas. Por lo tanto las CuNP c/a lograron inhibir el crecimiento de *S. mutans* a una menor concentración en comparación al resto de las nanopartículas. Por otra parte las QuitNP no lograron inhibir el crecimiento bacteriano.

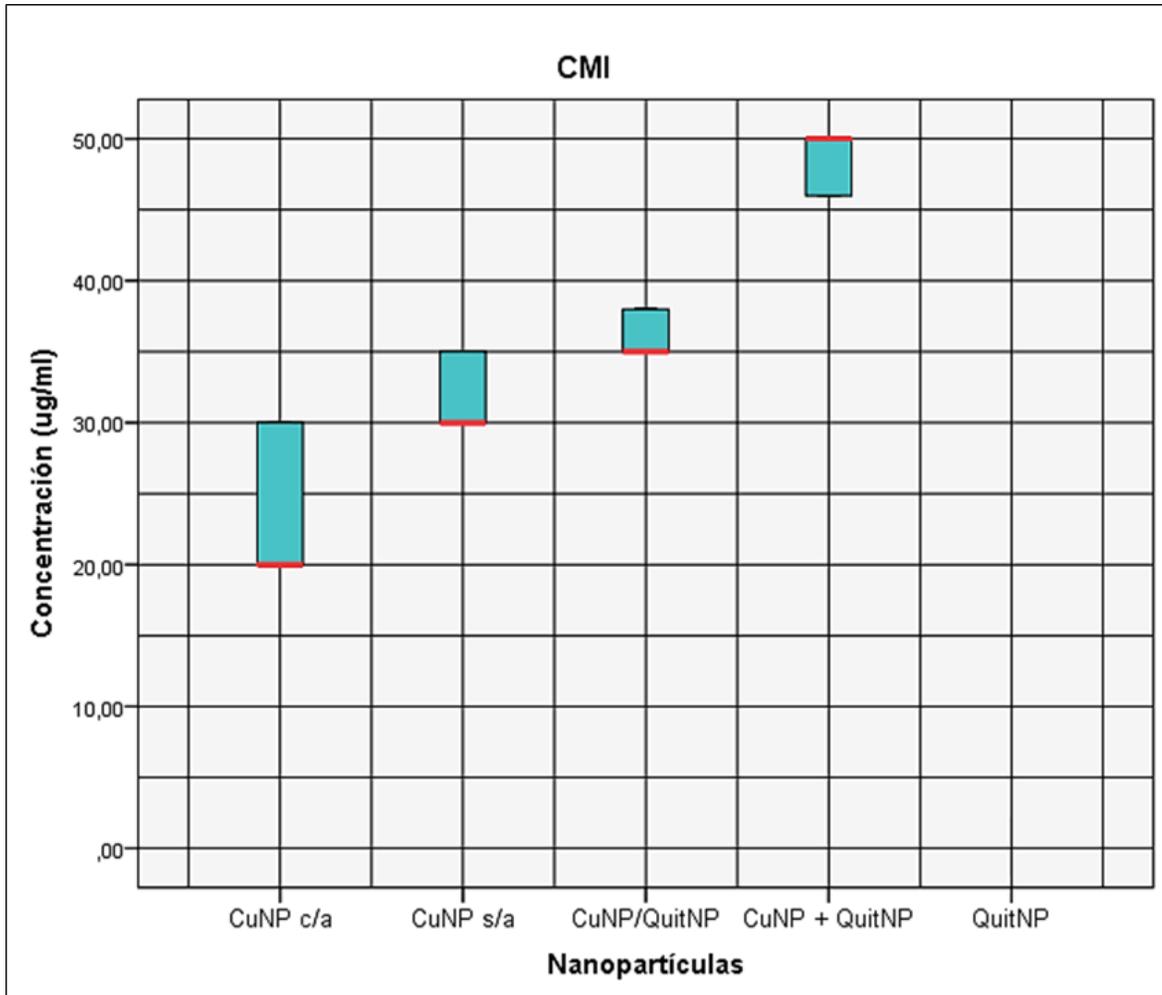


Figura 41. Concentración inhibitoria mínima de las diferentes nanopartículas. Diagrama de Caja: Línea horizontal superior de la caja (percentil 75), línea horizontal inferior de la caja (percentil 25), línea horizontal dentro de la caja de color rojo (mediana). Datos analizados mediante el test de Kruskal wallis.

2.2 Determinación de la CBM

2.2.1 Concentración bactericida mínima CuNP s/a

Al comparar las distintas concentraciones de CuNP s/a se encontró una disminución en el recuento de UFC a medida que aumentaba la concentración de nanopartículas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con un $p=0,0001$. Como se muestra en la **Figura 42**, la concentración bactericida mínima se registró a los 40 $\mu\text{g/ml}$, siendo esta la menor concentración en registrar un recuento bacteriano de 0 UFC.

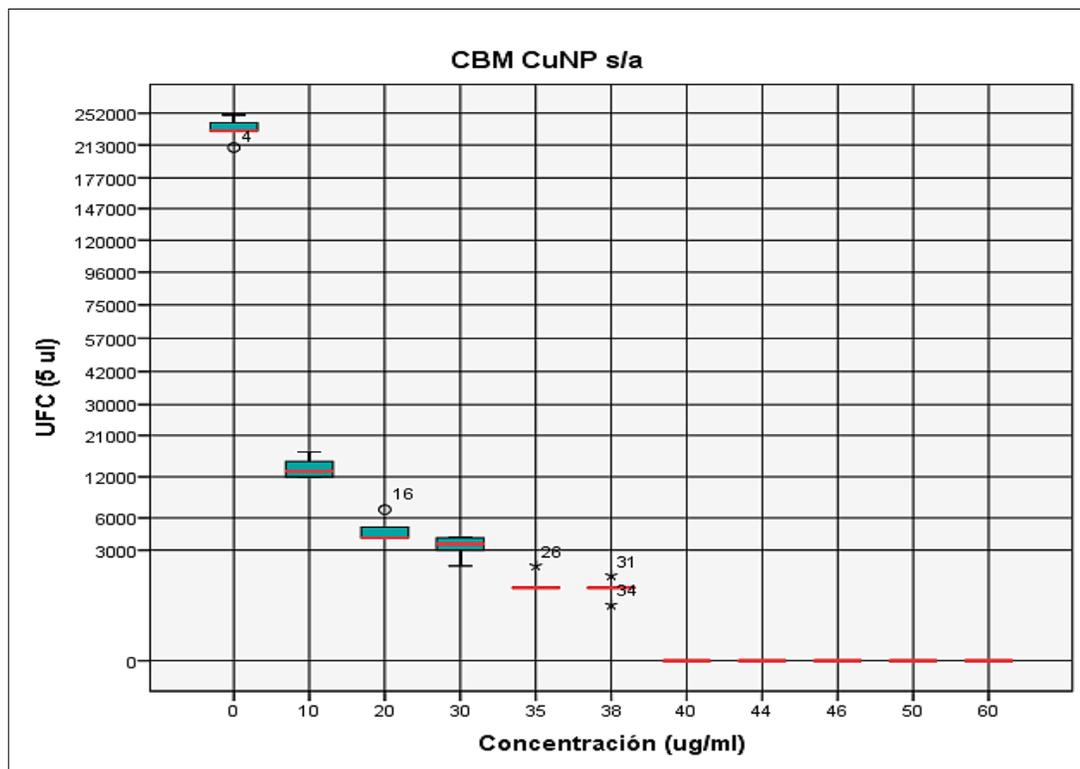


Figura 42. Concentración bactericida mínima de las CuNP s/a. Diagrama de Caja: Línea horizontal superior de la caja (percentil 75), línea horizontal inferior de la caja (percentil 25), línea horizontal dentro de la caja de color rojo (mediana), las barras de error indican los valores máximos y mínimos, los círculos representan los valores atípicos y las estrellas los valores extremos. Datos analizados mediante el test de Kruskal wallis.

En la **Figura 43** se muestran las placas de Petri con el recuento de unidades formadoras de colonias para las CuNP s/a. Se puede ver que el crecimiento bacteriano se detiene a los 40 $\mu\text{g/ml}$.

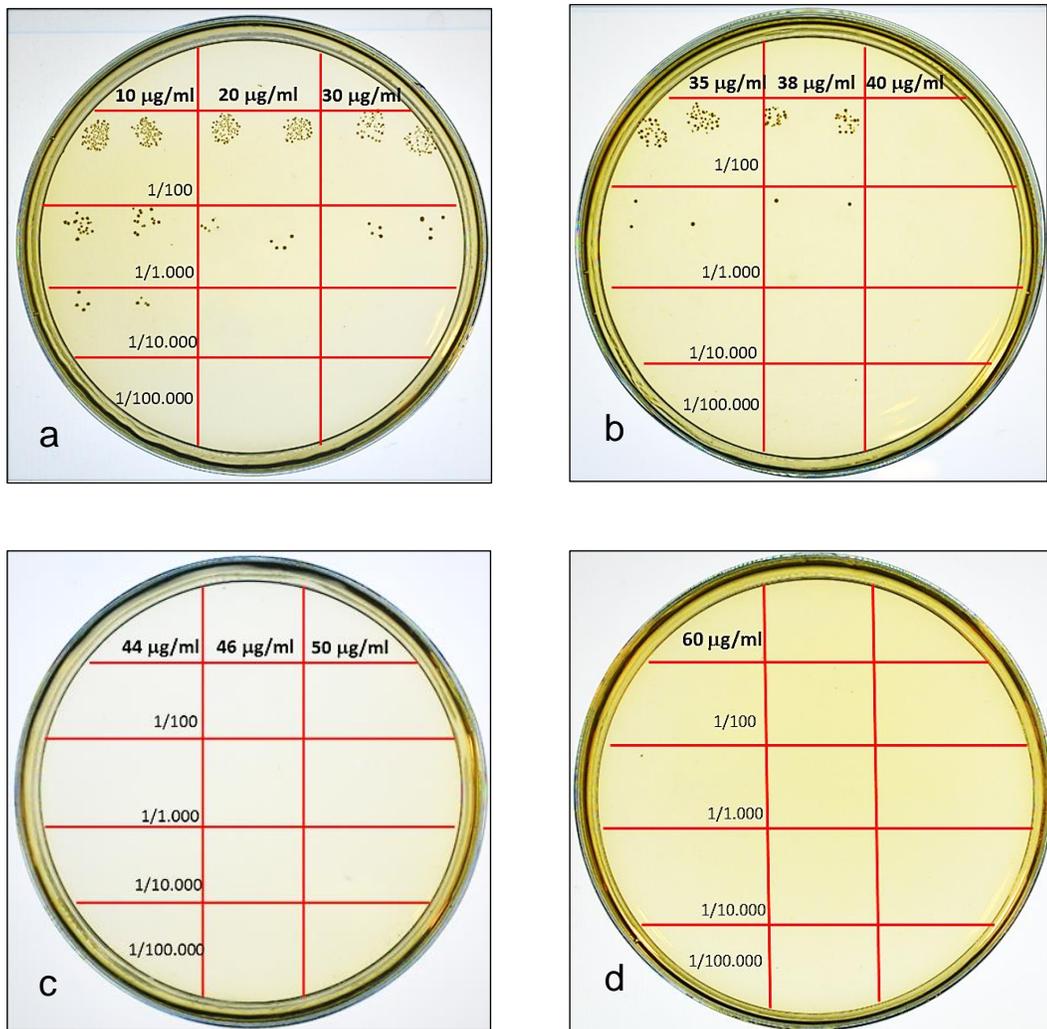


Figura 43. Recuento bacteriano para las CuNP s/a. a) concentraciones 10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$. b) concentraciones 35, 38 y 40 $\mu\text{g/ml}$. c) concentraciones 44, 46 y 50 $\mu\text{g/ml}$. d) concentración 60 $\mu\text{g/ml}$.

2.2.2 Concentración bactericida mínima CuNP c/a

Al comparar las distintas concentraciones de CuNP c/a se encontró una diferencia estadísticamente significativa con un $p=0,0001$. Como se muestra en la **Figura 44**, la concentración bactericida mínima se registró a los 30 $\mu\text{g/ml}$, siendo esta la menor concentración en registrar un recuento bacteriano de 0 UFC.

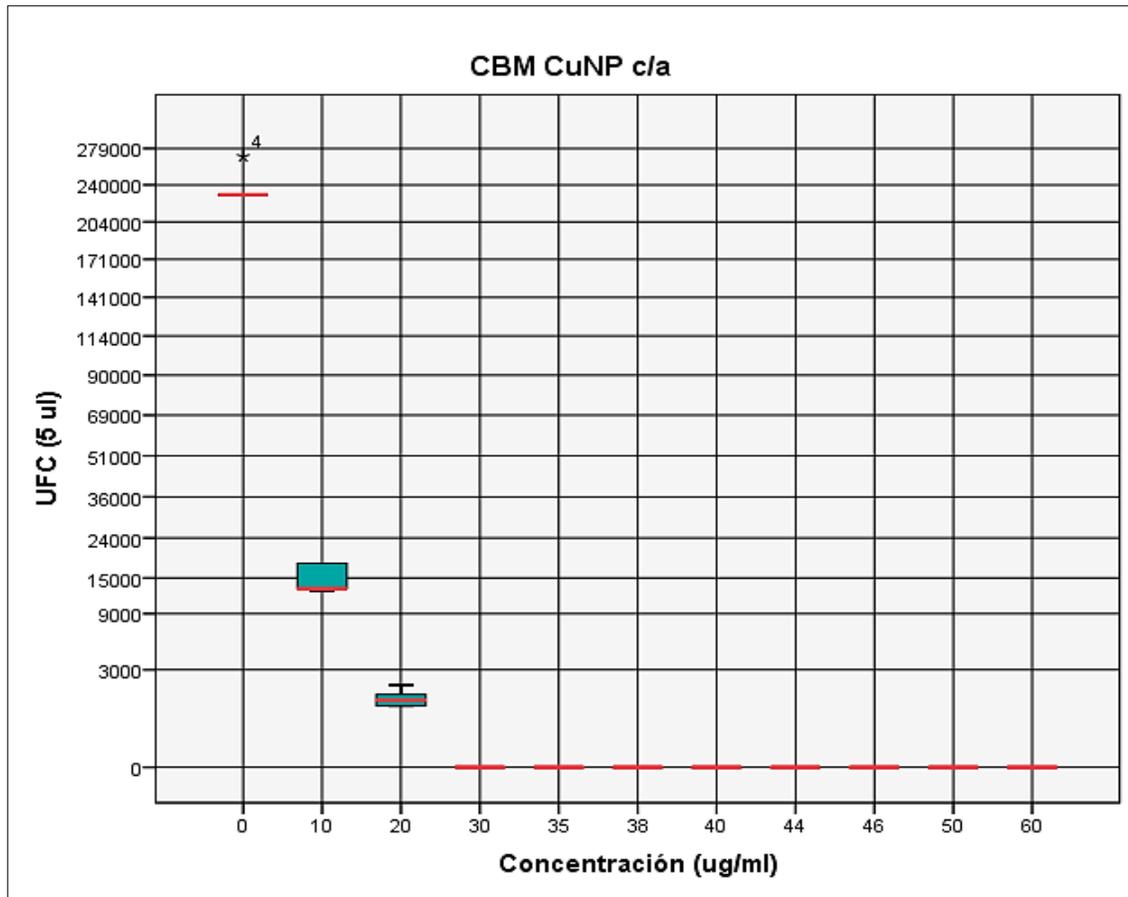


Figura 44. Concentración bactericida mínima de las CuNP c/a. Diagrama de Caja: Línea horizontal superior de la caja (percentil 75), línea horizontal inferior de la caja (percentil 25), línea horizontal dentro de la caja de color rojo (mediana), las barras de error indican los valores máximos y mínimos, las estrellas representan los valores extremos. Datos analizados mediante el test de Kruskal wallis.

En la **Figura 45** se muestran las placas de Petri con el recuento de unidades formadoras de colonias para las CuNP c/a. Se puede ver que el crecimiento bacteriano se detiene a los 30 $\mu\text{g/ml}$.

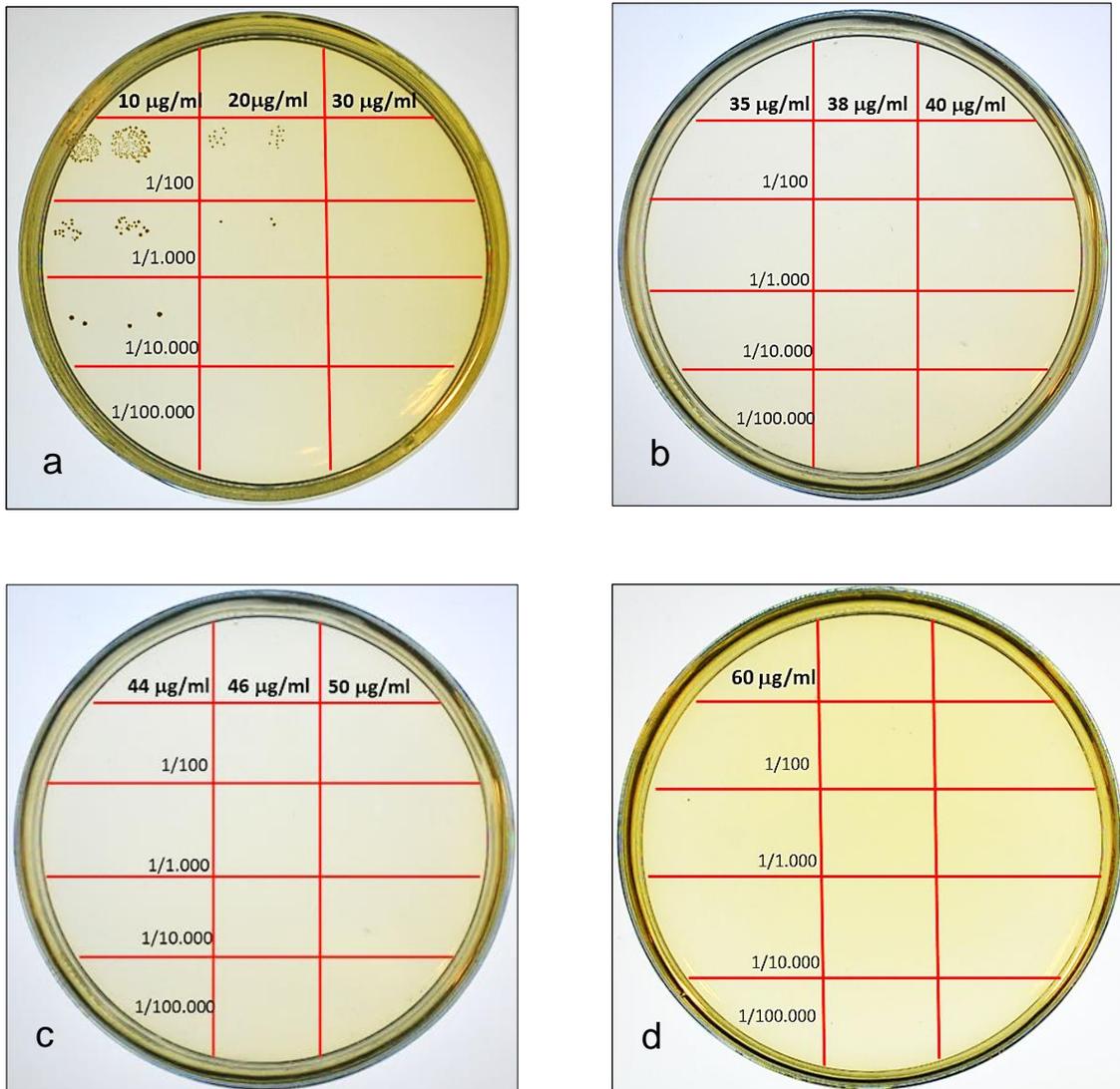


Figura 45. Recuento bacteriano para las CuNP c/a. a) concentraciones 10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$. b) concentraciones 35, 38 y 40 $\mu\text{g/ml}$. c) concentraciones 44, 46 y 50 $\mu\text{g/ml}$. d) concentración 60 $\mu\text{g/ml}$.

2.2.3 Concentración bactericida mínima CuNP/QuitNP

Al comparar las distintas concentraciones de CuNP/QuitNP se encontró una diferencia estadísticamente significativa con un $p=0,0001$. Como se muestra en la **Figura 46**, la concentración bactericida mínima se registró a los 60 $\mu\text{g/ml}$, siendo esta la menor concentración en registrar un recuento bacteriano de 0 UFC.

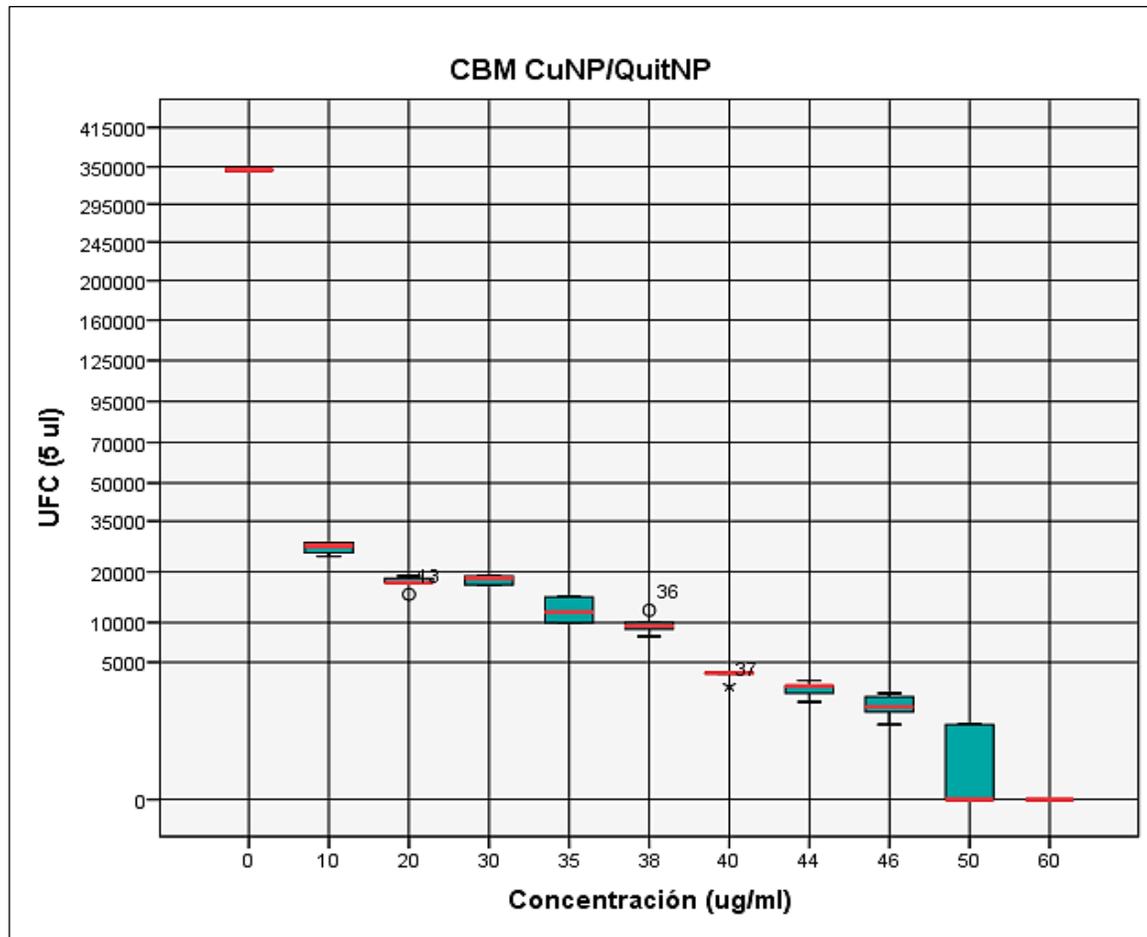


Figura 46. Concentración bactericida mínima de las CuNP/QuitNP. Diagrama de Caja: Línea horizontal superior de la caja (percentil 75), línea horizontal inferior de la caja (percentil 25), línea horizontal dentro de la caja de color rojo (mediana), las barras de error indican los valores máximos y mínimos, los círculos representan los valores atípicos y las estrellas los valores extremos. Datos analizados mediante el test de Kruskal wallis.

En la **Figura 47** se muestran las placas de Petri con el recuento de unidades formadoras de colonias para las CuNP/QuitNP. Se puede ver que el crecimiento bacteriano se detiene a los 60 $\mu\text{g/ml}$.

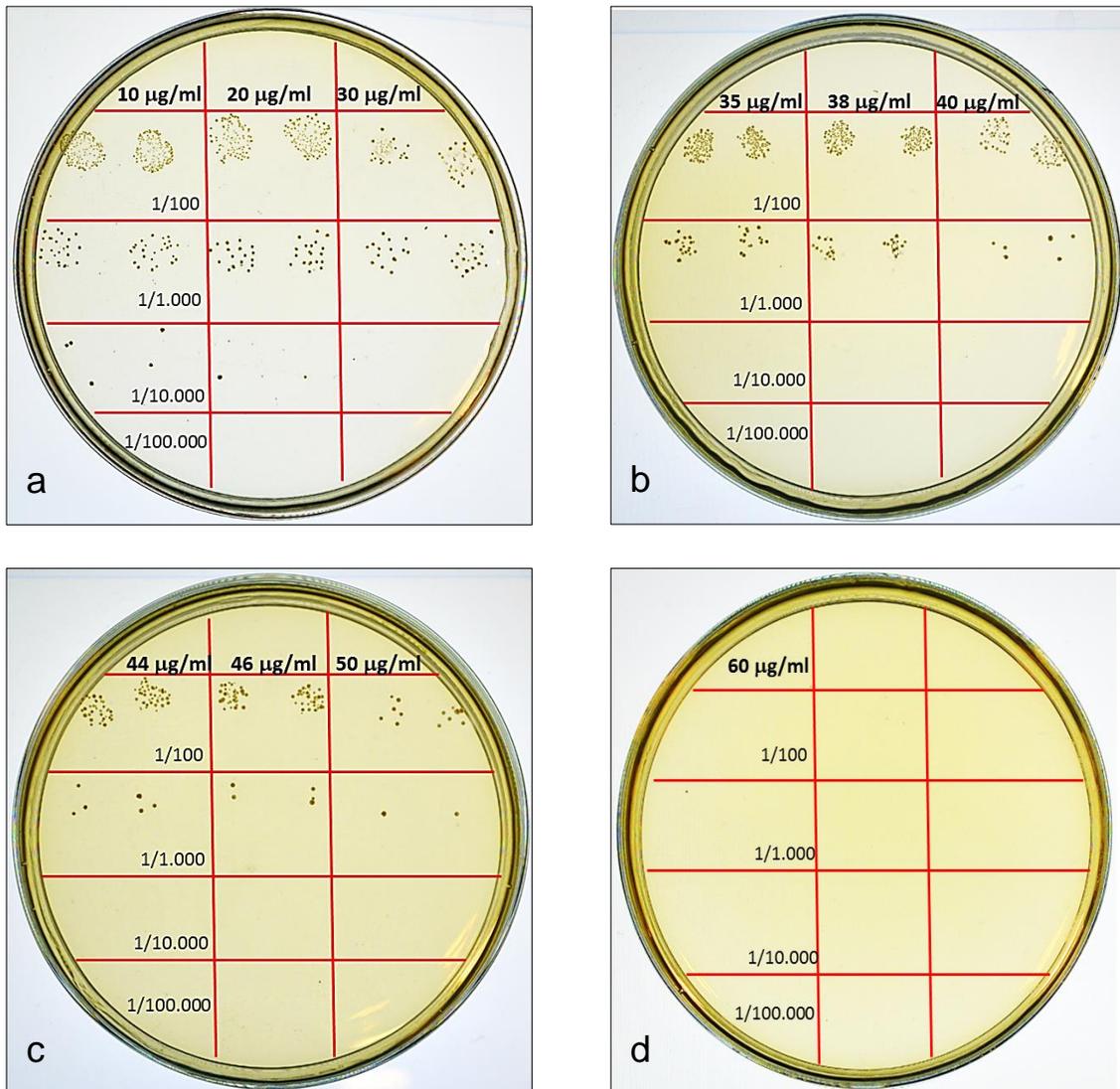


Figura 47. Recuento bacteriano para las CuNP/QuitNP. a) Concentraciones 10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$. b) concentraciones 35, 38 y 40 $\mu\text{g/ml}$. c) concentraciones 44, 46 y 50 $\mu\text{g/ml}$. d) concentración 60 $\mu\text{g/ml}$.

2.2.4 Concentración bactericida mínima CuNP + QuitNP

Al comparar las distintas diluciones de CuNP + QuitNP se encontró una diferencia estadísticamente significativa con un $p=0,0001$. Como se muestra en la **Figura 48**, no se logró definir la concentración bactericida mínima para las CuNP + QuitNP, ya que a 60 $\mu\text{g/ml}$ (mayor concentración utilizada) se registró un recuento de 9.000 (1.000) UFC.

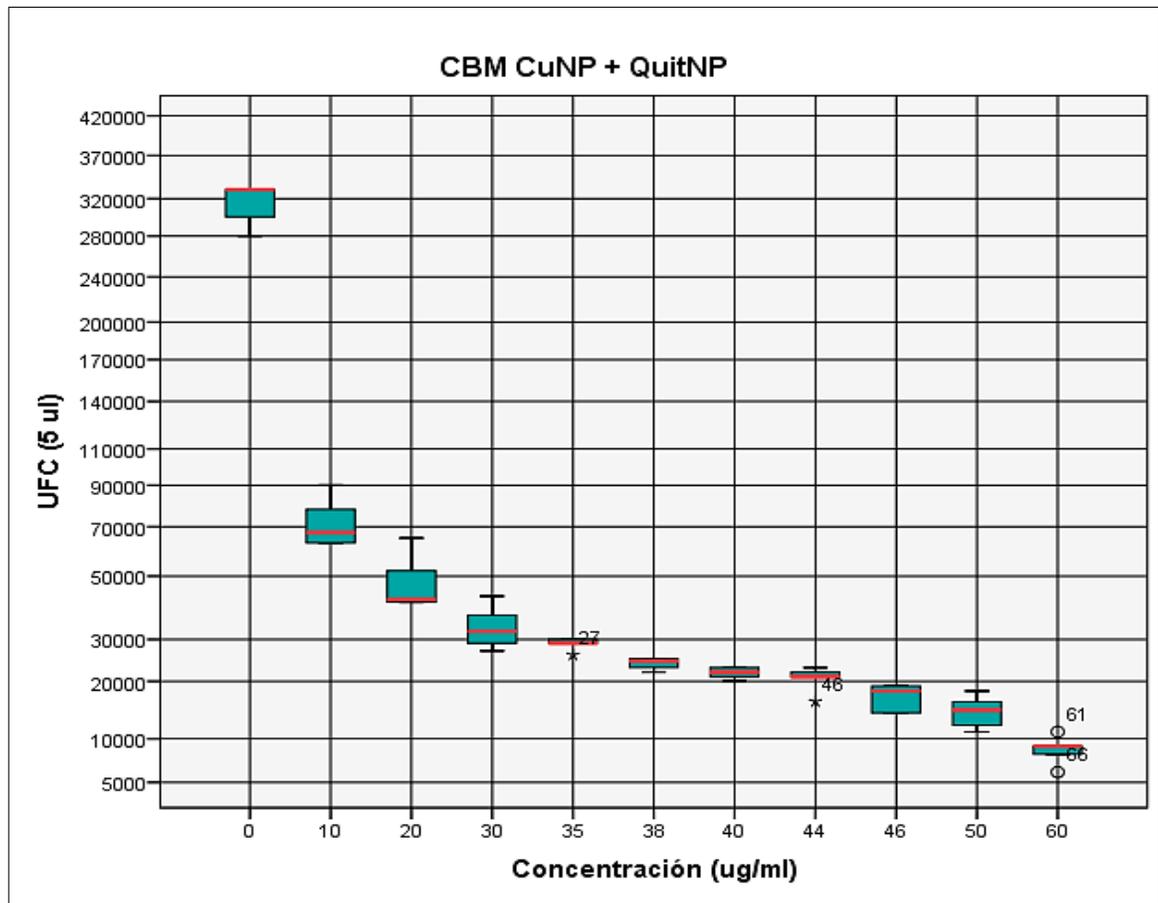


Figura 48. Concentración bactericida mínima de las CuNP + QuitNP. Diagrama de Caja: Línea horizontal superior de la caja (percentil 75), línea horizontal inferior de la caja (percentil 25), línea horizontal dentro de la caja de color rojo (mediana), las barras de error indican los valores máximos y mínimos, los círculos representan los valores atípicos y las estrellas los valores extremos. Datos analizados mediante el test de Kruskal wallis.

En la **Figura 49** se muestran las placas de Petri con el recuento de unidades formadoras de colonias para las CuNP + QuitNP. Se puede ver que el crecimiento bacteriano se produjo en todas las concentraciones utilizadas.

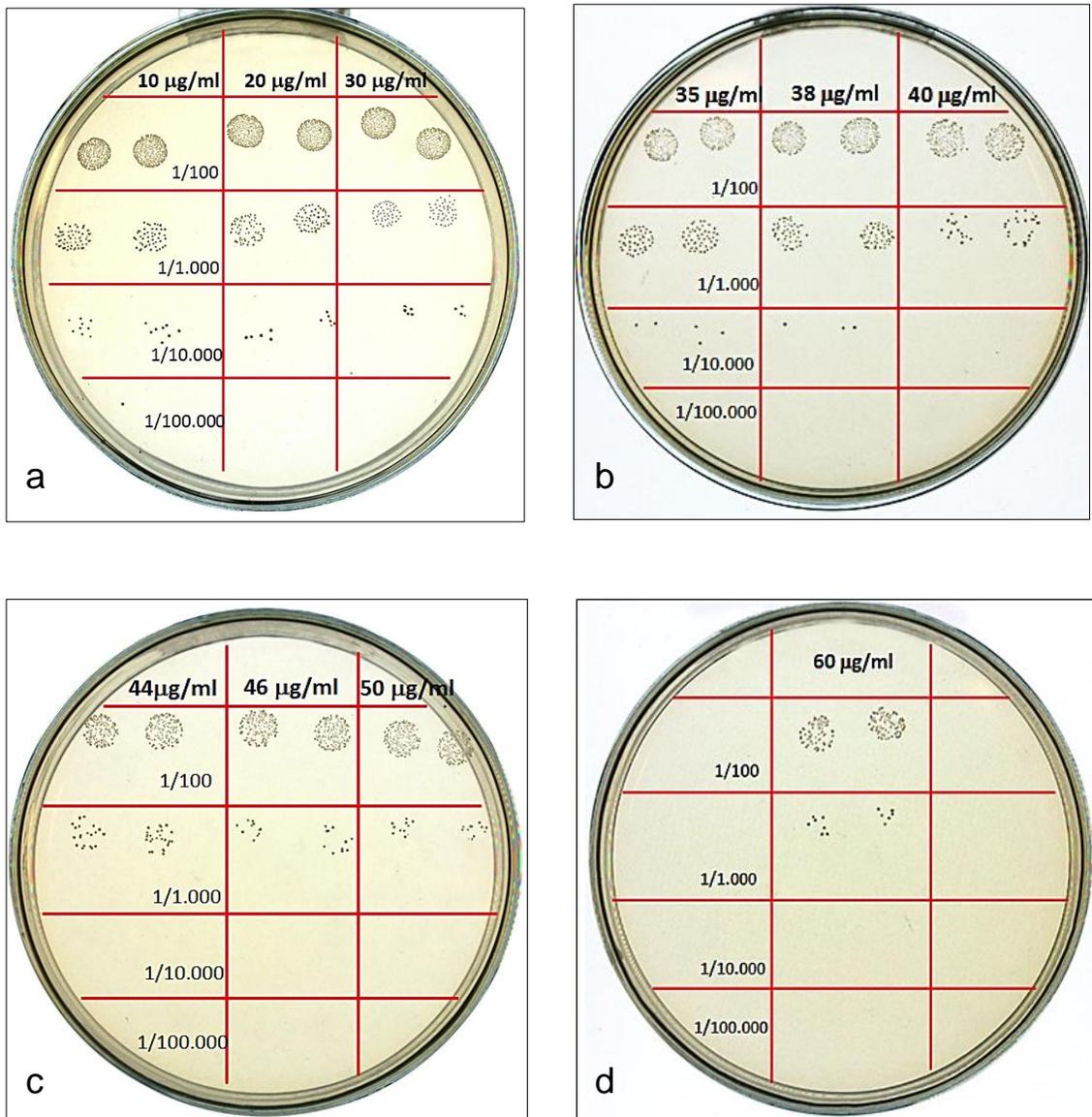


Figura 49. Recuento bacteriano para las CuNP + QuitNP. a) Concentraciones 10, 20 y 30 µg/ml. b) concentraciones 35, 38 y 40 µg/ml. c) concentraciones 44, 46 y 50 µg/ml. d) concentración 60 µg/ml.

2.2.5 Concentración bactericida mínima QuitNP

Al comparar las distintas concentraciones de las QuitNP se encontró una diferencia estadísticamente significativa con un $p=0,0001$. Como se muestra en la **Figura 50**, no se logró definir la concentración bactericida mínima para las QuitNP, ya que a 60 $\mu\text{g/ml}$ (mayor concentración utilizada) se registró un recuento de 50.000 (5.000) UFC, valores que corresponden a mediana (recorrido intercuartil).

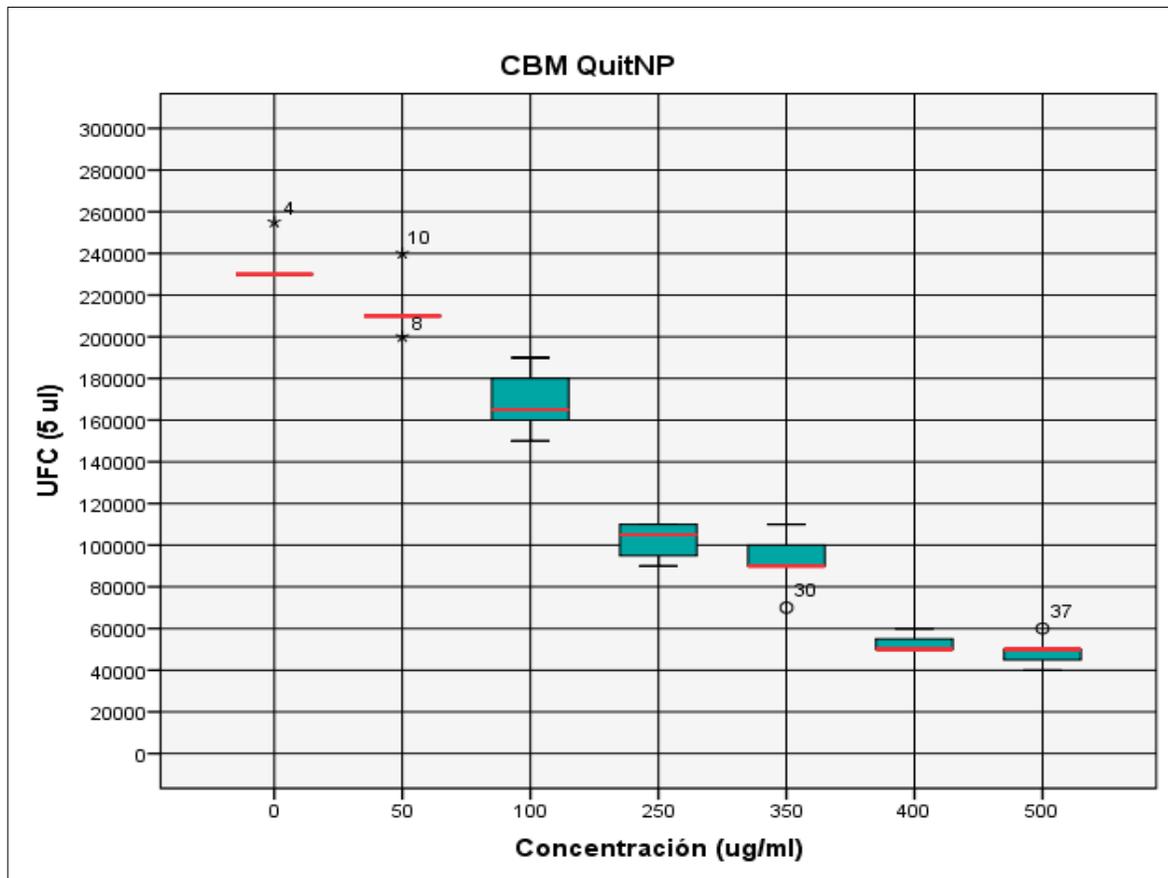


Figura 50. Concentración bactericida mínima de las QuitNP. Diagrama de Caja: Línea horizontal superior de la caja (percentil 75), línea horizontal inferior de la caja (percentil 25), línea horizontal dentro de la caja de color rojo (mediana), las barras de error indican los valores máximos y mínimos, los círculos representan los valores atípicos y las estrellas los valores extremos. Datos analizados mediante el test de Kruskal wallis.

En la **Figura 51** se muestran las placas de Petri con el recuento de unidades formadoras de colonias para las QuitNP. Se puede ver que el crecimiento bacteriano se produjo en todas las concentraciones utilizadas.

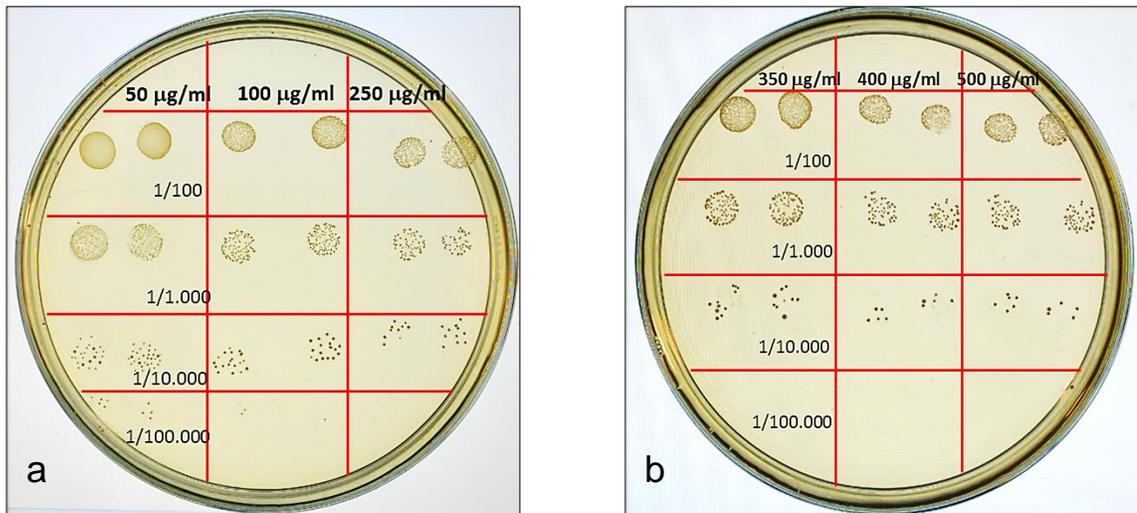


Figura 51. Recuento bacteriano para las QuitNP. a) Concentraciones 50, 100 y 250 µg/ml. b) concentraciones 350, 400 y 500 µg/ml.

2.3 Evaluación de la capacidad antibacteriana de una superficie dentaria tratada con las nanopartículas

Al comparar las distintas muestras utilizadas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas al recuento de UFC, con un $p=0,0001$. Como se muestra en la **Figura 52**, las muestras que presentaron el menor recuento de UFC fueron la clorhexidina 0,12% y el cloruro de cetilpiridinio 0,07%. De las suspensiones de nanopartículas utilizadas, las que contenían quitosano en su composición fueron las que presentaron un menor recuento de UFC, siendo la partícula híbrida la que redujo en mayor grado la cantidad de colonias sobre la superficie dentaria. En la **Tabla 2** se muestran los resultados de los recuentos bacterianos obtenidos para cada muestra en la evaluación de la capacidad antibacteriana de una superficie dentaria tratada con las nanopartículas

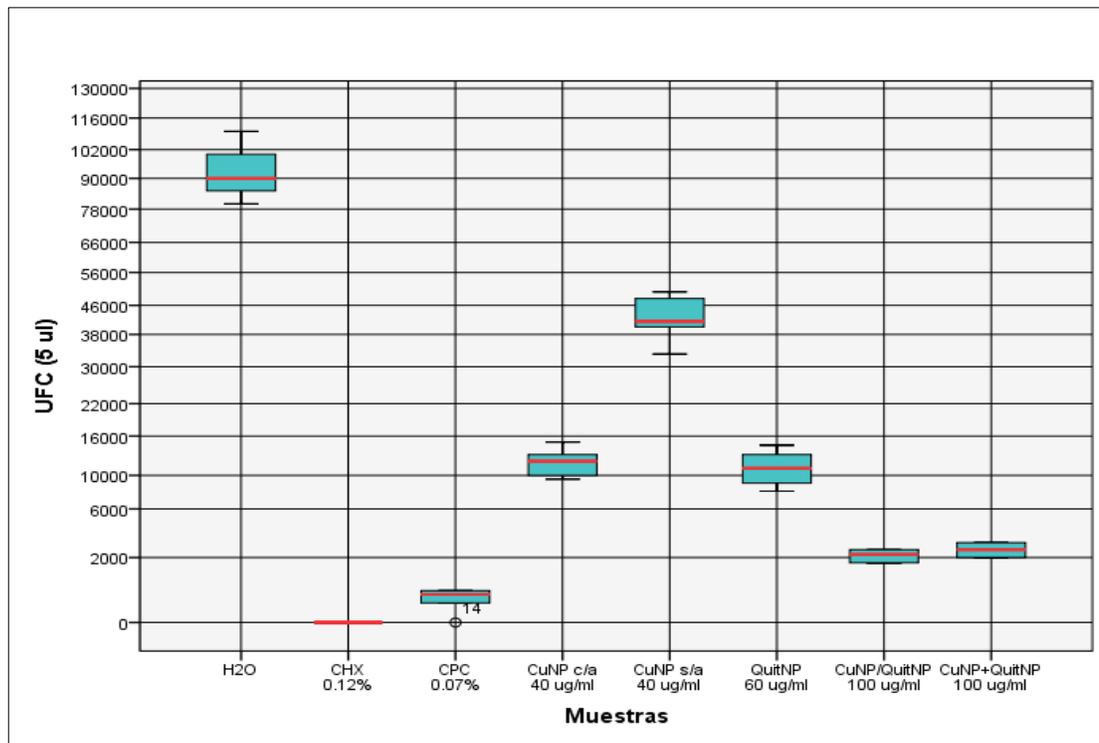


Figura 52. Evaluación de la capacidad antibacteriana de una superficie dentaria tratada con las nanopartículas. Diagrama de Caja: Línea horizontal superior de la caja (percentil 75), línea horizontal inferior de la caja (percentil 25), línea horizontal dentro de la caja de color rojo (mediana), las barras de error indican los valores máximos y mínimos. Datos analizados mediante el test de Kruskal wallis.

Tabla 2. Resultado de los recuentos bacterianos obtenidos para cada muestra en la evaluación de la capacidad antibacteriana de una superficie dentaria tratada con las nanopartículas

Muestra	Concentración (µg/ml)	Mediana UFC (5 µl)	Recorrido intercuartil UFC (5 µl)
H₂O	-	90.000	15.000
CHX	1.200 (0,12%)	0	0
CPC	700 (0,07%)	400	300
CuNP c/a	40	12.000	3.000
CuNP s/a	40	41.500	8.000
QuitNP	60	11.000	4.000
CuNP/QuitNP	100	2.200	800
CuNP + QuitNP	100	2.500	500

En la **Figura 53** se muestran las placas de Petri con el recuento de unidades formadoras de colonias para las distintas muestras utilizadas.

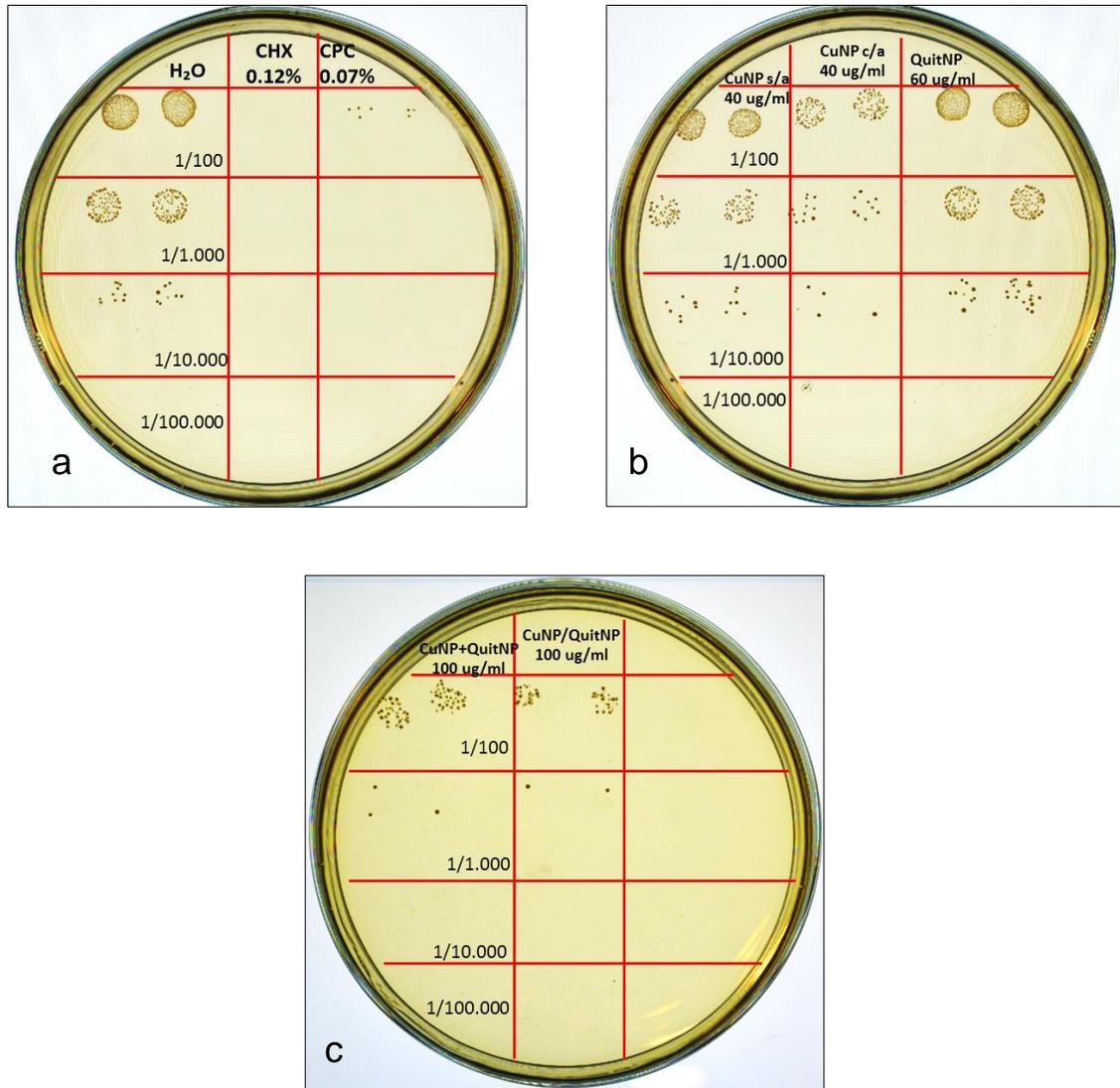


Figura 53. Recuento bacteriano para las distintas soluciones antimicrobianas y suspensiones de nanopartículas utilizadas en el ensayo sobre una superficie dental tratada con nanopartículas. a) agua (H₂O) clorhexidina 0,12% (CHX), cloruro de cetilpiridinio 0,07% (CPC). b) CuNP c/a 40 µg/ml, CuNP s/a 40 µg/ml, QuitNP 60 µg/ml. c) CuNP/QuitNP 100 µg/ml, CuNP + QuitNP 100 µg/ml.

2.4 Evaluación de la capacidad antibacteriana de las nanopartículas frente a un biofilm formado en la superficie dentaria

Al comparar las distintas muestras utilizadas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas al recuento de UFC, con un $p=0,0001$. Como se muestra en la **Figura 54**, las muestras que presentaron el menor recuento de UFC fueron la clorhexidina 0,12% y el cloruro de cetilpiridinio 0,07%. De las suspensiones de nanopartículas utilizadas, las que contenían quitosano en su composición fueron las que presentaron un menor recuento de UFC, siendo la partícula híbrida la que redujo en mayor grado la cantidad de bacterias. En la **Tabla 3** se muestran los resultados de los recuentos bacterianos obtenidos para cada muestra en la evaluación de la capacidad antibacteriana de una superficie dentaria tratada con las nanopartículas

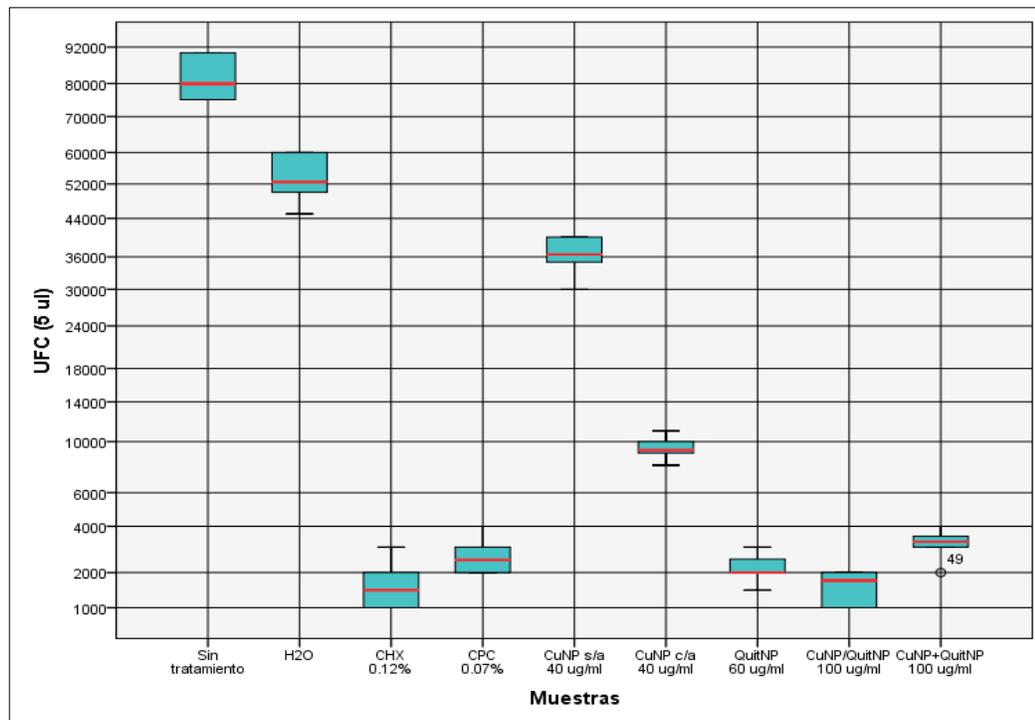


Figura 54. Evaluación de las propiedades antibacterianas de una superficie dentaria tratada con las nanopartículas. Diagrama de Caja: Línea horizontal superior de la caja (percentil 75), línea horizontal inferior de la caja (percentil 25), línea horizontal dentro de la caja de color rojo (mediana), las barras de error indican los valores máximos y mínimos, los círculos representan los valores atípicos y las estrellas los valores extremos; test de Kruskal Wallis

Tabla 3. Resultados de los recuentos bacterianos obtenidos para cada muestra en el ensayo de la capacidad antibacteriana de las suspensiones de nanopartículas frente a un biofilm formado sobre la superficie dentaria.

Muestra	Concentración (µg/ml)	Mediana UFC (5 µl)	Recorrido intercuartil UFC(5 µl)
Sin tratamiento	-	80.000	15.000
H₂O	-	52.500	10.000
CHX	1.200 (0,12%)	1.500	1.000
CPC	700 (0,07%)	2.500	1.000
CuNP s/a	40	36.500	5.000
CuNP c/a	40	9.200	1.000
QuitNP	60	2.000	500
CuNP/QuitNP	100	1.750	1.000
CuNP + QuitNP	100	3.250	500

En la **Figura 55** se muestran las placas de Petri con el recuento de unidades formadoras de colonias para las distintas muestras utilizadas.

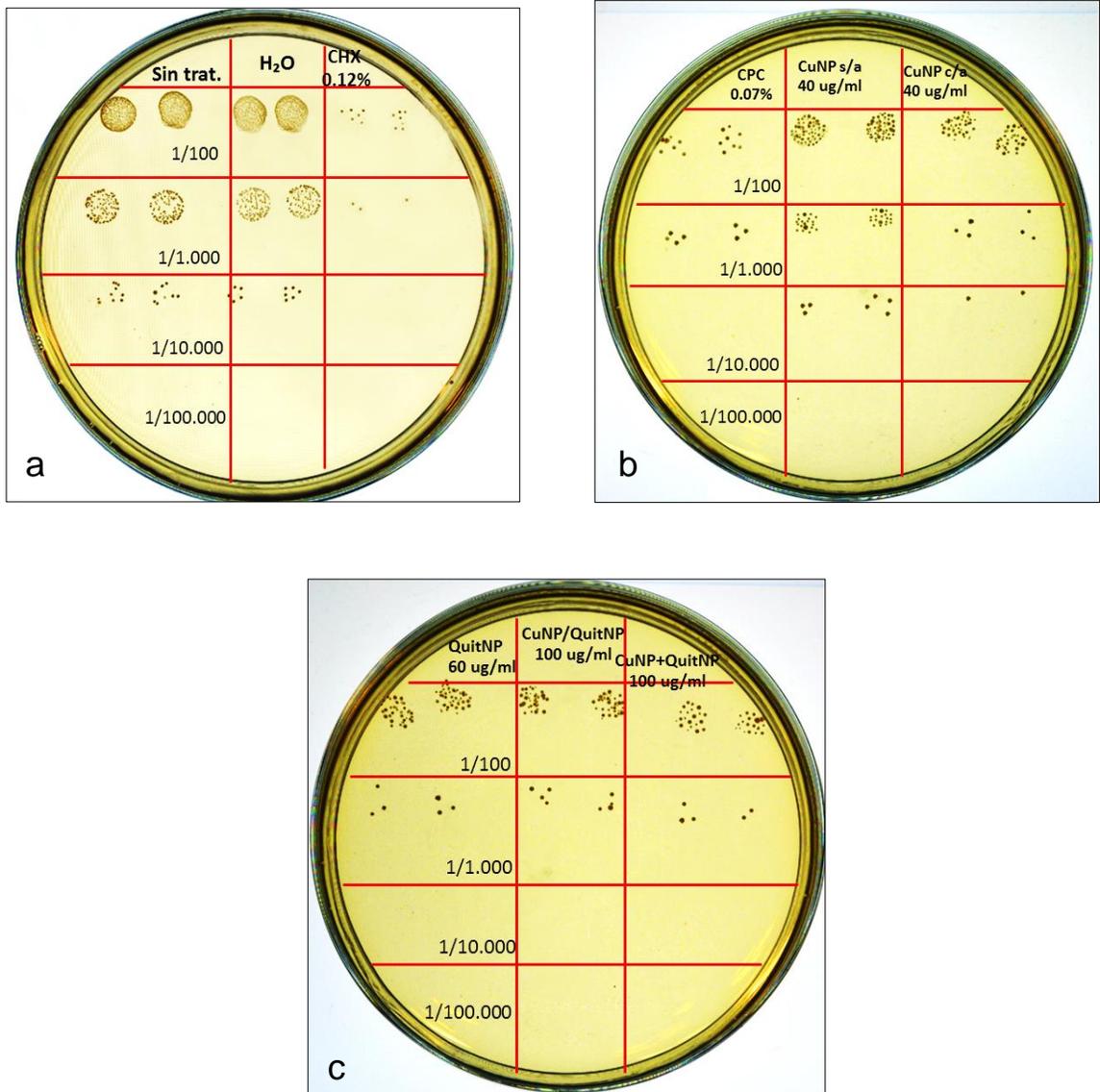


Figura 55. Recuento bacteriano para las distintas soluciones y suspensiones de nanopartículas utilizadas en el ensayo de la capacidad antibacteriana de las suspensiones de nanopartículas frente a un biofilm formado en la superficie dentaria. a) Sin tratamiento, H₂O, CHX 0,12%, b) CPC 0,07%, CuNP c/a 40 µg/ml, CuNP s/a 40 µg/ml, c) QuitNP 60 µg/ml, CuNP/QuitNP 100 µg/ml, CuNP + QuitNP 100 µg/ml.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se sintetizaron suspensiones de nanopartículas de cobre y quitosano a diversas concentraciones. Se logró realizar una correcta síntesis y caracterización de las nanopartículas, y la determinación de su CIM y CBM frente al patógeno *Streptococcus mutans*. Además se realizaron pruebas preliminares de actividad bactericida sobre piezas dentales, con el objetivo de analizar el comportamiento de estas suspensiones sobre un biofilm de *S. mutans* formado en una superficie dentaria.

La síntesis de CuNP c/a mediante el empleo de agentes reductores biocompatibles como almidón y ácido ascórbico, permitieron la obtención de las nanopartículas, mejorar la estabilidad de sus suspensiones y disminuir su tamaño. En el caso de las CuNP s/a al ser sintetizadas sin almidón (agente estabilizante), presentaron un tamaño considerablemente mayor al de las CuNP c/a; ya que el proceso de nucleación ocurrió de forma ininterrumpida. Esto se determinó mediante la caracterización de las nanopartículas, ya que los resultados obtenidos de los análisis SEM mostraron que las CuNP c/a presentaban una morfología ovalada a esférica, y un tamaño promedio de 100 ± 20 nm. Por otro lado, las CuNP s/a al análisis SEM presentaron una morfología variable, con formas redondeadas a hexagonales y un tamaño promedio de 520 ± 80 nm. Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los de otros autores que no se basan en el concepto de química verde, y que utilizan agentes reductores altamente tóxicos como es el caso de la hidracina, se puede ver que logran la obtención de nanopartículas mucho más pequeñas con un tamaño de hasta 6 nm (Zhu H Y cols., 2005). El carácter nanométrico de las CuNP c/a se ratificó mediante espectrofotometría debido a la obtención del plasmón de resonancia superficial, propiedad física que únicamente exhiben los materiales metálicos cuando presentan dimensiones de tamaño nanométrico. El pico de absorbancia para las CuNP c/a se produjo a los 593 nm, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos por diversos autores (Dang T y cols., 2011. Chatterjee A, 2014. Usman M y cols., 2012). Para el caso de las CuNP s/a no fue posible obtener el plasmón

de resonancia superficial, por lo que se confirmó que su tamaño no era de dimensiones nanométricas. Esto influyó en la estabilidad de las suspensiones sin almidón, ya que al tener un tamaño mayor, las partículas tendían a decantar siendo necesario resuspenderlas mediante agitación magnética previo a su utilización. Estos resultados están de acuerdo a los obtenidos por otros autores, que utilizando un agente estabilizante, lograron obtener nanopartículas de menor tamaño y más estables en suspensión (Usman M y cols., 2012). Un estudio reciente determinó la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de las CuONP frente a *S. mutans*, estableciendo una CIM de 12,5 µg/ml y CBM de 25 µg/ml (Farzaneh A y cols., 2015). Estos valores obtenidos se explicarían debido en los estados oxidados del cobre habría una mayor liberación de iones al medio (Theivasanthi T, Alagar M, 2011).

La preparación de las QuitNP se fundamenta en la reacción de entrecruzamiento entre el quitosano cargado positivamente y polimetafosfato de sodio con carga negativa. Estas nanopartículas se presentaron en forma de polvo blanco e insolubles en agua, similares resultados obtenidos por otros investigadores (Qi L y cols., 2004). Las QuitNP presentaron una morfología ovalada a esférica, con un tamaño promedio de 93±10 nm. Resultados que concuerdan con lo reportado en la literatura, por otros autores que sintetizaron nanopartículas de quitosano con un tamaño promedio de 90 nm (Rampino A y cols., 2013).

En este trabajo se desarrolló un método para la síntesis de nanopartículas híbridas compuestas de cobre y quitosano. Aunque en la literatura existen estudios en los que se logró la síntesis de microesferas de quitosano dopadas con nanopartículas de cobre, de un tamaño promedio de 5 µm (Cruzat C, 2010), y la síntesis de nanopartículas de cobre soportadas en una matriz macrométrica de quitosano (Usman M y cols., 2012); no se ha reportado partículas híbridas cobre-quitosano con dimensiones nanométricas. Mediante la caracterización por análisis SEM, se determinó que las CuNP/QuitNP presentaron un tamaño promedio de 131±36 nm. Si se considera que las CuNP c/a tenían un tamaño promedio de 100±20nm, la

nanopartícula híbrida CuNP/QuitNP presentaría una capa de quitosano de aproximadamente 31 nm de espesor, como se esquematiza en la **Figura 56**.

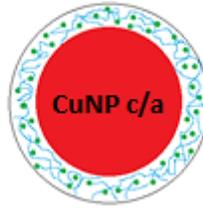


Figura 56. Representación esquemática de la estructura CuNP/QuitNP

Por otra parte, los resultados obtenidos de los análisis de FTIR-ATR, mostraron que la banda de absorción 3.260 cm^{-1} correspondiente a los grupos -NH_2 y grupos -OH en la partícula híbrida, presentaba menor intensidad comparada a la misma banda en la QuitNP. Este resultado indica la existencia de algún tipo de interacción química entre la superficie del metal y los grupos funcionales del polímero (Usman M y cols., 2012). De tal modo que el quitosano no conformaría simplemente una recubierta, sino que junto al cobre formarían una verdadera nanopartícula híbrida mediante interacciones covalentes, como se esquematiza en la **Figura 57**.

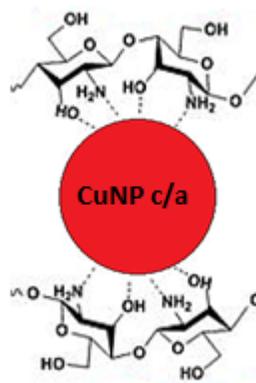


Figura 57. Esquema de la Interacción entre CuNP c/a y quitosano.

El análisis DRX realizado a las CuNP/QuitNP, reveló que una parte de las CuNP c/a se encontraría en estado oxidado (CuO , Cu_2O). Esta aparente inestabilidad de

las nanopartículas se podría explicar por el mismo proceso de formación de las CuNP/QuitNP. La **Ecuación 2** muestra la reacción de reducción del cobre. El potencial redox expresado en Volts, indica la capacidad que tiene el ion metálico para reducirse y formar el metal (en este caso la nanopartícula metálica). Como el cobre tiene un bajo potencial redox (0.34 V), reducir este metal representa una mayor dificultad que oxidarlo.



Ecuación 2. Semireacción de reducción del cobre.

Por otra parte se evaluó la sensibilidad *in vitro* de un patógeno representativo del biofilm oral, *Streptococcus mutans*, a las suspensiones de nanopartículas preparadas. Se determinó la **concentración inhibitoria mínima (CIM)** para cada una de las nanopartículas. Los ensayos de dilución en medio de cultivo líquido para determinar la CIM, mostraron que el crecimiento bacteriano disminuye a medida que aumenta la concentración del biocida. Por lo cual fue posible la determinación de la CIM para CuNP c/a, CuNP s/a, CuNP/QuitNP y CuNP + QuitNP. En base a los resultados obtenidos se puede apreciar que existen diferencias estadísticamente significativas entre la CIM de las CuNP c/a (20 µg/ml) y las CuNP s/a (30 µg/ml). Estas diferencias estarían dadas por el tamaño de la partícula, ya que como está documentado, la actividad antimicrobiana de las nanopartículas metálicas, es una función del área de superficie en contacto con los microorganismos. Como se ha demostrado existe una relación inversa entre el tamaño de las nanopartículas y su actividad antimicrobiana, donde las nanopartículas en el rango de tamaño de 1-10 nm han mostrado tener la mayor actividad antibacteriana (Tolaymat T y cols., 2010). Es debido a esto que la transición de micropartículas (CuNP s/a) a nanopartículas (CuNP c/a) involucra un incremento en la relación área de contacto/volumen (razón de aspecto), en donde el área de contacto aumenta dramáticamente permitiendo un mayor número de interacciones con moléculas orgánicas y elementos celulares (Zhang L y cols., 2010).

La diferencia existente entre la CIM de las CuNP/QuitNP (35 µg/ml) y las CuNP + QuitNP (50 µg/ml) indicaría que el hecho de tener una nanopartícula híbrida genera un aumento de las propiedades antimicrobianas del cobre y el quitosano en comparación a una mezcla física de ambas nanopartículas. Una posible explicación a este hecho estaría en los resultados obtenidos de la difracción de rayos X, ya que estos exhibieron la presencia de cobre oxidado en la muestra CuNP/QuitNP. La evidencia demuestra que en los estados oxidados del cobre estaría aumentada la cantidad de iones liberados al medio, debido a que se formaría una pequeña capa de óxido más reactiva en la superficie de la nanopartícula. Adicionalmente se conoce que estos óxidos de cobre aumentan el efecto bactericida mediante interacciones bioeléctricas con las bacterias (Theivasanthi T, Alagar M, 2011).

Para el caso de las QuitNP no fue posible lograr la inhibición del crecimiento bacteriano, ya que a la concentración más alta utilizada (500 µg/ml) aún había presencia de crecimiento bacteriano. Esto indicaría que si siguiéramos aumentando la cantidad de nanopartículas de quitosano en el medio, en algún momento se podría alcanzar “*in vitro*” tal inhibición y así poder determinar la CIM frente a *S. mutans*. En la literatura disponible solo existe un reporte de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de quitosano frente a *S. mutans*, sin embargo en el trabajo realizado por Chávez de Paz L y cols., 2011, no lograron determinar CIM ni CBM, sino que determinaron el porcentaje de daño a nivel de membrana plasmática mediante el Kit de viabilidad bacteriana BacLight para microscopía.

La **concentración bactericida mínima (CBM)**, se evaluó mediante el recuento de UFC en medio de cultivo sólido Agar-BHI. Los resultados obtenidos mostraron que el crecimiento bacteriano disminuye a medida que aumenta la concentración del biocida. Siendo posible la determinación de la CBM para CuNP c/a, CuNP s/a, CuNP/QuitNP y CuNP + QuitNP. En base al recuento de colonias se puede apreciar que existen diferencias estadísticamente significativas entre las distintas suspensiones, y que además concuerdan con los resultados obtenidos de las CIM,

ya que las nanopartículas que obtuvieron los mejores resultados fueron las CuNP c/a, que a una concentración de 30 µg/ml lograron eliminar la totalidad de las bacterias inoculadas. Estos resultados se deberían al igual que en el caso de la CIM, al alto poder biocida del cobre y a su reducido tamaño. El resto de las nanopartículas tuvieron un comportamiento similar, logrando su CIM a una concentración mayor a la de la CuNP c/a, excepto para las muestras CuNP + QuitNP y QuitNP, en las que las concentraciones más altas utilizadas aún se registró recuento de UFC.

En cuanto a los ensayos de actividad bactericida sobre piezas dentales, se utilizaron las distintas suspensiones de nanopartículas a concentraciones específicas. Para las CuNP c/a (40 µg/ml) y CuNP s/a (40 µg/ml) se eligieron concentraciones mayores a la CMI que registraron respectivamente. Las concentraciones utilizadas en las muestras CuNP/QuitNP (100 µg/ml) y CuNP + QuitNP (100 µg/ml) se eligieron debido a que contenían la misma concentración de cobre presente en las CuNP c/a y CuNP s/a, 40µg/ml. En el caso de las QuitNP se utilizó 60 µg/ml, ya que las muestras CuNP/QuitNP (100 µg/ml) y CuNP + QuitNP (100 µg/ml) contenían 60 µg/ml de quitosano.

El primer ensayo realizado fue la **evaluación de la capacidad antibacteriana de la superficie dentaria tratada con las nanopartículas**. Todas las muestras de dientes que fueron tratadas con nanopartículas presentaron capacidad de inhibir la formación de biofilm, sin embargo aquellas que tenían quitosano como parte de su composición fueron las que obtuvieron mejores resultados; siendo la nanopartícula híbrida la que presentó el menor recuento de UFC. Cabe destacar que las CuNP/QuitNP presentaron diferencias estadísticamente significativas en comparación a las CuNP c/a, pese a que ambas partículas contenían la misma concentración de cobre (40 µg/ml). Según ciertos autores, esto se explicaría debido a posibles interacciones entre la carga positiva de las moléculas de quitosano, proveniente de los grupos aminos y la superficie externa del esmalte dental que está cargada negativamente debido a los grupos fosfatos, lo cual permitiría una mayor adhesión de la nanopartícula híbrida a la superficie dentaria,

manteniendo por más tiempo el efecto bactericida, e impidiendo la formación del biofilm (Cafaggi S, 2007). Esta capacidad de adherirse a la superficie dentaria indica que las nanopartículas híbridas (CuNP/QuitNP) poseen una alta sustentividad, la cual se define como la capacidad de un agente a unirse a distintas superficies, para liberarse lentamente en forma activa manteniendo niveles terapéuticos (Bascones A, Morante S, 2006).

Como referencia se utilizó una solución de clorhexidina 0,12% la que presentó el menor recuento, con un valor de 0 UFC. Esto se debería a que una de las propiedades más importantes de este agente es su elevada sustentividad. La clorhexidina se libera en su forma activa durante 8-12 horas y después de 24 horas aún es posible encontrarla en bajas concentraciones, evitando la colonización bacteriana durante ese tiempo (Stanley A y cols, 1989), por lo cual evito que se formara un biofilm sobre la superficie dental tratada. En el caso del CPC 0,07% fue el que presentó el segundo menor recuento, con 400 (300) UFC.

Un segundo ensayo realizado fue la **evaluación de la capacidad antibacteriana de las suspensiones de nanopartículas frente a un biofilm formado sobre la superficie dentaria**. Todas las suspensiones de nanopartículas presentaron un efecto antibacteriano tratar un biofilm de *S. mutans* previamente formado sobre una superficie dental. De las nanopartículas sintetizadas, aquellas que tenían quitosano como parte de su composición fueron las que presentaron mejores resultados; siendo la nanopartícula híbrida (CuNP/QuitNP), la que presentó el menor recuento de UFC. Esto se explicaría debido a una remoción mecánica del biofilm, sumado a la actividad bactericida de la nanopartícula. La interacción entre la carga positiva de las moléculas de quitosano, proveniente de los grupos aminos y la superficie externa del esmalte dental, también se da entre el quitosano y la membrana plasmática cargada negativamente de las bacterias (Cafaggi S, 2007), por lo tanto le permiten a la nanopartícula híbrida una mayor adhesión con el patógeno permitiendo un mayor número de interacciones con elementos celulares, facilitando la acción de las CuNPs.

Como referencia se utilizó la clorhexidina 0,12% la que presentó el menor recuento de UFC, con un valor de 1.500 (1.000) unidades formadoras de colonias. También se utilizó CPC 0.07% el cual presentó el segundo menor recuento, con 2.500 (1.000) UFC. Estos resultados se podrían explicar debido a que tanto la clorhexidina como el cloruro de cetilpiridinio, son compuestos químicos y solubles en medio acuoso, a diferencia de las nanopartículas que corresponden a materiales, y por lo tanto son capaces de difundir de manera más fácil en el biofilm y generar la muerte de las bacterias. Además ambas sustancias se utilizan a concentración muy superiores (CHX 1200 µg/ml y CPC 700 µg/ml) a las utilizadas en las suspensiones de nanopartículas. En el caso del agua, ésta presentó un recuento de 52.500 (10.000) UFC, lo que representa un aproximadamente un 34% menos de UFC comparado con el control sin tratamiento, por lo cual el agua presentaría cierta capacidad de remoción de biofilm, que estaría dado más bien por la remoción mecánica de las bacterias adheridas a la superficie dentaria o los efectos del agua como solvente.

Si bien no es un objetivo de este trabajo de investigación, un aspecto que debería considerarse en estudio futuros es la evaluación de la citocompatibilidad de las concentraciones optimizadas de las nanopartículas. Estos estudios deberían entregar información acerca de “la ventana terapéutica” para posibles aplicaciones, esto es, el rango de concentraciones que permite un efecto antimicrobiano, manteniendo una adecuada biocompatibilidad.

La capacidad de inhibir la formación de biofilm sobre una superficie dentaria demostrada por las nanopartículas de CuNP y la partícula híbrida CuNP/QuiNP; así como su capacidad antibacteriana sobre una biopelícula ya formada; sugieren que estas nanopartículas podrían ser consideradas para estudios futuros en aplicaciones orientadas al control del biofilm oral.

CONCLUSIÓN

- El método estudiado en este trabajo, utilizando reactivos biocompatibles como almidón (reductor y estabilizante) y ácido ascórbico, permitió la formación de nanopartículas de cobre de manera satisfactoria y con características más compatibles para aplicaciones biomédicas. Por otra parte utilizar polimetafosfato de sodio como agente entrelazante del quitosano permitió la formación de nanopartículas estables del biopolímero.
- La incorporación de CuNP c/a durante el proceso de formación de las QuitNP, permitió la síntesis de una nanopartícula cobre-quitosano (CuNP/QuitNP), la cual presentó interacciones químicas entre sus componentes, demostrando la naturaleza híbrida de la partícula.
- Tanto las nanopartículas de cobre, de quitosano y sus combinaciones presentaron actividad antimicrobiana frente al patógeno *Streptococcus mutans*. Las suspensiones de CuNP c/a fueron las más eficaces, presentando la CIM y CBM más bajas en comparación al resto de las suspensiones de nanopartículas.
- La superficie dental tratada con nanopartículas híbridas (CuNP/QuitNP) fue la que presentó la mayor efecto en la inhibición de la formación del biofilm. Este efecto podría ser atribuido a la mejor adhesión de la nanopartícula a la superficie dentaria (sustantividad) y al efecto sinérgico de las propiedades antimicrobianas de ambas partículas.
- Las nanopartículas híbridas (CuNP/QuitNP) presentaron la mayor eficacia al tratar un biofilm de *S. mutans* previamente formado sobre una superficie dental, lo cual también se podría atribuir a la mejor adhesión y el efecto sinérgico de las nanopartículas.

- De acuerdo a los resultados obtenidos, suspensiones de nanopartículas sintetizadas en este trabajo presentan potencial para ser estudiadas en futuras aplicaciones odontológicas para el control del biofilm oral.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Aguilar C (2009). “Análisis del tamaño de cristalita en aleaciones Cu-Mo procesadas por aleado mecánico”. Revista de la facultad de ingeniería **23**: 1-8.
- Aguilera L, González A, Aguilar R (2005). “Caries risk in children: determined by levels of mutans streptococci and Lactobacillus”. J Clin Pediatr Dent **29**(4): 329-34.
- Andrews J (2001). “Determination minimum inhibitory concentrations”. Journal of antimicrobial chemotherapy **48**: 5-16.
- Balakrishnan M, Simmonds RS, Carne A, Tagg JR (2000). “*Streptococcus mutans* strain N produces a novel low molecular mass non-lantibiotic bacteriocin”. FEMS Microbiol Lett **183**: 165–169.
- Banas, J. (2004). “Virulence factors of *Streptococcus mutans*”. Frontiers in Bioscience **9**:1267-1277.
- Bascones A, Morante S (2006). “Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual”. Av Periodon Implantol **18**(1): 31-59.
- Bernimoulin J (2003). “Recent concepts in plaque formation”. J Clin Periodontol **30**(5): 7–9.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P (2002). “Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis”. Adv Drug Deliv Rev **54**: 631-651.

- Cafaggi S, Russo R, Stefani R, Leardi R, Caviglioli G, Parodi B, y cols. (2007). "Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N-trimethyl chitosan and a cisplatin–alginate complex". Journal of Controlled Release **121**: 110–123.
- Chatterjee A, Chakraborty R, Basu T (2014). "Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles". Nanotechnology **25**: 135101-135113.
- Chávez de Paz L, Resina A, Howard K, Sutherland D, Wejse P (2011). "Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on streptococcus mutans biofilms". Applied and environmental microbiology **77**: 3892–3895.
- Claydon N (2008). "Current concepts in toothbrushing and interdental cleaning". Periodontology 2002 **48**(1): 10-22.
- Coykendall A (1989). "Classification and identification of the *viridans streptococci*". Clin Microbiol Rev **2**(3): 315-28.
- Cruzat C, Cárdenas G (2010). "Síntesis y caracterización de nanopartículas metálicas soportadas en quitosano". Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Químicas.
- Da Silveira A, Camargo R, Tavares J, Moreira M, Bonifácio S (2009). "Effect of Sanguinaria canadensis Tincture Associated to a Chewing Gum on the Bacterial Biofilm". The Open Complementary Medicine Journal **1**: 97-101.
- Dash M, Chiellini F, Ottenbrite R, Chiellini E (2011). "Chitosan- A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications". Progress in Polymer Science **36**: 981–1014.

- De Grado P, Naverac A, Gil F (2007). “Periodoncia para el higienista dental”. Periodoncia y osteointegración **17**(4): 247-258.
- De Jong W, Borm J (2008). “Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards”. Int J Nanomedicine **3**: 133-149.
- Delgado, GC (2009). “Nanotecnología y producción de alimentos: impactos económicos, sociales y ambientales”. Estudios sociales (Hermosillo, Son.) **17**(34): 185-205.
- Dolan R (2002). “Biofilms: Microbial life on surfaces”. Emerg Infect Dis **8**(9): 881-90.
- Encuesta Nacional de Salud Chile. 2009-2010.
- Fang J, Lyon D Y, Wiesner M R, Dong J, Alvarez M (2007). “Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior”. Sci Tot Environ **41**: 2636–2642.
- Farzaneh A, Neda E, Omid R, Kiarash G, Sahar B (2015). “The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutans and Streptococcus sangius to colloidal solutions of different nanoparticles applied as mouthwashes”. Dent Res J (Isfahan) **12**(1): 44–49.
- Featherstone, J (2008). “Dental Caries: A dynamic disease progress”. Australian Dental Journal **53**: 286–291.
- Fejerskov O (2004). “Changing paradigms in concepts on Dental caries: Consequences for oral health care”. Caries Res **38**: 182–91.

- Gajewikz A, Rasulev B, Dinadayalane T, Urbaszek P, Puzyn T, Leszczynska y cols. (2012). “Advancing risk assessment engineered nanomaterials: application of computational approaches”. Adv Drug Deliv Rev **64**(15): 1663-1693.
- González J, Covarrubias C, Cádiz M, Cuadra F, Bittner M (2012). “Síntesis de materiales bactericidas basados en nanopartículas metálicas y biopolímeros para terapia periodontal odontológica”, II Congreso Nacional de Nanotecnología, Valparaíso, Chile.
- Heath R, Rubin J, Holland D, Zhang E, Snow M, Rock C (1999). “Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis”. The journal of biological chemistry **274**(16): 11110–11114.
- Huerta J, Gajardo M, Silva N, Gómez L, Palma P, Zillmann G (2010). Manual de Laboratorio Microbiológico Clínico en Odontología. Santiago, Chile. Cap.9: 103-113. Cap.10: 168-193.
- İkinci G, Senel S, Akincibay H, Kas S, Ercis , Wilson C, Hincal A (2002). “Effect of chitosan on a periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis”. International Journal of Pharmaceutics **235**: 121–127.
- Khan S, Alam F, Azam A, Khan A (2012). “Gold nanoparticles enhance methylene blue-induced photodynamic therapy: a novel therapeutic approach to inhibit Candida albicans biofilm”. Int J Nanomedicine **7**: 3245-3257.
- Klein M, Hwang G, Santos P, Campanella O, Koo H (2015). “Streptococcus mutans-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms”. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology **5**(10): 1-8.

- Kreuter J (2007). "Nanoparticles a historical perspective". Int J Pharm **331**: 1-10.
- Li X, Robinson S, Gupta A, Saha K, Jiang Z, Moyano D, Sahar A, Riley A, Rotello V (2014). "Functional Gold Nanoparticles as Potent Antimicrobial Agents against Multi-Drug-Resistant Bacteria". Acsnano **8**(10): 10682–10686.
- Loesche WJ (1976). "Chemotherapy of dental plaque infections". Oral Sci Rev **9**: 65-107.
- Lok C, Ho C, Chen R, He Q, Yu W, Sun H, Tam P, Chiu J, Che C (2006). "Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles". J Proteome Res **5**: 916–924.
- Marsh P, Moter A, Devine D (2011). "Dental plaque biofilms: communities, conflict and control". Periodontol 2000 **55**: 16–35.
- Marsh, P (2006). "Dental plaque as a biofilm and microbial community implications for health and disease." BMC Oral Health **1**: 14-21.
- Martínez-Pabón M, Morales-Uchima S y Martínez-Delgado C (2013). "Dental caries in young adults regarding saliva's microbiological and physical-chemical characteristics". Rev. salud pública **15**(6): 867-877.
- Nazar J (2007). "Biofilms bacterianos". Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello **67**: 61-72.
- Neal A (2008). "What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles?". Ecotoxicology **17**: 362-371.

- Pájaro N, Olivero J, Redondo J (2013). “Nanotecnología aplicada a la medicina”. Revista Científica Guillermo de Ockham **11**(1): 125-133.
- Park J, Tanabe Y, Tinanoff N, Turng B, Lilli H, Minah G (2006). “Evaluation of microbiological screening systems using dental plaque specimens from young children aged 6-36 months”. Caries Res **40**(3): 277-280.
- Pelgrift R, Friedman A (2013). “Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance”. Advanced Drug Delivery Reviews **13**: 1-13.
- Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C (2005). “The global burden of oral diseases and risks to oral health”. Bull World Health Organ **83**(9): 661-9.
- Platt C, Machado M (2004). “Uso de los diferentes agentes químicos para el control de la placa bacteriana como coadyuvantes en la prevención de las enfermedades gingivales”. Rev Odous Cient **5**: 5-9.
- Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X (2004). “Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles”. Carbohydrate Research **339**: 2693-2700.
- Raffi M, Mehrwan S, Bhatti TM (2010). “Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against Escherichia coli”. Annals of Microbiol **60**: 75–80.
- Rai M, Yadav A, Gade A (2009). “Silver nanoparticles as a new generation of Antimicrobials”. Biotechnology Advances **27**(1): 76–83.
- Rampino A, Borgogna M, Blasi P, Bellich B, Cesàro A (2013). “Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability”. International Journal of Pharmaceutics **455**: 219– 228.

- Ravishankar R, Jamuna B (2011). “Nanoparticles and their potential application as antimicrobials”. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Méndez-Vilas (Ed.) **1**: 197-209.
- Rhim J, Hong S, Park H, Perry K (2006). “Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity”. J. Agric. Food Chem **54**: 5814-5822.
- Ruparelia J, Chatterjee A, Duttagupta S, Mukherji S (2008). “Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles”. Acta Biomater **4**: 707–716.
- Seki M, Yamashita Y, Shibata Y, Torigoe H, Tsuda H, Maeno M (2006). “Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries development”. Oral Microbiol Immunol **21**(1): 47-52.
- Selwitz R, Ismail A, Pitts N (2007). “Dental Caries”. Lancet **369**: 51-59.
- Senel S, Ikinci G, Kas S, Yousefi-Rad A, Sargón M, Hincal A (2000). “Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery”. Int J Pharm **193**: 197-203.
- Stanley A, Wilson M, Newman H (1989). “The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria”. J. Clin. Periodontol **16**: 259–264.
- Strużycka I (2014). “The Oral Microbiome in Dental Caries”. Polish Journal of Microbiology **63**(2): 127–135.

- Takahashi N y Nyvad B (2011). “The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives”. J Dent Res **90**(3): 294-303.
- Tolaymat T, Badawy A, Genaidy M, Scheckel K, Luxton T, Suidan M (2010). “An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers”. Science of the Total Environment **408**(5): 999–1006.
- Usman M, Ibrahim N, Shameli K, Zainuddin N, Wan-Yunus W (2012). Copper “Nanoparticles Mediated by Chitosan: Synthesis and Characterization via Chemical Methods”. Molecules **17**: 14928-14936.
- Velásquez C (2013). “Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos”. Revista Iberoamericana de Polímeros **4**(2): 91-109.
- Viswanathan S, Han C, Kelvin W (2010). “Nanotechnology in biomedical applications: a review”. Int J of Nano and Biomaterials **3**: 119-139.
- Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Daskalakis N, Jeuken L, Povey M, O’Neill A, York D (2010). “Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against E. coli”. J Nanopart Res **12**: 1625–1636.
- Zhu M, Takenaka S, Sato M, Hoshino E (2001). “Influence of starvation and biofilm formation on acid resistance of Streptococcus mutans”. Oral Microbiol Immunol **16**: 24–27.

ANEXOS



DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

“Síntesis de suspensiones de nanopartículas de cobre y quitosano, y evaluación de sus propiedades antimicrobianas frente a *Streptococcus mutans*”

Versión 1, pacientes 18 años o más

Antecedentes generales:

Usted ha sido invitado a participar voluntariamente en un estudio titulado “Síntesis de suspensiones de nanopartículas de cobre y quitosano, y evaluación de sus propiedades antimicrobianas frente a *Streptococcus mutans*”. El objetivo del estudio es estudiar las propiedades antibacterianas de partículas de cobre frente a una de las bacterias que produce caries. El cobre es antimicrobiano, sin embargo no se ha estudiado su efecto contra una de las bacterias que produce caries.

En términos generales, **el objetivo del estudio es usar terceros molares (“muelas del juicio”) para probar sobre estas piezas la capacidad de la partícula de cobre para matar las bacterias.** Este formulario será explicado por el investigador y se entregará a los participantes para su lectura. El participante podrá retirarse del estudio en cualquier momento que lo desee y sus datos serán eliminados a partir de ese momento.

Procedimiento:

Se incluirán **pacientes a los cuales ha sido indicada la extracción del tercer molar por indicaciones quirúrgicas o protésicas u ortodóncicas, sin enfermedad periodontal ni otras enfermedades generales.**

El financiamiento del tratamiento será responsabilidad del paciente, mientras que los análisis de muestras serán financiados por el proyecto. La obtención de estas muestras en sí no presenta riesgos ni costos adicionales para el paciente y una vez analizadas serán descartadas.

Los datos personales e identificación de los sujetos participantes serán confidenciales y se utilizarán códigos para mantener oculta la identidad de los participantes. En caso de manifestar interés en los resultados de los análisis efectuados, los interesados pueden acceder a esta información solicitándola al

investigador responsable. Los sujetos participantes pueden retirarse del estudio en cualquier momento que estimen conveniente, sin perjuicio de su tratamiento odontológico.

Ventajas

No existen ningún tipo beneficio para el paciente directamente involucrado ya que las piezas dentales utilizadas normalmente son desechadas.

Investigador Responsable:

Dr. Cristian Covarrubias Gallardo RUT: 12.756.705-0 Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Fono: 9781719 E-mail: ccovarru@u.uchile.cl



FORMULARIO CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES ADULTOS

Investigador responsable: Dr. Cristian Covarrubias Gallardo RUT: 12.756.705-0
 Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología,
 Universidad de Chile. Fono: 9781719 e-mail: ccovarru@u.uchile.cl

Yo..... Estoy dispuesto a participar en el proyecto de investigación. He leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente. Al firmar esta copia, indico que tengo un entendimiento claro del proyecto

Firma

Al sujeto de investigación he entregado información sobre el estudio, y en mi opinión esta información es precisa y suficiente para que el sujeto entienda completamente la naturaleza, los riesgos y beneficios del estudio, y los derechos que tiene en tanto sujeto de investigación. No ha existido coerción ni ha actuado bajo influencia alguna.
 He sido testigo que el sujeto firmó el documento.

Nombre del Investigador:.....

Firma del Investigador: Fecha: