

Nanopartículas con efecto antifúngico en prótesis dentales

Gómez-Quintero Teresa¹

Acosta-Torres L.S.²

Hernández-Padrón Genoveva³

Campos P², de la Fuente², Castaño V.M.⁴

Laura Susana Acosta-Torres⁵

Resumen

Se presenta la síntesis y caracterización de poli (metil metacrilato) [PMMA] con nanopartículas de óxido de titanio con fase cristalina anatasa, así como la síntesis y caracterización de nanopartículas de plata para su incorporación en la formulación del PMMA para aplicación en prótesis dentales. Se reportan los resultados de la prueba de adherencia de *Candida albicans* sobre PMMA adicionado con nanopartículas de plata y la comparación con Nature Ceryl; una resina acrílica disponible comercialmente.

Palabras clave: resina acrílica, prótesis dentales, efecto antifúngico, nanopartículas de Óxido de Titanio, adherencia de Candida albicans.

1Licenciatura en Tecnología, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM, Campus Juriquilla.

2Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM Unidad León, Guanajuato.

3Departamento de Nanotecnología, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM, Campus Juriquilla.

4Departamento de Ingeniería de Materiales Moleculares, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM, Campus Juriquilla.

5Autor de Correspondencia Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM, Unidad León.

Summary

We report the synthesis and characterization of poly (methyl methacrylate) [PMMA] with titanium oxide nanoparticles presenting anatase crystalline phase, and the synthesis and characterization of silver nanoparticles; so that they can be incorporated in the formulation of PMMA for dental prostheses application. We also report the test results of *Candida albicans* adherence on PMMA with added silver nanoparticles in comparison with Nature Cryl, a commercially available acrylic resin.

Keywords: acrylic resin denture, antifungal effect, nanoparticles of titanium oxide, adherence of Candida albicans.

Introducción

Las prótesis dentales removibles se fabrican generalmente de resina acrílica de poli(metil metacrilato) [PMMA] (Yildirim, Hasanreisoglu, Hasirci, 2005), el cual al entrar en contacto con la mucosa bucal puede actuar como reservorio para la adherencia y proliferación de *Candida albicans*; microorganismo patógeno oportunista causante de importantes procesos infecciosos en la cavidad bucal como la estomatitis protésica, donde el tejido epitelial en contacto con las prótesis se adelgaza provocando ardor e inflamación excesiva del tejido conectivo. La estomatitis protésica daña de forma común el paladar, afectando principalmente a mujeres (Oliveira, Silva-Lobato 2009; Pusateri, Monaco, Edgerton, 2009). Una vez adherida la *Candida*, puede cambiar su tipo de crecimiento de blastoconidio a pseudohifas e hifas verdaderas las cuales se propagan a través de contacto por discontinuidades de las células de la mucosa bucal, penetran en ella, invaden tejidos profundos y dificultan la fagocitosis (Romo, Moreno, Antuna 2006). El óxido de titanio (TiO_2), es un material biocompatible y no tóxico, que exhibe propiedades como agente oral antimicrobiano debido a sus propiedades de oxidación y fotocatalisis (Sikong, Kongreong, Kantocho, 2010:). Actualmente existen muchos estudios sobre

los componentes óptimos para elaborar acrílico dental, enfocados en diferentes compuestos y en la eliminación microorganismos.

Es el óxido de titanio en su fase anatasa el que ha mostrado mayor grado antimicrobial, diversos estudios tratan sobre su efecto sobre *Escherichia Coli* y *Bacillus megaterium*, además de los efectos de nanocompositos de brookita-anatasa sobre *Staphylococcus aureus*, etc. (Fu, Vary, Lin, 2005; Shah, Kaewgun, Lee, 2008).

Por otro lado, las nanopartículas de plata (AgNPs) poseen propiedades ópticas, eléctricas, térmicas y antibacterianas que las hacen únicas diversas aplicaciones biomédicas, por ello, actualmente son incorporadas en gran cantidad de productos comerciales. Las nuevas vertientes de investigación proponen el uso de tales nanoestructuras en un amplio rango de aplicaciones biomédicas, explotando sus propiedades antibacterianas y antifúngicas (Ahmad, Sharma, Shamsi, 2011).

En base a las propiedades fotocatalíticas del TiO_2 en fase anatasa, consideramos que la adherencia de *Candida albicans* se reducirá en comparación al acrílico comercial. Además, el grupo adicionado con AgNPs deberá mostrar un efecto antifúngico mayor debido a sus propiedades oxidantes sobre microorganismos.

Sección Experimental

Caracterización de nanopartículas de TiO₂

Nanopartículas de Óxido de Titanio Anatasa (99 %; Sigma-Aldrich, México), fueron caracterizadas mediante Espectroscopía UV-Vis, Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR), Espectroscopía Raman Dispersivo, Difracción de Rayos X y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Una solución de TiO₂ en agua fue caracterizada mediante espectroscopía UV-Visible (UV-Vis) en un equipo Genesys 2PC; $\lambda=410$ nm. El análisis de espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR) fue realizado en un equipo Bruker Vector 33 con 17 escaneos en la región de 400 - 4500 cm⁻¹. El análisis de Espectroscopía Raman-Dispersivo fue realizado en un equipo Senterra Buker, equipado con láser de $\lambda=685$ nm y FT Raman (Nicolet 910) con $\lambda=1064$ nm y acoplado con microscopio Olympus. Para conocer el tamaño y morfología, las nanopartículas de TiO₂ fueron analizadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, JEOL-1010). La solución de nanopartículas fue depositada en las rejillas y se mantuvieron hasta la evaporación del disolvente antes de ser observadas.

Síntesis PMMA-TiO₂

Se sintetizaron en suspensión partículas de poli (metil metacrilato) [PMMA] agregando

in situ nanopartículas de TiO₂ y óxido de hierro (Fe₂O₃; González Cano y Asociados, México) como pigmentos para obtener una resina acrílica color rosa semejante a la encía (Acosta-Torres, López-Marín, Núñez-Anita, 2011). El producto final de la síntesis se lavó con agua desionizada y fue secado a 60 °C durante 24 h para posteriormente pasarlo a través de un tamizó con apertura de 140 μ m.

Síntesis de AgNPs

Nanopartículas de plata fueron sintetizadas a partir de nitrato de plata (AgNO₃; Sigma) como precursor y una infusión de geranio (Geranium maculatum) como agente reductor (Acosta-Torres, Bejarano, Mendieta-Trejo, 2011:44-47).

Muestreo

Se elaboraron 3 grupos de acrílico para la comparación de adherencia de *Candida albicans*:

a) PMMA-TiO₂; (PMMA), b) PMMA-TiO₂ + AgNPs (PMMA-AgNPs) y c) Nature Cryl (GC, USA).

Se elaboraron muestras (n=12) de 10 x 2 mm de cada grupo de acrílico disolviendo 6 mL de PMMA en 2 mL de monómero de MMA (Metil Metacrilato; Sigma-Aldrich, México); cuidando de agregar 0.8 % de AgNPs en el grupo PMMA-AgNPs. Los acrílicos fueron mezclados hasta lograr una consistencia de masilla y fueron empacados en moldes de poliéster y termopolimerizados

en un horno de microondas durante 3 min a 500 W. El acrílico Nature Ceryl fue manipulado y procesado de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Adherencia de *Candida albicans*

Se preparó un cultivo de *Candida albicans* en agar Dextrosa y se incubó a 37 ± 1 °C durante 48 h. Posteriormente, se tomó asada de las nuevas colonias formadas y se agregó a un tubo con 3 mL de caldo de cultivo (Tryptic Soy Broth; Sigma) y se incubó en agitación durante 18 h.

Se sembraron 1×10^6 UFC de *Candida albicans* en cajas de 24 pozos y se colocaron en contacto las muestras de resina acrílica ($n=12$), las cuales se incubaron durante 18 h a 37 ± 1 °C. Se realizó el ensayo de adherencia de *Candida albicans* utilizando 6 muestras por grupo como control sin estar en contacto con *Candida albicans* y 6 muestras en contacto con *Candida*.

Después de este período de tiempo, se separan las muestras de acrílico del cultivo de *Candida* y se hace la remoción de tales colonias con un detergente (Cloruro de Benzalconio; Sigma) durante 15 min y a esta disolución se le agrega el reactivo BacTiter

Glo (Promega) compuesto por el complejo luciferín-luciferasa que provocará emisión de luz proporcional a la cantidad de UFCs viables adheridas al material mediante el uso de un luminómetro (BioRad).

Análisis Estadístico

A los resultados del ensayo de adherencia de *Candida albicans* se aplicó ANOVA de Una Vía ($p < 0.05$) y Tukey test.

Resultados

Caracterización de nanopartículas de TiO₂- Anatasa

El espectro UV-Visible muestra la resonancia plasmónica de superficie a 356 nm (Figura 1); típica de la presencia de nanopartículas de Óxido de Titanio, lo cual confirma la naturaleza del material.

“Nanopartículas con efecto antifúngico en prótesis dentales”

Gómez-Quintero T., Acosta-Torres L.S., Hernández-Padrón G., Campos P., de la Fuente, Castaño V.M.

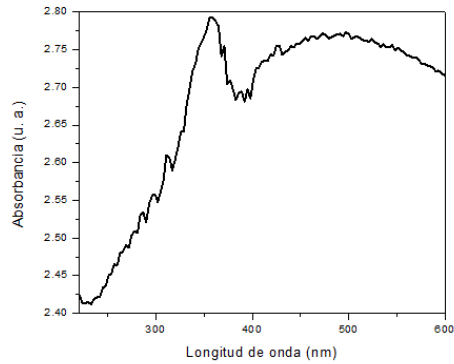


Figura 1. Espectro UV-Visible mostrando el pico en la región de 356 nm característico de las nanopartículas de TiO₂

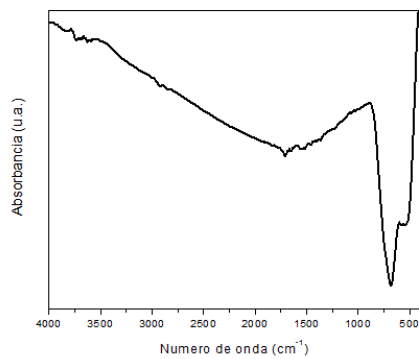


Figura 2. Espectro FT-IR de las partículas de Óxido de titanio mostrando bandas características del enlace Ti-O.

La Figura 2 muestra el espectro de FT-IR de las partículas de Óxido de Titanio en donde se identifican las bandas de absorción características del enlace Ti-O en las regiones de 740 y 580 cm⁻¹, mientras que en el espectro Raman Dispersivo (Figura 3) se encuentran cuatro bandas de absorción en las regiones de 103, 190, 392, 512 y 654 cm⁻¹.

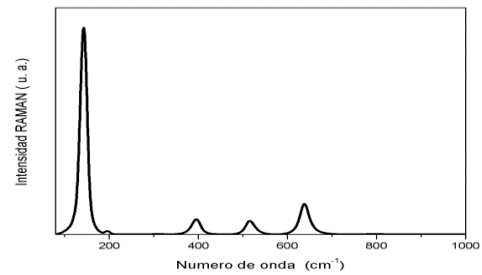


Figura 3. Espectro Raman Dispersivo de nanopartículas de Óxido de Titanio.

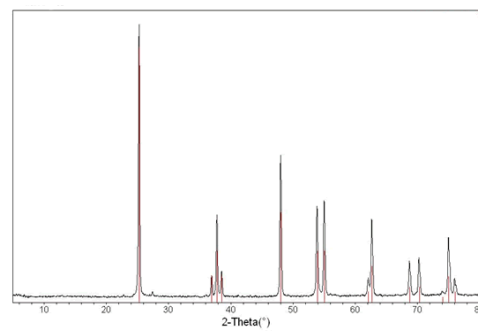


Figura 1. Difractograma de Rayos-X mostrando la prevalencia de bandas características de nanopartículas de Óxido de Titanio con fase cristalina anatasa.

Por otro lado, el difractograma de Rayos X de las partículas de Óxido de Titanio analizadas coincide en todas las bandas con los sitios referentes a la fase cristalina anatasa, como se muestra en la Figura 4.

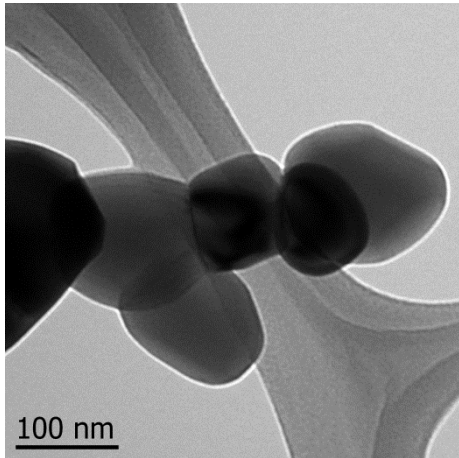


Figura 5. Micrografía Electrónica de Transmisión de nanopartículas de TiO₂ con fase cristalina anatasa, de morfología irregular y con tamaño de partícula de entre 70-150 nm.

La morfología de las nanopartículas se analizó mediante micrografías de TEM, observándose partículas irregulares con tamaño en el rango de 70-150 nm, con bordes bien definidos.

Caracterización PMMA-natasa

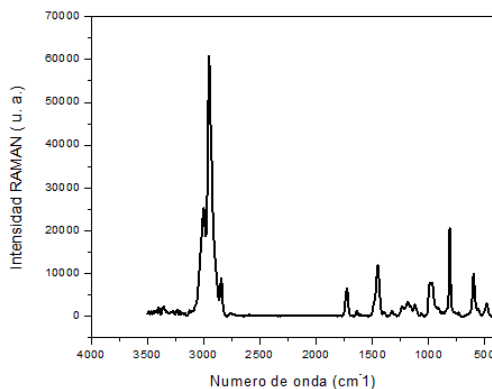


Figura 6. Espectro Raman Dispersivo del PMMA sintetizado adicionando in situ de nanopartículas de TiO₂.

Las partículas de resina acrílica sintetizadas se analizaron espectroscópicamente mediante Raman Dispersivo mostrando las bandas características de las vibraciones de la molécula de poli(metil metacrilato). Se muestran las bandas de absorción referentes a los grupos funcionales del metileno C-H en la región de 2949 cm⁻¹, las bandas del éster carbonil C=O en la región de 1726 cm⁻¹ y las bandas de vibración del grupo aromático CH₂ en la región de 1437 cm⁻¹ de acuerdo al espectro mostrado en la Figura 6. La inclusión de TiO₂ en la molécula de PMMA se confirma con la presencia de la banda de absorción en 654 cm⁻¹.

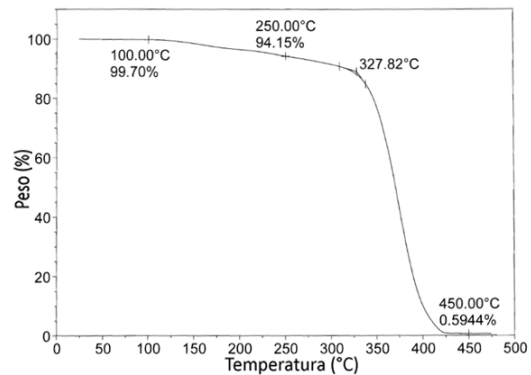


Figura 7. Termograma del PMMA-TiO₂ sintetizado mostrando el descenso relacionado a la pérdida de masa al aumentar gradualmente la temperatura.

“Nanopartículas con efecto antifúngico en prótesis dentales”

Gómez-Quintero T., Acosta-Torres L.S., Hernández-Padrón G., Campos P., de la Fuente, Castaño V.M.

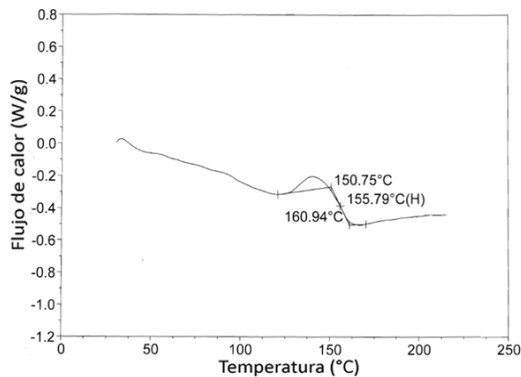


Figura8. Termograma del análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido del PMMA sintetizado con TiO₂.

Los termogramas de TGA y DSC mostrados en las Figuras 7 y 8 indican para el primero, el comportamiento del PMMA al incrementar la temperatura; indicando tres etapas de pérdida de masa a 110, 25 y 327 °C, con una degradación total del polímero a 400 °C; mientras que el DSC indica el valor de la temperatura de transición vítrea del polímero en 150.75 °C.

Caracterización de nanopartículas de plata

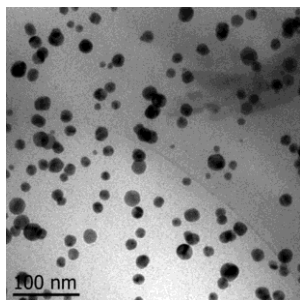


Figura9. Micrografía TEM de las nanoesferas de plata sintetizadas utilizando geranio como agente reductor.

Las nanopartículas de plata sintetizadas al ser analizadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión morfología esférica con tamaño de partícula entre 2-6 nm. Se obtuvo una síntesis de AgNPs con tamaño y morfología homogénea como se muestra en la Figura 9.

Ensayo adherencia Candida albicans

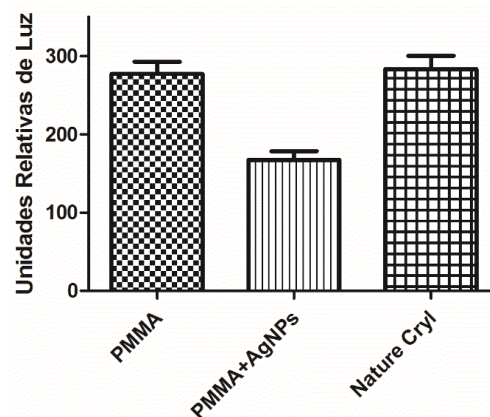


Figura 10. Valores promedio y desviación estándar de las muestras de PMMA con y sin AgNPs comparadas con la resina comercial para analizar la adherencia de Candida albicans a la superficie de cada polímero.

La gráfica de la Figura 10 muestra los resultados en Unidades Relativas de Luz obtenidos después de realizar el ensayo de adherencia de Candida albicans en cada grupo de resina acrílica evaluados. El análisis estadístico indicó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos, siendo el PMMA con AgNPs el que presentó el menor valor de

adherencia microbiana en comparación con el PMMA y Nature Cryl.

Discusión

En el presente estudio, nanopartículas de Óxido de Titanio se utilizaron in situ durante la síntesis de PMMA. En años recientes las nanopartículas de óxidos metálicos han sido ampliamente utilizadas como aditivos debido a su actividad antimicrobiana. En particular, el TiO₂ es considerado un material fotocatalítico, de bajo costo, estable químicamente y no-tóxico (Fujishima, Rao, Tryk, 2000:1-21) por lo que ha sido ampliamente utilizado en diversas aplicaciones biomédicas. Otros estudios han mostrado reducción del porcentaje de poros en las resinas acrílicas de PMMA que contienen TiO₂ con fase cristalina rutilo (Acosta-Torres, López-Marín, Núñez-Anita, 2011:44-47) y se esperaría el mismo comportamiento con la fase cristalina anatasa, sin embargo estudios posteriores se requieren para su confirmación. La reducción de poros presentes en las resinas acrílicas para prótesis dentales es ideal para una adecuada calidad de vida de las restauraciones y los tejidos de soporte del paciente, reduciendo el riesgo de contaminación microbiana de las prótesis (Pero, Barbosa, Marra, 2008:125-129).

Los análisis de las caracterizaciones fisicoquímicas de las partículas de TiO₂ comprueban la utilización de partículas nanométricas con fase cristalina anatasa, fase que se ha encontrado ser la más antimicrobiana en comparación con otras fases cristalinas que puede presentar el TiO₂. En cuanto a la caracterización del PMMA sintetizado, se demostró mediante FT-IR la integración de las nanopartículas de TiO₂ en la molécula del poli(metil metacrilato) sin modificar la presencia de bandas características del PMMA (Jiang 2007: 1724–1728), mientras que el análisis por Raman Dispersivo mostró la secuencia típica para el PMMA (Schrader, 1995), por lo que la adición del TiO₂ in situ resulta una técnica efectiva para la formación de este compuesto. Con los análisis termogravimétricos se aprecia que la pérdida en porcentaje de masa del PMMA sintetizado es relativamente nula a las temperaturas a las que se somete normalmente el polímero dentro de boca cuando se encuentra en forma de prótesis dental. Agregar TiO₂ en la molécula de PMMA, no modifica la estabilidad térmica del polímero, al ser comparado con PMMA sin agregados de óxidos metálicos (Acosta-Torres, Barceló-

“Nanopartículas con efecto antifúngico en prótesis dentales”

Gómez-Quintero T., Acosta-Torres L.S., Hernández-Padrón G., Campos P., de la Fuente, Castaño V.M.

Santana, Álvarez- Gayosso, 2008:3953-3960).

La interacción entre microorganismos y la superficie de las prótesis puede resultar en la colonización de patógenos oportunistas, por lo que en este estudio se evaluó la adherencia de *Candida* sobre los PMMA conteniendo TiO₂ y adicionados o no con nanopartículas de plata, resultando que las nanopartículas de plata sintetizadas y agregadas al PMMA le confieren mayor efecto antimicrobiano contra *Candida albicans* específicamente, lo que indica resultados prometedores para su uso clínico, proponiendo que usar prótesis dentales confeccionadas con PMMA adicionado con AgNPs reduciría la presencia de estomatitis protésica en los pacientes portadores.

Conclusiones

Se realizó la síntesis efectiva de PMMA con nanopartículas de TiO₂ con fase cristalina anatasa, al cual se le adicionaron nanopartículas de plata para conferirle mayor efecto antimicrobiano. Los resultados indican la obtención de un compuesto eficaz ante la presencia de *Candida albicans*, lo que sugiere realizar experimentaciones posteriores que certifiquen su adecuado uso como material para elaborar prótesis dentales.

Agradecimientos

Los autores agradecen el excelente apoyo técnico a: Dra. Marina Vega, Mtra. Ma. Lourdes Palma Tirado, T. Daniel Mondragón, T. Antonio Prado, Dra. Beatriz Millán, Mtro. Canseco.

Referencias

- Acosta-Torres LS, Bejarano EB, Mendieta-Trejo AI, Hernández-Padrón G, Castaño VM. (2011), “Efecto antifúngico de un PMMA/nanopigmentos con AgNPs”. *Biomateriales en Odontología Actual*, 99 pp. 44-47.
- López-Marín LM, R. Núñez-Anita RE, Hernández-Padrón G, Castaño VM., (2011), “Biocompatible metal-oxide nanoparticles: nanotechnology improvement of conventional prosthetic acrylic resins”. *J Nanomat*, Article ID 525967.
- LS, Barcelo-Santana F H., Alvarez- Gayosso CA., and Reyes-Gasga J., (2008) “Synthesis and characterization of poly(methyl methacrylate) polymerized by microwave energy or conventional water bath,” *Journal of Applied Polymer Science*, 109(6), pp. 3953–3960.
- Ahmad N, Sharma S, Shamsi VN, Fatma A, Mehta BR (2011), “Biosynthesis of silver nanoparticles from desmodium triflorum: A novel approach towards weed utilization”. *Biotechnology Research International*. doi:10.4061/2011/454090.
- Fu G, Vary PS, Lin C. (2005), “Anatase TiO₂ Nanocomposites for Antimicrobial Coatings”. *J. Phys. Chem. B.*, 109(18) pp. 8889–8898.
- Fujishima A., Rao TN., Tryk DA., 2000 “Titanium dioxide photocatalysis,” *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews.*, 1(1) pp. 1–21.
- Jiang J., 2007 “Ultrasonic-assisted synthesis of PMMA/Ni_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ nanocomposite in mixed surfactant system,” *European Polymer Journal.*, 43(5) pp. 1724–1728.
- Oliveira H, Silva-Lobato C. (2009), “Effect of three methods for cleaning dentures on biofilms formed in vitro on acrylic resin”. *J Prosthodont*; 18(5) pp. 427-431.
- Pero AC., Barbosa DB., Marra J. et al., 2008 “Influence of microwave polymerization method and thickness on porosity of acrylic resin,” *Journal of Prosthodontics.*, 17(2) pp. 125–129.
- Pusateri C, Monaco E, Edgerton M. (2009), “Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to

“Nanopartículas con efecto antifúngico en prótesis dentales”

Gómez-Quintero T., Acosta-Torres L.S., Hernández-Padrón G., Campos P., de la Fuente, Castaño V.M.

antifungal proteins and chlorhexidine”. *Arch Oral Biol*; 54(6) pp. 588-594.

Romo AE, Moreno MV, Antuna BS, Van Der GTF, Muñoz HB. (2006), “Análisis microscópico de la adherencia de *Candida albicans* in vitro sobre resina acrílica para bases de dentaduras procesadas con tres diferentes técnicas”, *Rev. Odontol. Mex.*, 10(4) pp. 167-172.

Shah, R.R, Kaewgun S, Lee BI, Tzeng TR (2008), “The antibacterial effects of biphasic brookite-anatase titanium dioxide nanoparticles on multiple-drug-resistant *Staphylococcus aureus*.”, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 4(3) pp. 339-348.

Schrader B., *Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications*, VCH, 1995.

Sikong L, Kongreong B, Kantachote D, and Sutthisripok W, (2010), “Photocatalytic activity and antibacterial behavior of Fe³⁺ doped TiO₂/SnO₂ nanoparticles”. *Energy Research Journal*, 1 pp. 120-125

Yildirim MS, Hasanreisoglu U, Hasirci N, Sultan N. (2005). “Adherence of *Candida albicans* to glow- discharge modifies acrylic denture base polymers”. *J Oral Rehab*; 32:518-25.