

**Universidad Autónoma de Baja California**  
**Facultad de Odontología Tijuana**

**Especialidad en Odontología Pediátrica**



**Desarrollo de un Dentífrico Preparado con Nanopartículas de Plata  
para evaluación antimicrobiana y Caso Clínico**

Trabajo Terminal para obtener el DIPLOMA de

ESPECIALIDAD EN ODONTOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA

**CD Stephanie Citlali De La Cruz Ramos**

PRESIDENTE

Dr. Esteban Hernández Guevara

SINODAL

Dra. Perla Elena Núñez Serafín

SINODAL

Dra. María Fernanda Araiza Verduzco

SINODAL

Dra. Betsabé De La Cruz Corona

SINODAL

MCS Jesús Isaías De León Ramírez

Tijuana, Baja California, México.

Noviembre 2024

## Votos Aprobatorios

Tijuana, Baja California a, 24 de septiembre de 2024

**Comité de Estudios de Posgrado  
Especialidad en Odontología Pediátrica  
Presente**

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **Desarrollo de un Dentífrico Preparado con Nanopartículas de Plata para Evaluación Antimicrobiana y Caso Clínico.**

Propuesto por la **CD Stephanie Citlali De La Cruz Ramos**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que la sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**ATENTAMENTE**



**Dr. Esteban Hernández Guevara**  
Director

Ccp.- Archivo.

Tijuana, Baja California a, 24 de septiembre de 2024

**Comité de Estudios de Posgrado  
Especialidad en Odontología Pediátrica  
Presente**

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **Desarrollo de un Dentífrico Preparado con Nanopartículas de Plata para Evaluación Antimicrobiana y Caso Clínico.**

Propuesto por la **CD Stephanie Citlali De La Cruz Ramos**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que la sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**ATENTAMENTE**

  
**MC. Jesús Isaías De León Ramírez**  
Sinodal

Ccp.- Archivo.

Tijuana, Baja California a, 24 de septiembre de 2024

**Comité de Estudios de Posgrado  
Especialidad en Odontología Pediátrica  
Presente**

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **Desarrollo de un Dentífrico Preparado con Nanopartículas de Plata para Evaluación Antimicrobiana y Caso Clínico.**

Propuesto por la **CD Stephanie Citlali De La Cruz Ramos**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que la sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**ATENTAMENTE**



**Dra. Perla Elena Núñez Serafín**  
Sinodal

Ccp.- Archivo.

Tijuana, Baja California a, 24 de septiembre de 2024

**Comité de Estudios de Posgrado  
Especialidad en Odontología Pediátrica  
Presente**

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **Desarrollo de un Dentífrico Preparado con Nanopartículas de Plata para Evaluación Antimicrobiana y Caso Clínico.**

Propuesto por la **CD Stephanie Citlali De La Cruz Ramos**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que la sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**ATENTAMENTE**



**Dra. Betsabé De La Cruz Corona**  
Sinodal

Ccp.- Archivo.

Tijuana, Baja California a, 24 de septiembre de 2024

**Comité de Estudios de Posgrado  
Especialidad en Odontología Pediátrica  
Presente**

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **Desarrollo de un Dentífrico Preparado con Nanopartículas de Plata para Evaluación Antimicrobiana y Caso Clínico.**

Propuesto por la **CD Stephanie Citlali De La Cruz Ramos**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que la sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional.

**ATENTAMENTE**

  
**Dra. María Fernanda Araiza Verduzco**  
Sinodal

Ccp.- Archivo.

## **Agradecimientos**

A Dios por guiarme y darme la fuerza para seguir adelante todos los días.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por su respaldo para el desarrollo de esta investigación.

A mi familia, por ser el ejemplo y el motor que me hacen querer ser mejor cada día, su apoyo incondicional me permite soñar en grande.

A la Dra. Patricia Serrano, por exceder los límites de la docencia y convertirse en mi amiga; y al Dr. Jorge Cortez por tener la bondad de apoyar a una extraña. Gracias por el impulso que me trajo hasta aquí.

A mis docentes, especialmente a la Dra. Patricia Preciado Bórquez, Dra. Perla Elena Núñez Serafín, Dra. Betsabé De La Cruz Corona, Dra. Nancy Sánchez y Dra. Irma Alicia Verdugo Valenzuela por formarme como una especialista profesional y ética. Gracias por el ejemplo de lo que es ser una mujer inteligente y poderosa.

A mi director de tesis el Dr. Esteban Hernández Guevara y mi codirector el MCS Jesús Isaías De León Ramírez por llevarme paso a paso y enseñarme con paciencia lo necesario para concluir y llevar este proyecto al otro lado del mundo.

A todas las personas que me han acompañado a lo largo de mi formación profesional, amigas, amigos y colegas, su amistad me ayudó a superar las dificultades del camino, y a mi perrita Tomasa, por acostarse en mis piernas durante las largas horas de escritura de este trabajo.

Finalmente agradezco a la joven que soñó con llegar hasta aquí y a la que superó su miedo para ponerse en marcha. Primero fui ellas para convertirme en quien soy hoy.

## **Dedicatoria**

A mis padres **Guillermina Ramos Alvarado** y **José Luis De La Cruz De La Cruz**, por enseñarme que puedo lograr todo lo que me proponga, por ponerme en el camino correcto para conseguirlo y por darme las herramientas necesarias para alcanzarlo.

Antes de ser y de obtener cualquiera de las cosas que hoy tengo fui una niña feliz que creció por su amor, paciencia y sacrificio.

## Resumen

**Introducción.** La biopelícula dental patógena o placa dentobacteriana, es la predecesora de las dos enfermedades que más afectan a la población pediátrica actualmente: la caries y la enfermedad periodontal. Actualmente la caries como enfermedad afecta a más del 50% de la población pediátrica, lo que en cifras se refiere a 1.76 billones de niños a nivel mundial, principalmente afectando a los dientes temporales. La higiene bucal adecuada realizada principalmente mediante el cepillado dental con dentífrico reduce la formación de biopelícula dental patológica siendo la acción de prevención por excelencia. De acuerdo con su origen a las nanopartículas (NP) se les atribuyen distintas propiedades como la antimicrobiana en el caso de las nanopartículas de plata (AgNP), de las cuales, su estudio en el área odontológica puede traer distintos beneficios como control de la biopelícula dental patológica.

**Objetivo.** Realizar la síntesis y caracterización de un prototipo de dentífrico a base de nanopartículas de plata como principio activo.

**Material y método.** Se realizó la síntesis de las nanopartículas de plata (AgNP) mediante del método de reducción química en solución acuosa, se realizó la reducción de la sal de Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) con borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ). Para su caracterización se utilizaron las técnicas de Ultravioleta visible (UV-Vis), potencial Z y Dispersión dinámica de la luz (DLS). Finalmente, las AgNP sintetizadas y caracterizadas se incluyeron en la síntesis del prototipo de dentífrico. Se realizaron 5 síntesis diferentes variando la cantidad de AgNP: 0% (control), 1%, 2.5%, 5% y 10% de

porcentaje en peso. Finalmente se realizó el análisis de la actividad antimicrobiana exponiendo el prototipo de dentífrico a cepas ATCC y clínica.

**Resultados.** Del método de síntesis se obtuvo un líquido de color amarillo brillante, que al caracterizarlo por medio del estudio de UV-Vis se observó un pico de absorbancia máximo a de 402 nanómetros que al representarlo en un diagrama de cromaticidad CIE a esa longitud de onda se observa el tono amarillo brillante obtenido, ambas son características de las nanopartículas de plata con configuración esférica de 100 nm de diámetro aproximadamente. Para conocer la estabilidad de las NP se utilizó el análisis de potencial zeta, obteniendo un pico a -2 mV, este dato indica que la carga superficial de la nanopartícula en solución es negativa lo cual es muy favorable para evitar su aglomeración. Finalmente, la prueba de DLS confirmó que el tamaño de las AgNP en solución es de 115 nm. A partir de la solución de AgNP se realizó la síntesis del prototipo de dentífrico con 5 concentraciones: 0%, 1%, 2.5%, 5% y 10% de porcentaje en peso de AgNP. En el estudio antimicrobiano se observó inhibición de la actividad de los microorganismos presentes en la muestra clínica y en las cepas ATCC.

**Conclusión.** Se obtuvo la síntesis de AgNP de configuración esférica de un diámetro de 115 nm, con carga superficial negativa en solución, estables con características que evitan la aglomeración. Se obtuvo un prototipo de dentífrico con 5 concentraciones que tiene actividad antimicrobiana al exponerlo a cepas clínicas y ATCC.

*Palabras clave. Nanopartículas de plata, AgNP, Síntesis, caracterización dentífrico, caries*

## Abstract

**Introduction.** Pathogenic dental biofilm or dental plaque is the precursor of the two diseases that currently affect the pediatric population the most: caries and periodontal disease. Currently, caries as a disease affects more than 50% of the pediatric population, which in figures refers to 1.76 billion children worldwide, mainly affecting temporary teeth. Adequate oral hygiene, mainly performed by brushing teeth with toothpaste, reduces the formation of pathological dental biofilm, being the preventive action par excellence. According to their origin, nanoparticles (NP) are attributed with different properties such as antimicrobial in the case of silver nanoparticles (AgNP), of which, their study in the dental area can bring different benefits such as control of pathological dental biofilm.

**Aim.** To carry out the synthesis and characterization of a prototype of toothpaste based on silver nanoparticles as active ingredient.

**Material and method.** The synthesis of silver nanoparticles (AgNP) was carried out by the chemical reduction method in aqueous solution, the reduction of the silver nitrate salt ( $\text{AgNO}_3$ ) was carried out with sodium borohydride ( $\text{NaBH}_4$ ). For its characterization, the techniques of ultraviolet visible (UV-Vis), Z potential and dynamic light scattering (DLS) were used. Finally, the synthesized and characterized AgNPs were included in the synthesis of the toothpaste prototype. 5 different syntheses were carried out varying the amount of AgNP: 0% (control), 1%, 2.5%, 5% and 10% of weight percentage. Finally, the analysis of the antimicrobial activity was carried out by exposing the toothpaste prototype to ATCC and clinical strains.

**Results.** From the synthesis method, a bright yellow liquid was obtained, which when characterized by means of the UV-Vis study, a maximum absorbance peak was observed at 402 nanometers, which when represented in a CIE chromaticity diagram at that wavelength, the bright yellow tone obtained is observed, both are characteristics of silver nanoparticles with a spherical configuration of approximately 100 nm in diameter. To know the stability of the NPs, the zeta potential analysis was used, obtaining a peak at -2 mV, this data indicates that the surface charge of the nanoparticle in solution is negative, which is very favorable to avoid its agglomeration. Finally, the DLS test confirmed that the size of the AgNPs in solution is 115 nm. From the AgNP solution, the synthesis of the toothpaste prototype was carried out with 5 concentrations: 0%, 1%, 2.5%, 5% and 10% of weight percentage of AgNP. In the antimicrobial study, inhibition of the activity of microorganisms present in the clinical sample and in ATCC strains was observed.

**Conclusion.** The synthesis of AgNPs with a spherical configuration of 115 nm in diameter, with a negative surface charge in solution, stable with characteristics that prevent agglomeration, was obtained. A toothpaste prototype with 5 concentrations was obtained that has antimicrobial activity when exposed to clinical strains and ATCC.

*Keywords.* Silver nanoparticles, AgNP, Synthesis, toothpaste characterization, decay

# Contenido

Capítulo I .....	1
1 Introducción.....	1
2 Antecedentes .....	3
3 Marco Teórico .....	13
3.1 Problemas principales de la salud oral .....	13
3.1.1 Caries y enfermedad periodontal.....	13
3.1.2 Biopelícula dental y <i>Streptococcus mutans</i> .....	14
3.2 Nanociencia.....	16
3.3 Nanopartículas .....	17
3.4 Nanopartículas de plata (AgNP) .....	18
3.5 Síntesis.....	22
3.6 Caracterización .....	26
3.6.1 Tamaño y morfología de las nanopartículas .....	26
3.6.2 Propiedades superficiales y estabilidad.....	27
4 Planteamiento del Problema.....	29
5 Justificación.....	31
6 Hipótesis.....	33
7 Objetivos .....	34
8 Materiales y métodos.....	35
8.1 Metodología.....	40
9 Resultados y discusión .....	47
9.1 Síntesis y caracterización de AgNP.....	47
9.2 Prototipo de dentífrico y actividad antimicrobiana .....	50
10 Conclusiones .....	54
11 Recomendaciones.....	55
Capítulo II .....	56
12 Caso clínico.....	56
12.1 Introducción .....	60
12.2 Antecedentes .....	62
12.3 Objetivo .....	63
12.4 Descripción del caso. ....	63

12.5	Resultados.....	67
12.6	Discusión.....	67
12.7	Conclusión.....	68
13	Referencias Bibliográficas.....	69
14	Anexos.....	72

## Índice de tablas y figuras

Tabla 1 Técnicas fisicoquímicas analizadas en las técnicas de caracterización	23
Tabla 2 Operación de Variables	37
Figura 1 Tecnologías involucradas en la fabricación de nanomateriales	20
Figura 2 Métodos de síntesis utilizados en la fabricación de AgNP	22
Figura 3 Síntesis de nanopartículas de plata	38
Figura 4 Celdas de cuarzo utilizadas para la caracterización	39
Figura 5 Método de síntesis del prototipo de dentífrico	40
Figura 6 Prototipo de dentífrico con 5 concentraciones de AgNP distintas	41
Figura 7 Procedimiento para análisis antimicrobiano	42
Figura 8 Recolección de muestra clínica	43
Figura 9 Análisis espectral UV-Vis	44
Figura 10 Análisis de Dispersión dinámica de la Luz (DLS)	45
Figura 11 Gráfico de distribución de Potencial Z	46
Figura 12 Resultado de prueba antimicrobiana de muestra clínica	48
Figura 13 Resultado de la síntesis de prototipo de dentífrico	49
Figura 14 Análisis de la actividad antimicrobiana	49
Figura 15 Paciente 8 años, estado clínico inicial	60
Figura 16 Estudio radiográfico inicial	61
Figura 17 Toma de muestra de biopelícula dental	62
Figura 18 Primer sembrado	63
Figura 19 Ensayo de la actividad antimicrobiana	63
Figura 20. Resultado de ensayo antimicrobiano	

# Capítulo I

## 1 Introducción

La salud oral mantiene una relación muy cercana con la salud general de un individuo<sup>1</sup>. La biopelícula dental patógena o placa dentobacteriana, es la predecesora de las dos enfermedades que más afectan a la población pediátrica actualmente: la caries y la enfermedad periodontal<sup>2</sup>. Actualmente la caries como enfermedad afecta a más del 50% de la población pediátrica, lo que en cifras se refiere a 1.76 billones de niños a nivel mundial, principalmente afectando a los dientes temporales<sup>2,3</sup>. La higiene bucal adecuada realizada principalmente mediante el cepillado dental con pasta reduce la formación de biopelícula dental patológica siendo la acción de prevención por excelencia<sup>4</sup>.

El ecosistema oral es un medio donde habitan millones de microorganismos, entre ellos aquellos que son responsables de la formación de la biopelícula dental<sup>5</sup>, entre ellos se encuentra el *Streptococcus mutans*, la cual es una bacteria Gram positiva anaerobia facultativa asociada con el inicio y desarrollo de la caries<sup>2</sup>. La exposición continua de microorganismos patógenos con el hospedero puede ocasionar la maduración de una biopelícula dental que al no ser removida durante varias horas o días puede llevar al desarrollo temprano de lesiones cariosas<sup>1</sup>.

Hoy en día existen distintos medios para lograr el control exitoso de la biopelícula dental patógena. Entre ellos se encuentra el uso de la terapéutica a base de fluoruro, por ejemplo, agua, sal común, enjuagues bucales, pastas dentales y barnices<sup>1,2</sup>. Otras medidas preventivas comúnmente realizadas por los profesionales

son la profilaxis dental, selladores de fosetas y fisuras, cambio de hábitos como la limitación de alimentos altos en azúcares y uso adecuado de herramientas para la higiene bucal como lo son el hilo dental, enjuague bucal, cepillos, cepillos interdentales y pastas<sup>2,3</sup>.

A pesar de la gran disponibilidad de las medidas mencionadas anteriormente, el control de la biopelícula dental patológica sigue siendo un reto para la prevención y el manejo de caries y enfermedad periodontal, debido al serio problema de salud pública que estas dos enfermedades representan<sup>2</sup>.

La nanotecnología es la ciencia que se encarga del estudio, creación, diseño, síntesis, identificación, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas a través del control de la materia en dimensiones cercanas al intervalo de 1-100 nanómetros<sup>6</sup>, de acuerdo a su origen a las nanopartículas (NP) se les atribuyen distintas propiedades como la antimicrobiana en el caso de las nanopartículas de plata (AgNP), de las cuales, su estudio en el área odontológica puede traer distintos beneficios como control de la biopelícula dental patológica<sup>7,8</sup>.

## 2 Antecedentes

Jiménez-Ramírez AJ, Martínez-Martínez RE, Ayala-Herrera JL, et al. Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles against Clinical Biofilms from Patients with and without Dental Caries. J Nanomater 2021;2021<sup>7</sup>.

La caries dental es una enfermedad multifactorial que a pesar de ser prevenible tiene una alta incidencia en la población, es considerada un problema de salud pública a nivel mundial. Los factores causales son diversos, sin embargo, la placa dentobacteriana sigue considerándose como el agente etiológico principal de esta enfermedad. Los factores que llevan a producir un biofilm dental patológico son un desbalance de los microorganismos presentes en la placa, una baja capacidad buffer de la saliva y un consumo excesivo de carbohidratos fermentables. Actualmente, aunque existe una amplia variedad de terapias de control y prevención de caries, como las medidas públicas las herramientas para el cepillado y los métodos preventivos que el odontólogo realiza en el consultorio dental, estos no son accesibles para los estratos más pobres de la sociedad, por esta razón se ha decidido buscar agentes con propiedades fisicoquímicas avanzadas que se enfocan en agentes antimicrobianos que además son de bajo costo. Recientemente el uso de nanopartículas con agentes antimicrobianos como las Nanopartículas de plata (AgNP) son una opción para la prevención del desarrollo de infecciones dentales, así como para prevenir el avance de las lesiones cariosas. Jiménez y colaboradores llevaron a cabo un estudio con el objetivo de determinar la frecuencia y presencia de microorganismos involucrados en la formación de biofilm dental y de explorar la asociación de condiciones

sociodemográficas generales y clínicas, así como la inhibición de su crecimiento por la presencia de las AgNP. En el estudio participaron 60 sujetos de un rango de edad de 18 a 50 años. Se dividieron en dos grupos de 30 sujetos cada uno, donde, uno de los grupos estuvo conformado por sujetos con lesiones cariosas y el otro por sujetos sin lesiones cariosas. En ambos grupos se obtuvieron muestras de biofilm dental de la zona cervical de los dientes posteriores para realizar un cultivo bacteriano inicial que posteriormente se sometería a un ensayo antibacterial con las AgNA obtenidas a partir de nitrato de plata, previamente sintetizado y caracterizado en dos tamaños diferentes. Se formaron colonias de los biofilms obtenidos a partir de ambos grupos y se inocularon con una concentración mínima inhibitoria de AgNP. El crecimiento de microorganismos fue mayor en los sujetos con lesiones cariosas ( $120:6 \pm 18.4 \mu\text{g/mL}$ ), que en los que no tenían caries ( $77:7 \pm 21:2 \mu\text{g/mL}$ ) ( $p < 0:05$ ), por lo que los sujetos con caries representaron resistencia a las AgNP más significativa. Para los dos tipos de sujetos, las partículas de AgNP más pequeñas tuvieron significativamente más propiedades antimicrobianas ( $152.0-103.7 \mu\text{g/mL}$ ). Lograron identificar la efectividad de la actividad antimicrobiana de la AgNP sobre bacterias del biofilm dental de sujetos con y sin lesiones cariosas. Además, resaltaron como las partículas más pequeñas obtenidas de AgNA tienen mayor efecto bactericida. Las AgNP mostraron potencial para ser usadas en la prevención y el control de la caries dental.

Schwass DR, Lyons KM, Love R, Tompkins GR, Meledandri CJ. Antimicrobial Activity of a Colloidal AgNP Suspension Demonstrated In Vitro against Monoculture Biofilms: Toward a Novel Tooth Disinfectant for Treating Dental Caries. *Adv Dent Res* 2018;29(1):117–123.<sup>9</sup>

El cambio en las estrategias utilizadas para el tratamiento de la caries dental ha llevado a una odontología que implica la eliminación parcial o mínima de la lesión cariosa, por lo cual en este estudio se desarrolló una nueva formulación de nanopartículas de plata (AgNP) como aplicación específica para la desinfección de la dentina cariada. El nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) se redujo químicamente usando borohidrato de sodio (NaBH<sub>4</sub>) en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) para formar estructuras agregadas de micelas que incluyeran AgNP monodispersas estabilizadas de 6.7 a 9.2 nm. Las AgNP se caracterizaron mediante medición de la conductividad eléctrica y la dispersión dinámica de la luz, microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión y espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente. La actividad antimicrobiana de las AgNP se probó frente a cultivos planctónicos de bacterias orales Gram + y Gram- representativas mediante ensayos de difusión en caldo de soya tríptico y biopelículas de monocultivo cultivadas con infusión de cerebro y corazón +/- sacarosa anaeróticamente a 37°C en placas de microtitulación. La masa de biopelícula se midió mediante un ensayo de cristal violeta. Los efectos se compararon con cultivos expuestos a fluoruro diamino de plata y clorhexidina como controles negativos y a isopropanol al 70% como control positivo. En presencia de AgNP, las pruebas por triplicado contra las cepas de *Streptococcus gordonii* DL1, C219, G102 y ATCC10558, *Streptococcus mutans* UA15, *Streptococcus*

*mitis* I18; y *Enterococcus faecalis* JH22 para las bacterias planctónicas, las concentraciones inhibitoras mínimas fueron tan bajas como 7.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y las concentraciones bactericidas mínimas tan bajas como 19.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de concentración de plata. Las lecturas de microplacas que detectan la absorción de luz violeta cristal a 590 nm mostró diferencias estadísticamente significativas entre las biopelículas expuestas a AgNP y donde no se utilizaron agentes antimicrobianos. La presencia de sacarosa no influyó en la sensibilidad de ninguna de las bacterias. En conclusión, al prevenir la formación de biopelículas in vitro para varios *Streptococcus spp.* y *E. faecalis* la formulación de AgNP demuestra potencial para aplicaciones clínicas inhibiendo biopelículas.

Favaro JC, Detomini TR, Maia LP, et al. Anticaries Agent Based on Silver Nanoparticles and Fluoride: Characterization and Biological and Remineralizing Effects-An In Vitro Study. Int J Dent 2022;2022<sup>10</sup>.

Los agentes anticaries tópicos proporcionan un método no invasivo para controlar y prevenir la caries dental. Las nanopartículas de plata son un antimicrobiano muy eficaz, cuya acción es mayor en comparación con su forma iónica. El objetivo de este estudio consistió en caracterizar y evaluar la estabilidad, actividad antimicrobiana, citotoxicidad y los efectos remineralizantes de las nanopartículas de plata y el agente anticaries fluorado (AgF) sobre la tinción del esmalte dental. Se preparó una solución experimental de AgF y se comparó con fluoruro diamino de plata (SDF). Primeramente, se caracterizó el AgF y la estabilidad se evaluó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se utilizaron cepas de *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli* para evaluar la concentración mínima inhibitoria, bactericida y la citotoxicidad contra células fibroblásticas L929 mediante la prueba MTT. Se obtuvieron lesiones parecidas a las lesiones cariosas por medio de la inducción del ciclo del pH en muestras de esmalte intacto de dientes humanos, posterior a eso se midió la microdureza, microdureza transversal (CSMH), se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM), rayos X de energía dispersiva y espectroscopia (EDS). También se tomaron fotografías para analizar la tinción del esmalte. El AgF mostró estabilidad a largo plazo con acciones bacteriostáticas y bactericidas sin citotoxicidad. En cuanto a la remineralización del esmalte en superficie y en profundidad (CSMH) se observó que cuando se utilizó el AgF fue similar al SDF. Las pruebas SEM y EDS mostró precipitación de esmalte, se observó la presencia de los elementos P, Ca, Au, Ag y Cl.

A diferencia del SDF el AgF no tiñó el esmalte. Por lo anterior el agente anticaries de fluoruro de plata probado presentó estabilidad a largo plazo, capacidad remineralizante superficial y profunda con potencial antimicrobiano y biocompatibilidad sin teñir el esmalte.

Ahmed F, Prashanth S, Sindhu K, Nayak A, Chaturvedi S. Antimicrobial efficacy of nanosilver and chitosan against *Streptococcus mutans*, as an ingredient of toothpaste formulation: An in vitro study. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* 2019;37(1):46–54<sup>1</sup>.

Estudio experimental, *in vitro* enfocado en la eficacia del quitosano, las AgNP y los fluoruros como ingredientes activos en pastas dentales contra el *Streptococcus mutans*. Estos agentes químicos poseen actividad antimicrobiana que ha sido incluida en múltiples productos de higiene dental. Los efectos del cepillado y el uso de pasta dentífrica para remover el biofilm dental son un medio más sencillo, efectivo y económico de prevención que una intervención posterior. Las colonias de *S. mutans* (MTCC 890) fueron cultivadas en un caldo de infusión cerebro-corazón a 37 °C por 24 horas. Posteriormente fueron utilizadas para inocular las placas de agar con el microorganismo.

Los tres dentífricos utilizados fueron obtenidos de sus respectivos distribuidores, se prepararon de la siguiente forma: se midieron 2 gramos de cada una y se disolvieron en 2 mililitros de agua destilada. Se nombraron como muestra A- AgNP, muestra B- quitosano, Muestra C- Fluorada, Muestra D- Salina (control). Estas muestras se convirtieron en los grupos 1, 2,3 y 4 para el ensayo antimicrobiano.

La actividad antimicrobiana de los dentífricos fue determinada por la técnica de difusión de agar modificada. Se realizó con 20 placas de agar de *Mitis salivarius* preparados con sucrosa al 10%, inoculados con 0.5 ml de cultivos de *S. mutans* de 24 horas y se dejaron secar por 1 hora. Se colocaron las soluciones de dentífrico en 4 placas distintas para cada grupo. Después se incubaron a 37° centígrados por 24

horas. La actividad antimicrobiana se evaluó midiendo el diámetro de las zonas de inhibición. La técnica estadística utilizada fue Unpaired t-test. Utilizando como criterio valor de  $P < 0.05$ . El software utilizado para el análisis de los datos fue SPSS 20, IBM, Armonk, NY, USA. Microsoft Word y Excel se utilizaron para generar tablas y gráficos. El resultado más alto registrado fue el del Grupo 1(AgNP), seguido del Grupo 3 (Fluorado), Grupo 2 (Chitosan) y finalmente el Grupo 4 que no mostró ninguna inhibición. Estos resultados arrojaron un valor de significancia de  $P < 0.0001$ . Las conclusiones a las que llegaron fueron las siguientes: en todos los grupos experimentales se encontró actividad antimicrobiana contra el *S. mutans*, excepto el grupo de control. El dentífrico con AgNP mostró la actividad antibacteriana más alta entre los grupos, seguida del dentífrico fluorado y el que contenía chitosano. El dentífrico con AgNP es efectivo para el control de biofilm dental.

Pérez SMG, Valenzuela CM, García ZDJ, Constandse CDA, Nava MS, Cuevas GJC et al. Nanopartículas de plata contra bacterias presentes en biofilm dental de pacientes pediátricos. Rev ADM. 2022; 79 (4)<sup>2</sup>.

El biofilm dental es considerado el precursor de diferentes enfermedades orales como la caries y la enfermedad periodontal. Las nanopartículas de plata (AgNP) representan uno de los principales materiales utilizados para el control de diversas enfermedades, debido a su efecto antimicrobiano en distintas especies, incluyendo bacterias orales. Aunque diversos estudios han demostrado que las AgNP pueden actuar en la inhibición de crecimiento de diversas biopelículas bacterianas, incluyendo algunos tipos de biofilm oral, actualmente no existe información científica que haya determinado el efecto antimicrobiano de las AgNP en muestras de biofilm dental tomadas directamente de pacientes pediátricos con enfermedades relacionadas a la presencia de biopelícula dental. Por lo anterior, el objetivo del estudio consistió en evaluar la actividad antimicrobiana de las AgNP contra muestras de biofilm dental aislada de pacientes pediátricos con y sin caries. Se prepararon dos tamaños de AgNP, a partir de AgNO<sub>3</sub> en solución a 0.001 M en 250mL de solución salina. Se obtuvieron AgNP pequeñas ( $10.2 \pm 22.71$  nm) y grandes ( $29.3 \pm 36.35$  nm) de forma esférica. Las AgNP se caracterizaron utilizando dispersión dinámica de luz. Se recolectaron muestras de biopelícula dental de 22 pacientes infantiles en una edad promedio de  $7.4 \pm 3.5$ , algunos de los pacientes presentaban caries y otros no. Una vez cultivada la muestra se estandarizó la concentración de la suspensión a través de espectrometría hasta obtener una concentración de  $1.3 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Las muestras de biopelícula dental fueron cultivadas en caldo Müller- Hinton

(MH) 18 horas a 37°C antes de la prueba. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se hizo en placas de microdilución de 96 pocillos, se colocaron 200 µl de AgNP en la primera columna y se realizó la dilución 1:1 con MH, se inocularon con suspensiones estandarizadas de cada muestra que contenían  $1.3 \times 10^6$  UFC/mL; finalmente, las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. El último pozo que presentó turbidez se consideró como la concentración mínima inhibitoria (CMI). El potencial Zeta mostró que las AgNP obtenidas tenían cargas eléctricas negativas, bien definidas, intensas y estables que ofrecen características para evitar la aglomeración. El crecimiento inicial bacteriano de la población estudiada se evaluó mediante densidad óptica, no hubo diferencia significativa entre los pacientes que presentaron lesiones cariosas y los que no. Sin embargo, si hubo una diferencia estadísticamente significativa que apunta a una tendencia a que el género masculino presenta mayor resistencia bacteriana comparado con el género femenino. El crecimiento bacteriano entre los dos tamaños de AgNP tuvo diferencias significativas. Además, se encontró una correlación positiva significativa (0.000,  $p < 0.05$ ) en cuanto a la concentración de tratamiento con la velocidad de crecimiento bacteriano. Las AgNP se pueden considerar como una alternativa para el control de la biopelícula dental y de esta manera para la prevención de diferentes enfermedades orales en pacientes pediátricos.

### **3 Marco Teórico**

El uso de la plata en la ciencia lleva estudiándose desde hace años, sus aplicaciones en el campo de la odontología son muy prometedoras y relevantes cada vez más en un área que se inclina cada vez más hacia un enfoque preventivo en lugar de restaurador.

Difícilmente se puede hablar de odontología sin hablar de la caries como enfermedad, por lo tanto, es importante aclarar el origen y la naturaleza de la enfermedad que más afecta a la población mundial para poder dimensionar el impacto y la importancia que tiene la incursión de un material antimicrobiano como las nanopartículas de plata (AgNP) en esta área.

#### **3.1 Problemas principales de la salud oral**

##### **3.1.1 Caries y enfermedad periodontal**

La población infantil está gravemente afectada por los problemas de salud oral más comunes actualmente. La caries dental es una enfermedad bucodental multifactorial grave que provoca la desmineralización de los tejidos duros del diente y afecta a más de la mitad de la población mundial<sup>2,11</sup>, en números, aproximadamente a 1.76 billones de niños a nivel mundial<sup>3</sup>. México cuenta con una prevalencia elevada de caries dental, hoy en día los factores ambientales, socioculturales, zona de residencia, sexo, tipo de dentición, índice de masa corporal y nivel socioeconómico tienen impacto en la distribución y gravedad de la enfermedad<sup>11</sup>.

A su vez la caries dental es un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, producto del metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria, que

con el tiempo puede producir una pérdida neta de minerales y posiblemente, aunque no siempre, resultará en la presencia de una cavidad<sup>12</sup>.

### 3.1.2 Biopelícula dental y *Streptococcus mutans*

Las bacterias orales pertenecen a una comunidad compleja de numerosas especies que participan en la formación de la placa bacteriana (biofilm dental o biopelícula)<sup>12</sup>. El biofilm dental es considerado como el precursor de diferentes enfermedades, entre ellas la caries y las enfermedades periodontales<sup>2</sup>. Por definición esta es una microcomunidad compleja de diversas especies bacterianas que se reproducen y se adhieren firmemente a las diferentes superficies de los dientes formando una estructura bien organizada<sup>2,5</sup>, actualmente, se contemplan varios microorganismos que se incluyen en la patogénesis de la caries dental como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp* y *Actinomyces spp*, de los cuales el *Streptococcus mutans* es el principal precursor<sup>2,5,12</sup>.

La caries y la enfermedad periodontal son causadas por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas de biopelículas que se forman naturalmente y ayudan a mantener el estado normal de la cavidad oral, la complejidad de la enfermedad como la conocemos se debe a los factores que están asociados con la evolución de una población bacteriana que pasa de una biopelícula saludable a otra patógena<sup>12</sup>.

Una biopelícula sana puede formarse por más de 700 especies bacterianas, de las cuales menos del 1 % son bacterias potencialmente patogénicas, esta actúa como medio de defensa de primera línea en contra de infecciones por bacterias patogénicas u otros patógenos<sup>5,12</sup>. Cambios en el medio dentro de la misma provocan que se

favorezca la proliferación de especies patogénicas acidúricas y acidogénicas y que tomen posesión de esta<sup>12</sup>.

La formación de la biopelícula dental es fundamental para la vida bacteriana del *Streptococcus mutans*. La cual es una bacteria Gram +, anaerobia facultativa, su principal mecanismo de cariogenicidad se presenta por su capacidad de sintetizar grandes cantidades de polímeros extracelulares denominados glucano y secundariamente fructanos a partir de sacarosa, lo cual ayuda a la colonización de las superficies duras y en el desarrollo de la matriz polimérica extracelular insoluble principalmente, además de metabolizar y transportar un amplio número de carbohidratos en ácidos orgánicos (teicoico y lipoteicoico) y adicionalmente sobrevivir en ambientes significativamente bajos<sup>2</sup>, los ácidos formados por esta bacteria circulan a través de la placa dental hacia el esmalte poroso, disociándose y liberando hidrogeniones, los cuales disuelven rápidamente el mineral del esmalte, generando calcio y fosfato que se difunden fuera del esmalte, este proceso es conocido como desmineralización<sup>12</sup>. Diversos estudios han demostrado que una dieta alta en azúcares y carbohidratos proveerán el ambiente necesario para la proliferación de este microorganismo aumentando considerablemente su actividad y a su vez las probabilidades de padecer caries dental<sup>7</sup>.

El crecimiento en biopelículas proporciona las condiciones óptimas para el sistema de señalización entre las células bacterianas que facilitan el intercambio genético y generar factores de virulencia. Debido a su capacidad de alcanzar altas densidades en áreas confinadas como el caso de válvulas cardíacas, aparatos protésicos, criptas amigdalinas o senos nasales, entre otras, es que reside su importancia como patógenos oportunistas fuera de la cavidad oral<sup>12</sup>.

La exposición continua de microorganismos patógenos con el hospedero, como bien puede ser la maduración de una placa dentobacteriana que no se ha removido en varias horas o días, puede llevar al desarrollo temprano de caries dental en niños<sup>1</sup>, siendo así que el biofilm dental sea considerado hoy en día como el precursor de enfermedades como los son la caries dental y algunas patologías periodontales<sup>7</sup>.

Aunque la presencia de cierto tipo de bacterias se considera común para la humanidad como especie, es bien sabido que el perfil bacteriano de un individuo va a depender del lugar en que habite, de su tipo de dieta y de sus hábitos de higiene, entre otros. En los niños un factor determinante será la edad, así pues, se encuentran diferencias en el perfil bacteriano de la placa dentobacteriana entre aquellos que presentan dentición temporal completa y los que cuentan con dentición mixta temprana<sup>5</sup>.

### **3.2 Nanociencia**

La nanotecnología es la ciencia que se encarga del estudio, creación, diseño, síntesis, identificación, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas a través del control de la materia en dimensiones cercanas al intervalo de 1-100 nanómetros, así como de la exploración de fenómenos y propiedades de la materia a dicha escala<sup>6</sup>. Es un campo de investigación cada vez más amplio que participa en la producción de nanomateriales o nanopartículas (NP)<sup>8</sup>.

Las nanopartículas han tenido una larga historia en relación con la ciencia moderna, ya que su estudio se ha aplicado en diversas áreas. Se les hizo alusión por primera vez en 1959 en el discurso de Richard Feynman “En el fondo hay espacio de sobra”, donde se mencionaba la factibilidad y el uso potencial de materiales en tamaño

nanométrico, planteó el uso de átomos individuales para la creación de nuevas estructuras de tamaño reducido con diferentes propiedades, introduciendo positivamente a la nanotecnología a la industria del cuidado de la salud denominada nanomedicina<sup>13</sup>.

### **3.3 Nanopartículas**

Como se mencionó anteriormente las nanopartículas son materiales que oscilan en un rango de tamaño de 1 a 100 nm, que incluye cambios físicos, químicos y biológicos en medios fundamentales tanto de átomos y moléculas específicas como de su masa resultante. Debido a la versatilidad de sus aplicaciones hoy en día se les puede encontrar en áreas como la medicina, genética, farmacéutica, cosmética, industria alimentaria, mecánica, óptica, industria química y electrónica entre otras<sup>8</sup>. Dentro de la disciplina de la odontología se ha aprovechado en diversas áreas de estudio como la restauradora, periodoncia, ortodoncia y endodoncia entre otras<sup>13</sup>. Se piensa que puede mejorar las propiedades de las pastas dentales ayudando al proceso de mineralización del diente para detener lesiones cariosas y reducir la sensibilidad dental, así como controlar el crecimiento bacteriano, o proporcionar minerales para mejorar el control del pH. Además, se han desarrollado nanopartículas para ser utilizadas como portadores biológicos dentro de biofilms en productos de cuidado oral, como en dentífricos y enjuagues bucales. Su objetivo es inhibir a los microorganismos y bloquear sus mecanismos de variación fenotípica, que les permiten adaptarse y sobrevivir en condiciones ambientales adversas<sup>6</sup>.

Así pues, las Nanopartículas o NP, son sistemas prometedores que se pueden utilizar para la administración de fármacos gracias a las diversas ventajas que posee,

tales como su tamaño, la relación de superficie a masa y las propiedades fisicoquímicas<sup>7</sup>. Dentro de esas ventajas destacan las propiedades antimicrobianas que pueden presentar y la actividad biológica frente a diversos microorganismos, tales como las bacterias presentes en la cavidad bucal que a su vez son responsables de la formación de placa dentobacteriana<sup>13</sup>.

Las nanopartículas antimicrobianas se utilizan cada vez más para combatir procesos infecciosos, como alternativa a los antibióticos convencionales, la terapia antimicrobiana con estos materiales resulta ventajosa por sus propiedades físico químicas únicas, por el tamaño ultra pequeño, por la relación superficie- masa y reactividad química<sup>13</sup>.

Por otra parte, ciertos elementos químicos de carácter mineral han formado parte del campo médico desde la antigüedad debido a sus propiedades medicinales, como el caso de la plata (Ag), debido a sus propiedades terapéuticas y bactericidas<sup>13</sup>.

### **3.4 Nanopartículas de plata (AgNP)**

Las nanopartículas de plata son consideradas partículas coloidales sólidas<sup>13</sup>, además representan uno de los materiales utilizados para el control de enfermedades diversas , debido que se ha demostrado el gran efecto antimicrobiano que posee sobre distintas especies y bacterias Gram positivas y Gram negativas, actualmente se conoce su actividad contra más de 650 microorganismos<sup>8</sup> incluyendo diversas bacterias colonizadoras orales como lo son el *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Enterococcus faecalis*, entre otras, e incluyendo otro tipo de microorganismos como hongos y virus

para las cuales los iones de plata liberados por las AgNP tienen un efecto bacteriostático y bactericida<sup>2,7,8</sup>.

Aunque no sabe el mecanismo exacto del efecto antibacteriano de las AgNP debido elementos relevantes que pueden intervenir en su acción, tales como su carga eléctrica, tamaño, forma, riesgo de aglomeración, afinidad química, formación de radicales libres, cationes Ag<sup>+</sup> libres, absorción y presentación entre otras<sup>7</sup>, sin embargo, se han propuesto algunas teorías<sup>9,10,13</sup>.

Una de ellas se refiere a la capacidad de las AgNP de liberar continuamente iones de Ag, estos iones son principalmente reactivos y tóxicos para los microorganismos, ya que pueden adherirse a la pared celular y la membrana citoplasmática bacteriana, por su atracción electrostática y su afinidad por las proteínas de azufre, nitrógeno u oxígeno<sup>9,13</sup>. También se cree que los iones que se adhieren a la pared celular pueden aumentar la permeabilidad celular provocando la destrucción de la envoltura bacteriana causando la lisis celular<sup>10,13</sup>.

Los iones de plata también pueden inhibir la síntesis de proteínas, desnaturalizando los ribosomas. Se cree que puede existir una inhibición de la producción de Adenosín Trifosfato (ATP), debido a que los iones de plata inactivan las enzimas respiratorias a nivel de la membrana citoplasmática<sup>9,13,14</sup>.

Otras teorías mencionan que los iones de plata pueden evitar la replicación de material genético y por ende detener la multiplicación celular o pueden desnaturalizar o perforar la membrana, produciendo daños en los organelos o inhibiendo la actividad de la enzima fosfomanosa isomerasa, alterando así la glucólisis catabólica de los carbohidratos causando la lisis celular<sup>9,13</sup>. También se ha informado de que inducen la defosforilación dependiente de la dosis de proteínas fosforiladas en tirosina

involucradas en la replicación y recombinación del ADN en algunas bacterias, lo que afecta la reproducción celular, siendo esto más efectivo para bacterias Gram – que para las Gram +<sup>9</sup>.

Aun a pesar de que se desconozca su funcionamiento exacto, el hecho de que a menor diámetro de AgNP tengan mayor actividad bactericida se debe a que aumenta el tamaño de la superficie; es decir, a medida que disminuye el diámetro de la partícula aumenta la relación entre el área superficial y el volumen<sup>15</sup> y es esa capacidad antibiótica tan efectiva lo que permite que las AgNP actúen en la inhibición de diversas biopelículas bacterianas, incluyendo algunos tipos de biofilm oral<sup>7</sup>, convirtiéndolo en un agente antimicrobiano muy eficaz con efectos antifúngicos, antituberculosos, antiangiogénicos, antiinflamatorios y funciones anti permeabilidad, siempre que su efectividad sea localizada y su exposición controlable<sup>8,13</sup>.

La plata en forma ionizada es inerte, pero al exponerse a la humedad libera iones Ag<sup>+</sup> capaces de formar complejos con ácidos nucleicos e interactuar especialmente con los nucleósidos en lugar de con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos. Por lo tanto, es correcto decir que todos los tipos de plata o compuestos a base de plata con funciones antimicrobianas son de una u otra manera fuentes alternativas de iones Ag<sup>+</sup>. Estos iones Ag<sup>+</sup> pueden incluirse en el material y liberarse gradualmente o derivarse de la ionización de la superficie de una porción sólida de plata, cuyo caso corresponde a las AgNP<sup>8</sup>.

La formación de los iones de Ag<sup>+</sup> es compleja y restringida, ya que su acción solo existe en un corto periodo, pero esta limitación se ha solucionado mediante el uso de AgNP las cuales exhiben una reactividad mejorada sobre la plata iónica, que garantizan un mejor potencial antibacteriano a través del estímulo de producción de

oxígeno mediante reactivos, debido a la mayor relación entre el área superficial y volumen de las nanopartículas, el cual aumenta exponencialmente a medida que se reduce el tamaño de las partículas<sup>8,9</sup>. Los efectos dependientes del tamaño y la forma de las AgNP que pueden afectar la actividad antimicrobiana se encuentran bien documentados, por lo que hoy en día es posible saber que el mayor efecto antimicrobiano se observa en las nanopartículas más pequeñas, ya que se realiza un aumento de la energía superficial<sup>8,9</sup>. Esto les confiere gran absorción óptica y catálisis, sumado a esto las AgNP facilitan las resonancias de plasmones superficiales mientras se ubican en un entorno dieléctrico, lo que mejora la capacidad de absorción óptica<sup>8</sup>. Las bacterias Gram + son menos vulnerables a los iones de plata en comparación con las bacterias Gram -, debido a que la pared celular de las bacterias Gram + está compuesta de moléculas de peptidoglucano y, a diferencia de las bacterias Gram -, tienen peptidoglucano adicional<sup>8</sup>.

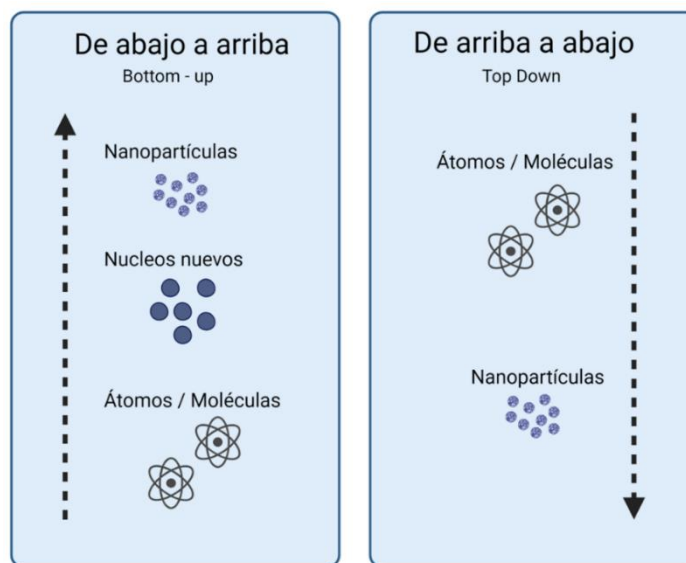
Es decir, las bacterias Gram + tienen una pared celular más gruesa y peptidoglucano cargado negativamente, mientras que los iones de plata tienen carga positiva, por lo cual es posible que el peptidoglucano atrape más plata en las bacterias Gram + que en las Gram -, sin embargo, la acción bactericida de las AgNP se ve afectada por su forma, tamaño, concentración y estado coloidal<sup>8</sup>.

La presencia de nanopartículas de plata en la composición de los materiales representa una ventaja importante sobre aquellos que utilizan la plata en forma iónica, como es el fluoruro diamino de plata (SDF), ya que su inclusión elimina el daño estético causado por la pigmentación de la superficie<sup>14,16</sup>. Sin embargo, para que esto suceda es necesario estabilizar las AgNP en una solución coloidal para que no haya interacción constante con las bacterias<sup>10,14</sup>.

Dentro de las posibles aplicaciones de las propiedades antimicrobianas de las AgNP se encuentra su inclusión en compuestos de resina, permitiendo la reducción de microorganismos por contacto directo, como remineralizante en lesiones cariosas incipientes en forma de Nano fluoruro de plata<sup>13</sup>. La presencia de flúor crea una sinergia con las AgNP que promueve la remineralización del esmalte dental<sup>10</sup>

### 3.5 Síntesis

Las tecnologías involucradas en la fabricación de nanomateriales en general son **De abajo a arriba -bottom- up-** o **De arriba a abajo -top-down-** (Figura 1). El método top-down utiliza procesos físicos, es un método donde un material a granel es sometido a un proceso de molienda para reducir el tamaño de sus partículas a uno nanométrico para el cual se necesita aplicar energía. Destacan por su uso las técnicas de homogenización de alta presión (HAP), la microfluidización, la nanomolienda asistida en medio líquido, litografía, descomposición térmica, fresado mecánico, grabado y pulverización catódica entre otros (Figura 2)<sup>8,13</sup>.



**Figura 1. Tecnologías involucradas en la fabricación de nanomateriales<sup>8</sup>**

La producción de AgNP a partir del método top-down se realiza a partir del método de condensación/ evaporación empleando un horno tubular a presión atmosférica. Esta técnica representa varias desventajas ya que ocupa un espacio muy amplio, utiliza una gran cantidad de energía mientras aumenta la temperatura atmosférica cerca de la sustancia fuente y requiere de varios minutos para alcanzar la estabilidad térmica. Aunado a esto la principal restricción es la insuficiencia de la estructura de la superficie siendo esto un problema debido a que ciertas características físicas de las NP dependen en gran medida de la estructura de la superficie<sup>8,17,18</sup>.

Por otro lado, el método Bottom – up, es contrario al método top- down, utiliza procesos químicos y biológicos mediante el autoensamblaje de átomos en núcleos nuevos que se encuentran en una solución coloidal, que se agrupan en una en una partícula a nanoescala. es decir, procesos de formación de nanopartículas a partir de una solución, se da un “ensamblaje” de moléculas y átomos para formar estructuras más grandes, pero de tamaño nanométrico<sup>8,13,17,18</sup>.

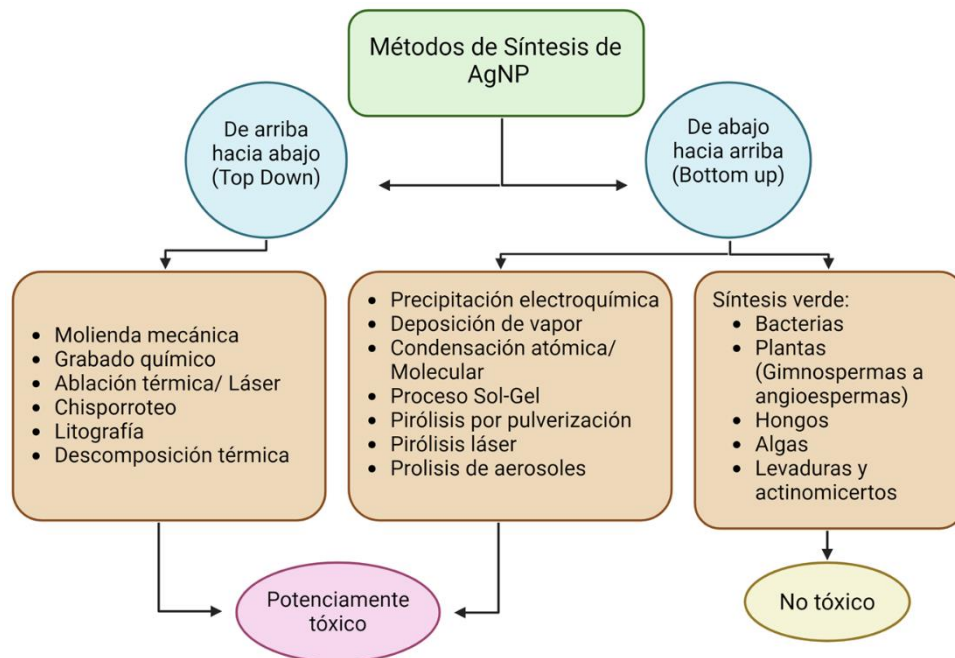
Se debe considerar que, en función del método, los tamaños de las nanopartículas pueden ser muy variables, es así que el método físico permite producir grandes cantidades de NP, pero al mismo tiempo produce un amplio rango de tamaños de partícula diferentes, siendo esta la principal desventaja del método. Por el contrario, el método bottom- up permite sintetizar tamaños de nanopartículas uniformes y con un tamaño de partícula estrecho<sup>13</sup>.

En el caso de las AgNP se emplea la técnica de reducción química basada en la reducción con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$  acuoso) en un medio adecuado mediante el uso de reductores químicos como puede ser el citrato de sodio o el borohidruro de sodio que dará como resultado AgNP cargadas negativamente. Un cambio en el agente

reductor puede dar como resultado AgNP con carga positiva, por lo tanto, las características fisicoquímicas y morfológicas pueden modificarse dependiendo de la aplicación de las concentraciones de precursores<sup>8,17,18</sup>.

El uso de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) como agente reductor favorece la generación instantánea de núcleos que resultaran en AgNP monodispersas y de tamaño uniforme. Sin embargo, no es fácil obtener NP de tamaño mayor a 20nm empleando la reducción con borohidruro<sup>19</sup>.

Como se mencionó previamente, el tamaño de las nanopartículas es de suma importancia y deben mantenerse normalmente en el rango de 10 a 100 nm, mediante el uso de agentes de protección<sup>8</sup>. Los tamaños de las NP menores a 10 nm y mayores a 100 nm no producen efecto terapéutico, esto debido a que las partículas muy pequeñas son filtradas y eliminadas del cuerpo humano a través de los riñones y las partículas muy grandes son absorbidas por el sistema reticuloendotelial para ser eliminadas<sup>13</sup>.



**Figura 2. Métodos de síntesis utilizados en la fabricación de AgNP<sup>8</sup>**

El avance de las prácticas de investigación actualmente permite la síntesis verde (Figura 2), la cual está recibiendo atención por encima de los procesos físicos y químicos debido a que es ecológica, económica, fácilmente reproducible para comercialización, libres de altas temperaturas, presión, energía y productos químicos tóxicos. También son aptas para una producción a gran escala de NP<sup>8</sup>.

Entre las técnicas utilizadas para la síntesis de AgNP se han reportado aquellas que utilizan bacterias, hongos o plantas; debido a sus propiedades antioxidantes o reductoras la aplicación de platas y sus extractos ha despertado interés por sus ventajas al ser una técnica rápida, respetuosa del medio ambiente, no patógena y rentable<sup>8</sup>.

Técnicas	Características fisicoquímicas analizadas
Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)	Composición elemental y química en la superficie
Potencial Z	Estabilidad referida a la carga superficial
Espectroscopía Infrarroja (MS)	Estructura y conformación de bioconjugados, análisis de grupos funcionales
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	Tamaño y distribución de tamaño, forma, agregación
Microscopio de Transmisión por Electrones (TEM)	Tamaño y distribución de tamaño, heterogeneidad de formas, agregación
Dispersión Dinámica de la Luz	Distribución de tamaño hidrodinámico
Microscopía Óptica de Barrido de Campo Cercano (NSOM)	Tamaño y forma de los nanomateriales
Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	Estructura composición, pureza
Espectrometría de Masas (MS)	Peso molecular, composición, estructura
Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	Tamaño y distribución de tamaño, forma, estructura, agregación

**Tabla 1. Técnicas fisicoquímicas analizadas en las técnicas de caracterización<sup>8</sup>**

## 3.6 Caracterización

La caracterización de las NP es importante para comprender y controlar la síntesis, así como para analizarlas y describirlas<sup>8,15</sup>. Existen distintos tipos incluidas las técnicas microscópicas, de separación y espectroscópicas, aunque por lo general en la literatura se clasifican por su distribución de tamaño, morfología, propiedades superficiales, estabilidad e interacciones (Tabla1)<sup>15</sup>.

### 3.6.1 Tamaño y morfología de las nanopartículas

#### 3.6.1.1 *Microscopia Electrónica de Barrido*

La Microscopia Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés) es una técnica para la obtención de imágenes superficiales, que emplea un haz de electrones para interactuar con una muestra y generar diversas señales, a través de esta técnica se pueden obtener datos sobre el tamaño, la distribución de tamaños y la morfología de las NP, así como inferir la pureza de la muestra y su grado de agregación<sup>15</sup>.

#### 3.6.1.2 *Microscopia de Fuerza Atómica*

La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) es una herramienta esencial para estudiar la morfología de superficies con resolución nanométrica como para mediciones de fuerzas sensoriales. Las imágenes se obtienen detectando las fuerzas de atracción – repulsión entre la superficie de la muestra y una sonda afilada. La fuerza

se mide a través de un sistema de fotodiodo láser que detecta la diferencia de voltajes en la salida del fotodetector<sup>15</sup>.

### 3.6.1.3 *Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)*

La Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) también conocida como Espectroscopia de Correlación de Fotones (PCS, por sus siglas en inglés), es una técnica ampliamente utilizada para determinar el tamaño de las NP. Utiliza un láser de luz monocromática que, al dispersarse en un detector de fotones, ilumina una suspensión coloidal y detecta las fluctuaciones en la intensidad de la luz provocadas por el movimiento browniano de las partículas. Estas fluctuaciones están relacionadas con el tamaño de las partículas.

Entre las principales ventajas de la DLS se encuentra su capacidad para proporcionar información sobre la distribución de tamaños de partículas en un breve intervalo de tiempo<sup>15</sup>.

### 3.6.2 Propiedades superficiales y estabilidad

Las técnicas más comunes para el análisis de propiedades superficiales son el Potencial Z, la Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS), la Espectroscopia Fotoeléctrica de Rayos X (XPS), la Espectroscopias Infrarroja Transformada de Fourier y Raman (FTIR), éstas técnicas son indicativas de la composición química de la superficie de las nanopartículas. Los detalles de forma y tamaño solo es posible determinarlos con técnicas microscópicas<sup>15</sup>.

### 3.6.2.1 *Potencial Z*

El análisis de potencial Z es empleado para evaluar la carga superficial y la estabilidad de una suspensión coloidal de nanopartículas. Es crucial para comprender las interacciones de las NP con las membranas celulares. Este análisis se lleva a cabo mediante la medición de la movilidad electroforética de partículas cargadas cuando se somete a un potencial eléctrico aplicado<sup>15</sup>.

Simplemente se refiere al valor potencial electrostático en el plano de deslizamiento imaginario (también denominado a superficie de corte hidrodinámico), es decir, la superficie donde las partículas interactúan entre sí con otras superficies. La magnitud del Potencial Z ha servido durante mucho tiempo como indicador de estabilidad de la dispersión frente a la agregación o deposición. Los valores superiores a  $\pm 30$  mV se consideran moderadamente estables frente a la agregación, debido a la estabilización de carga (repulsión electrostática)<sup>20</sup>.

El avance y conocimiento de las técnicas de síntesis y caracterización de las nanopartículas, especialmente de las AgNP permite una mayor precisión en su producción y una mejor comprensión de sus efectos en la salud oral. Sin embargo, es crucial continuar investigando y optimizando estas tecnologías para maximizar sus beneficios clínicos y garantizar su seguridad y eficacia en aplicaciones odontológicas. La integración de las AgNP en productos de cuidado oral, como pastas dentales y enjuagues bucales, enfatiza la necesidad de una evaluación continua de su impacto y efectividad en la práctica dental moderna.

## 4 Planteamiento del Problema

La biopelícula dental es un problema que afecta a la mayor parte de la población infantil en el mundo, esta es la responsable de problemas como desmineralización dental y caries. La formación de estas biopelículas comienza con un cambio en el medio causando en las bacterias, que habitan de forma natural y libre, actividad patológica. Sumado a esto, en México existe una cultura de desinformación que ha provocado que los cuidadores desconozcan la forma y frecuencia correcta en que debe realizarse la higiene dental en edades tempranas que como consecuencia permite a las biopelículas dentales patógenas permanecer por largos periodos en la superficie dental.

En pacientes con alto riesgo de caries, como lo son aquellos con aparatología ortodóntica, de escasos recursos, con poco acceso a la atención dental, pacientes con discapacidad motriz o aquellos que se encuentran tomando inmunosupresores por enfermedades sistémicas; el control a largo plazo es complicado y requiere del total compromiso de los cuidadores, en muchas ocasiones además se necesitan diferentes aditamentos que complementen el tratamiento los cuales son de alto costo y de difícil acceso.

El cepillado dental sigue siendo el medio más efectivo para el control de la placa dentobacteriana patógena, por lo que es necesario acompañarlo de un agente de limpieza eficaz que logre disolverla en un periodo corto cuya actividad pueda permanecer el tiempo suficiente en la superficie dental y a su vez crear el medio necesario para favorecer la remineralización dental.

En la actualidad, aunque se cuenta con una gran variedad de pastas y enjuagues en el mercado, no existe ningún medio que cumpla las características mencionadas. La

plata se ha utilizado en la odontología desde hace tiempo, sin embargo, los usos de las nanopartículas de plata en esa disciplina han sido poco estudiados a pesar de demostrar ser un bactericida seguro y eficaz.

Aunque eliminar en su totalidad los microorganismos que habitan en la cavidad oral es imposible, es necesario contar con un dentífrico que disuelva la formación de biopelícula dental patógena que sea seguro para su uso en población pediátrica y en pacientes con alto riesgo de caries.

Por lo anterior se llega a la siguiente pregunta de investigación:

¿Cómo es la actividad antimicrobiana de un dentífrico preparado con nanopartículas de plata?

## 5 Justificación

Realizar un control de la biopelícula dental patógena es indispensable para un tratamiento exitoso. Contar con un agente de limpieza ambulatorio de manejo sencillo y fácil acceso facilitará enormemente la labor diaria del odontólogo pediatra que enfrenta casos de pacientes con un alto riesgo de caries como lo son aquellos que padecen o padecieron de caries de la infancia temprana, que cuentan con aparatología ortodóntica, con enfermedades sistémicas, con discapacidad motriz, de escasos recursos y aquellos que tienen dificultades para acceder a la atención odontológica.

El uso y funcionamiento de las nanopartículas de plata ha sido ampliamente estudiado en productos de grado médico, se han demostrado sus propiedades bactericidas en contra de microorganismos Gram +, Gram – y algunos hongos. Sin embargo, en el ámbito de la odontología, aunque la plata se ha utilizado desde hace mucho tiempo, el uso de esta en forma de nanopartículas ha tenido poco estudio.

A largo plazo, contar con un dentífrico a base de nanopartículas de plata, permitirá al profesional realizar una planeación más detallada con pronósticos más favorables, ya que le permitirán disolver la biopelícula dental patógena y devolver rápidamente las condiciones que favorecen la remineralización dental. Entre otras ventajas se encuentran las siguientes: uso como complemento en técnicas de mínima intervención, manejo simple que no requiere uso de aerosoles, preservación de estructura sana, remineralización del tejido afectado, así como podrá prevenir la progresión de la lesión cariosa manteniendo la estética ya que su composición nanométrica le concede la característica de no oscurecer el tejido.

En camino hacia una odontología más preventiva el uso de este dentífrico permitirá realizar menos restauraciones, ya que al controlar de forma más efectiva la formación de biopelícula dental, el ciclo de desmineralización de los tejidos del diente, que puede llevar al desarrollo de caries, se detendrá desde etapas tempranas. En combinación con los barnices fluorados y de sustancias como el Fosfopéptido de caseína - Fosfato de calcio amorfo (CPP- ACP) se podría potenciar su efecto remineralizante. En pacientes con lesiones cariosas activas será una opción restaurativa que arrete estas lesiones incipientes volviéndola una opción para ser llevada a las comunidades en las que el acceso a la salud odontológica es escaso, mejorando notablemente la calidad de salud oral que puede ofrecerse de forma ambulatoria en brigadas odontológicas.

Este estudio es solo el principio para el progreso de múltiples investigaciones que favorezcan el desarrollo de un producto que puede ser utilizado como un agente anticaries, con el fin de que la fórmula de la pasta dental obtenida pueda comercializarse y distribuirse en grandes cantidades.

## **6 Hipótesis**

### Hipótesis de Trabajo

El dentífrico preparado a base de nanopartículas de plata presentará actividad antimicrobiana en contra de cepas clínicas y ATCC.

### Hipótesis Nula

El dentífrico preparado a base de nanopartículas de plata no presentará actividad antimicrobiana en contra de cepas clínicas y ATCC.

## 7 Objetivos

### Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana de un dentífrico preparado con nanopartículas de plata contra cepas clínicas y ATCC.

### Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar las AgNP.
2. Elaborar un prototipo de dentífrico a partir de AgNP previamente sintetizadas con concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5% y 10% de AgNP (porcentaje en peso).
3. Determinar la actividad antimicrobiana a partir del halo de inhibición producido por la exposición del dentífrico a las cepas clínicas y ATCC.

## 8 Materiales y métodos

### Tipo de estudio y diseño general

Experimental *in vitro*

### Selección de la muestra

El universo de estudio consistió en 5 cepas bacterianas (*Eacherichia coli* 25922, *Estafilococcus aureus* 25923, *Estafilococcus aureus resistente a la meticilina* MRSA 43300, *Enteorococcus faecalis* 29212, *Pseudomonas* 27853), etiquetadas y catalogadas por el Laboratorio de Química de los Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

### Criterios

#### *Criterios de inclusión*

- Cepa clínica obtenida de un paciente que acudió a la clínica de Especialidad en Odontología Pediátrica de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y trabajada en el laboratorio de Microbiología del Centro Universitario de Educación en Salud de la Universidad Autónoma de Baja California (CUES UABC)
- Cepas ATCC disponibles en el Laboratorio de Química de los Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa

#### *Criterios de exclusión*

- Cepas ATCC sin disponibilidad

## **Aspectos éticos**

### *Proceso de selección o reclutamiento*

Las cepas clínicas utilizadas en el estudio fueron aisladas y cultivadas por el laboratorio de Microbiología del Centro Universitario de Educación en Salud de la Universidad Autónoma de Baja California (CUES UABC) todas las muestras para obtener las cepas fueron donadas voluntariamente al laboratorio para su estudio.

### *Carta de derecho de los animales*

No aplica

### *Alternativas terapéuticas*

No aplica

### *Riesgos potenciales de los sujetos de estudio y personal participante*

El personal participante, utilizó en todo momento las barreras de protección personal como lo son lentes, careta, gorro, cubrebocas, guantes y bata para la manipulación de las cepas bacterianas.

### *Procedimiento para el manejo de riesgos*

La manipulación de las cepas se realizó en todo momento como un material de potencial infectocontagioso alto, por lo tanto, los investigadores utilizaron todas las barreras de protección personal necesarias para la manipulación de las cepas durante

los procedimientos. Una vez procesadas las muestras, los residuos fueron dispuestos de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para la protección ambiental, salud ambiental y manejo de residuos patológico-biológico-infeccioso.

*Beneficios potenciales.*

Conocer la actividad antimicrobiana de la formulación de un prototipo de dentífrico en contra de cepas clínicas y ATCC disponibles.

*Margen de riesgo-beneficio*

Riesgo mínimo de contagio por infección bacteriana.

*Costos e incentivos inherentes a los sujetos humanos de prueba*

No aplica. No hubo sujetos humanos de prueba en la investigación.

*Financiamiento para el estudio*

Beca de apoyo estudiantil CONAHCYT

*Impacto colateral en personal participante*

No existió ningún riesgo o impacto para alguno de los participantes.

*Declaración de conflicto de intereses*

No existió conflicto de intereses dentro de los investigadores, se anexa documento. (Anexo 1)

*Uso de especies biológicas*

Se utilizaron cepas clínicas y ATCC aisladas y cultivadas en el laboratorio en placas de Petri en medio de cultivo.

#### *Confidencialidad*

No aplica.

#### **Recursos humanos**

- Investigador principal: CD Stephanie Citlali De La Cruz Ramos
- Director de tesis: Dr. Esteban Hernández Guevara
- Codirector de tesis: MC Jesús Isaías De León Ramírez
- Sinodal: Dra. Perla Elena Núñez Serafín
- Sinodal: Dra. Betsabé De La Cruz Corona
- Sinodal: Dra. María Fernanda Araiza Verduzco

## Variables

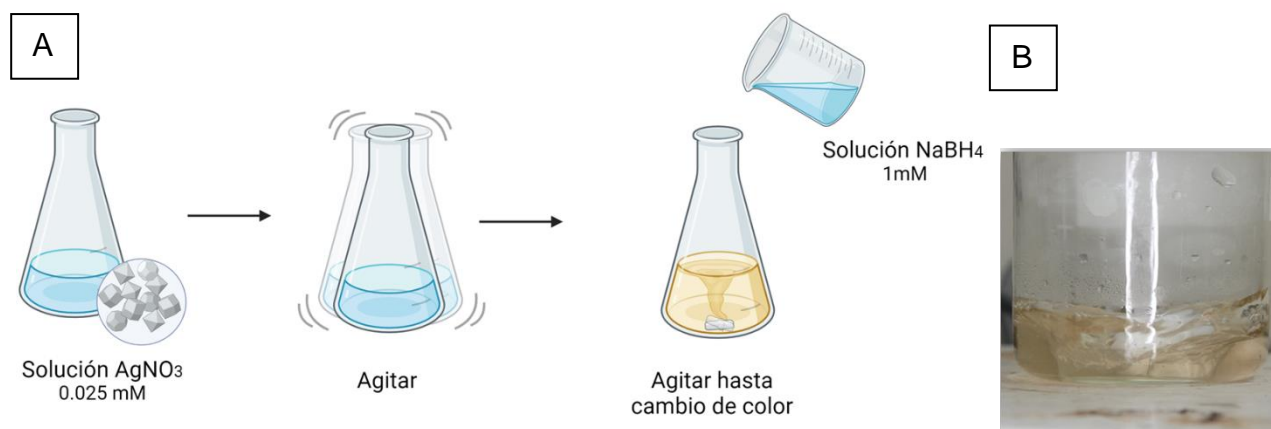
A continuación, se muestran las variables independientes y dependientes en su definición conceptual y operacional (Tabla 2).

Operación de Variables	
Variabes Independientes	Definición
Concentración de AgNP	Magnitud que expresa la cantidad de porcentaje en peso de nanopartículas de plata agregadas a la síntesis del prototipo de dentífrico
Cepas ATCC	Microorganismos certificados utilizados en diferentes disciplinas, para el control de calidad en microbiología.
Cepa Clínica	Grupo de microorganismos pertenecientes a una misma especie y que provienen de una muestra en particular.
Variable Dependiente	Definición
Actividad antimicrobiana	Presencia o ausencia de microorganismos patógenos en un área determinada, que se ven afectados por las concentraciones de las AgNP.

**Tabla 2. Operación de Variables**

## 8.1 Metodología

Para la realización del presente estudio se pidieron los permisos pertinentes para utilizar las instalaciones del laboratorio de microbiología del Centro Universitario de Educación en Salud de la Universidad Autónoma de Baja California CUES -UABC, en una primer sesión se realizó la Síntesis de Nanopartículas de plata, la cual se llevó a cabo a partir del método de reducción química en solución acuosa descrito por Vera V. Pinto en 2010 (Figura 3.A)<sup>21</sup>. Se prepararon 100 mL de una solución que contenía Nitrato de Plata,  $\text{AgNO}_3$ , (Reactivo Baker Analyzed ®, Fisher Scientific S.L. Madrid, España) y agua desionizada. La concentración de  $\text{AgNO}_3$  fue de 0.25 mM, se mantuvo en agitación durante 30 segundos. Después se añadió a la mezcla una solución de 1mM de Borohidruro de sodio,  $\text{NaBH}_4$ , (Reactivo Dr. Chem's Essentials). La solución inmediatamente se tornó amarilla y se agitó durante 60 segundos para después ser almacenada hasta la caracterización (Figura 3.B).



**Figura 3. Síntesis de nanopartículas de plata.** A. Método propuesto por Vera V. Pinto. B. Solución obtenida inmediatamente al terminar la síntesis.

La caracterización se realizó en las instalaciones del laboratorio de microbiología de la Universidad Autónoma de Baja California unidad Valle de las Palmas después de

obtener los permisos necesarios, se realizó de la siguiente forma: se utilizaron dos celdas de cuarzo (Perkin Elmer, Estados Unidos) para espectrofotómetro Digital UV-Vis (Espectrofotómetro UV- Visible Genesys 50), una con agua destilada como blanco, en la otra se colocó la solución de AgNP obtenida de la síntesis y fueron llevadas al Espectrofotómetro (Espectrofotómetro UV- Visible Genesys 50) para su estudio, la absorbancia de la solución se midió en un rango espectral de 200 a 800 nm, también se utilizó un equipo para medición de potencial Zeta (Zetasier Pro, Malvern Panalytical Ltd) que funciona sobre la base de la dispersión dinámica de la luz (DLS) para la medición del potencial Zeta (Figura 4).

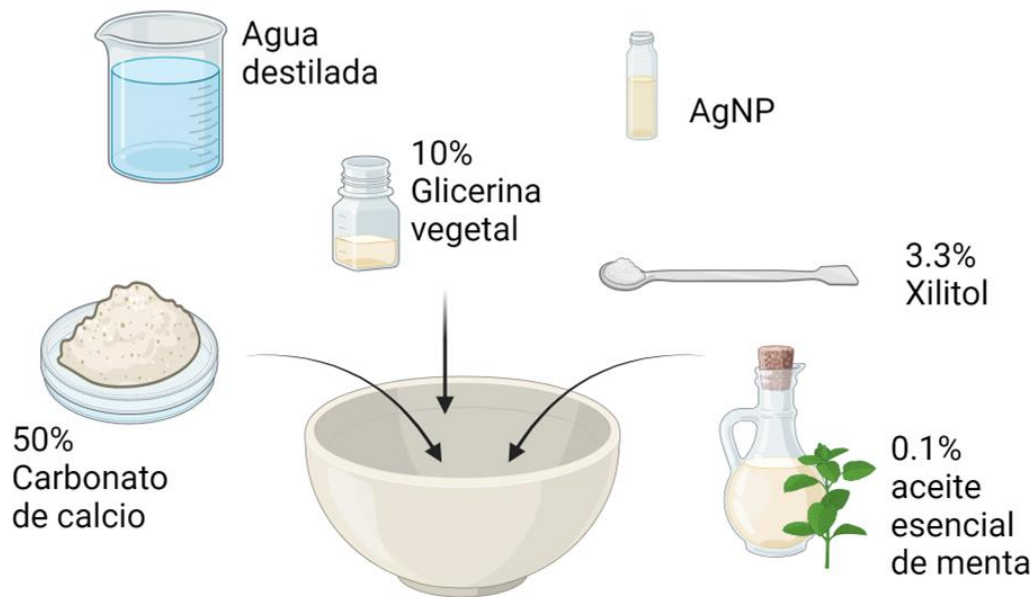


**Figura 4. Celdas de cuarzo utilizadas para la caracterización.** A la izquierda celda con agua destilada, a la derecha celda con solución de AgNP

Para la síntesis del prototipo de dentífrico se tomó como base la formulación propuesta por Batlle C. Edo en 2001(Figura 5). Para un total de 100% de preparación de pasta se utilizó: 60% de polvo de carbonato de calcio, 10% de líquido glicerina

vegetal, 3.3% de polvo de xilitol, 0.1% de aceite esencial de menta, CBP de AgNP y agua destilada cuya cantidad fue variable según la consistencia, aproximándose al 15%.

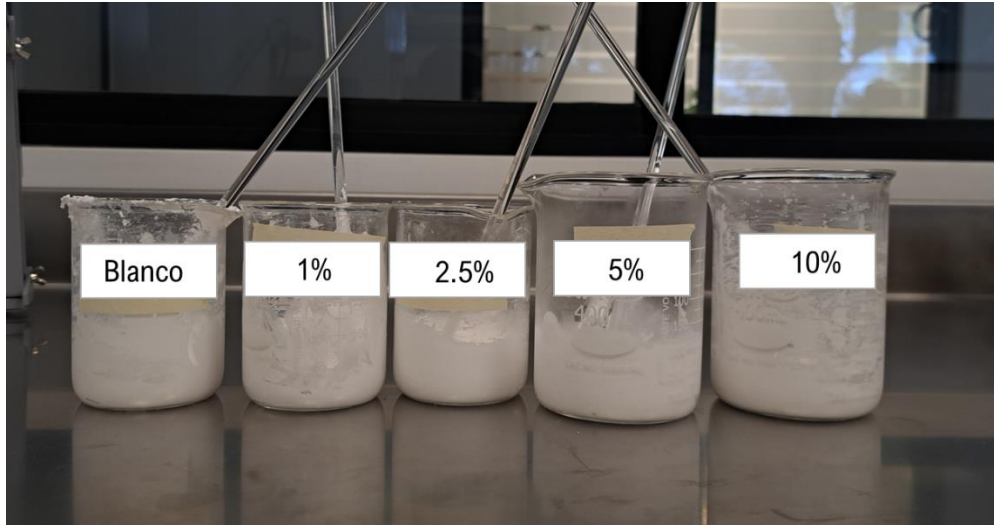
La preparación se realizó de la siguiente manera: en un tazón se colocó el carbonato de calcio, después se agregó la glicerina vegetal y se mezclaron hasta integrarse. Posteriormente se agregó el xilitol, el aceite esencial de menta y de nuevo se mezcló hasta distribuirlos uniformemente (Figura 5).



**Figura 5. Método de síntesis del prototipo de dentífrico**

Una vez obtenida la mezcla base se dividió en 5 partes a las cuales se les añadieron las AgNP en 5 concentraciones distintas (Blanco 0%, 1%, 2.5%, 5% y 10% de porcentaje en peso) para finalmente agregar el agua destilada poco a poco hasta

alcanzar una consistencia ideal y obtener una pasta homogénea (Figura 6). Finalmente se pasó a un recipiente limpio para su almacenamiento.

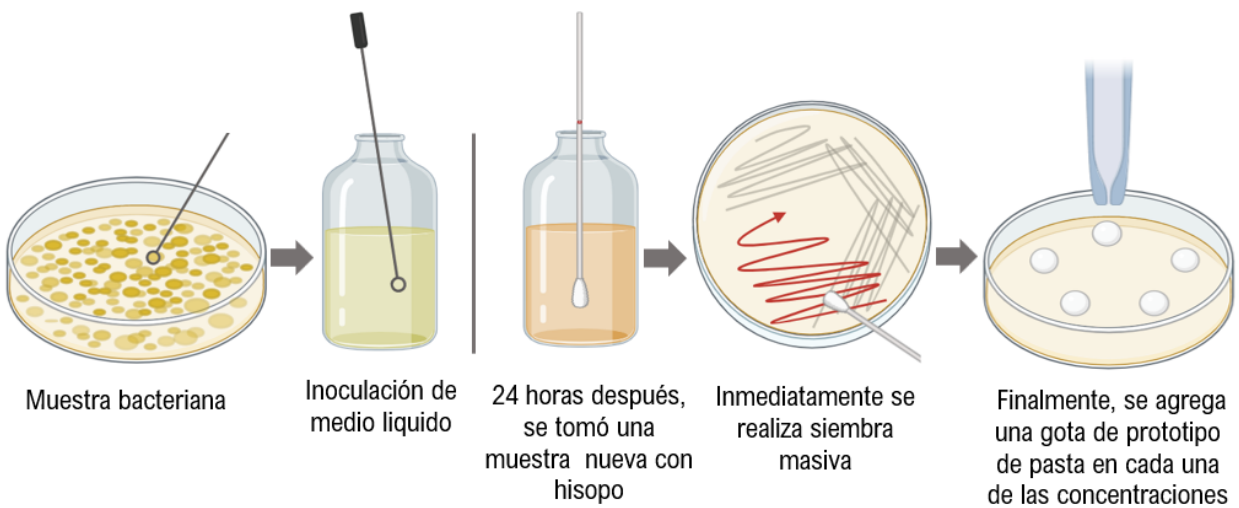


**Figura 6. Prototipo de dentífrico con 5 concentraciones de AgNP distintas. De izquierda a derecha: Blanco, 1mL, 2.5mL, 5 mL y 10mL**

La capacidad antimicrobiana se evaluó en cinco cepas ATCC disponibles en el Laboratorio de Química de los Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa las cuales fueron las siguientes: *Eacherichia coli* 25922, *Estafilococcus aureus* 25923, *Estafilococcus aureus resistente a la meticilina MRSA* 43300, *Enteorococcus faecalis* 29212, *Pseudomonas* 27853.

Este procedimiento se realizó dentro de una campana de flujo laminar vertical (MiniJPCV24. JPinglobal). A partir de la muestra bacteriana preparada con antelación; en una placa Petri con medio de Cultivo Agar Müller Hilton sólido; se utilizó un asa bacteriana para inocular un tubo de ensayo con cultivo líquido Müller Hilton previamente esterilizado en una autoclave de laboratorio (JP Selecta™ Vertical Stand) que se dejó reposar 24 horas para favorecer el crecimiento bacteriano (Figura 7).

Pasadas las 24 horas de crecimiento se introdujo un hisopo una sola vez para tomar muestra del caldo y realizar la siembra mediante técnica de siembra masiva en una nueva placa Petri con Agar Müller Hilton sólido, se colocó una gota del prototipo de dentífrico de cada una de las distintas concentraciones de AgNP y se dejó reposar nuevamente. El procedimiento se repitió con cada una de las cepas, nuevamente se dejaron reposar y tras 24 horas se observó el crecimiento de cada una (Figura 7).



**Figura 7. Método para análisis de actividad antimicrobiana.** Se repitió el proceso con cepas ATCC y la cepa clínica.

El método descrito anteriormente se repitió para la cepa clínica obtenida de una paciente de 10 años que acudió a la clínica de Especialidad de Odontología Pediátrica de la Universidad Autónoma de Baja California.

La recolección de la muestra se llevó a cabo con un hisopo a partir de la cara vestibular de la pieza dentaria 13 en la zona del cuello dental, en la clínica de Odontología Pediátrica de la Universidad de Baja California, y se probó con el prototipo de pasta de 5% y 10% de porcentaje en peso en las instalaciones de CUES – UABC, repitiendo el proceso mencionado con anterioridad.

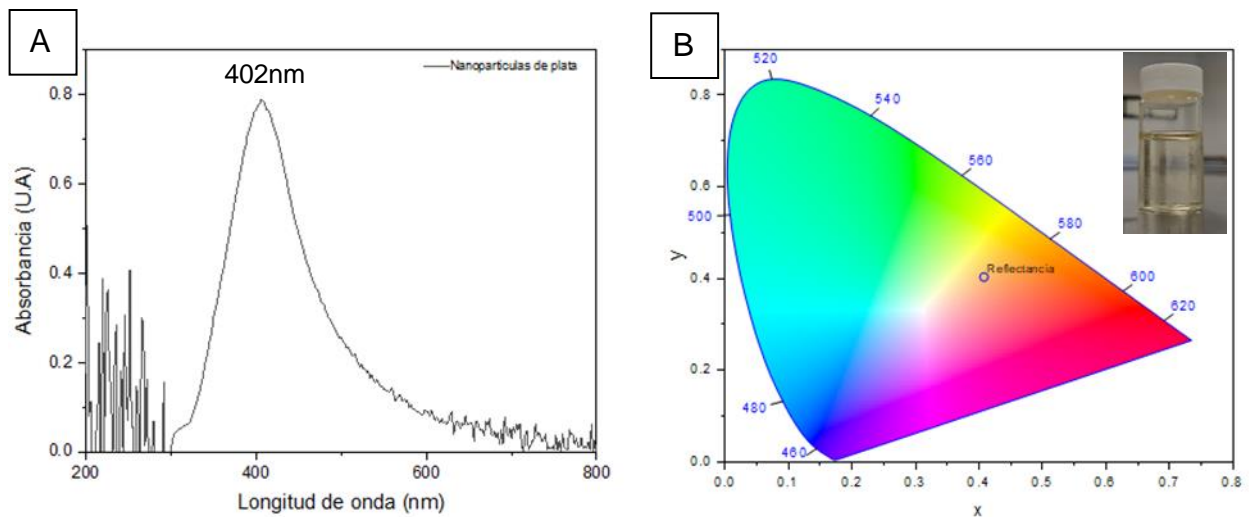


**Figura 8. Recolección de muestra clínica**

## 9 Resultados y discusión

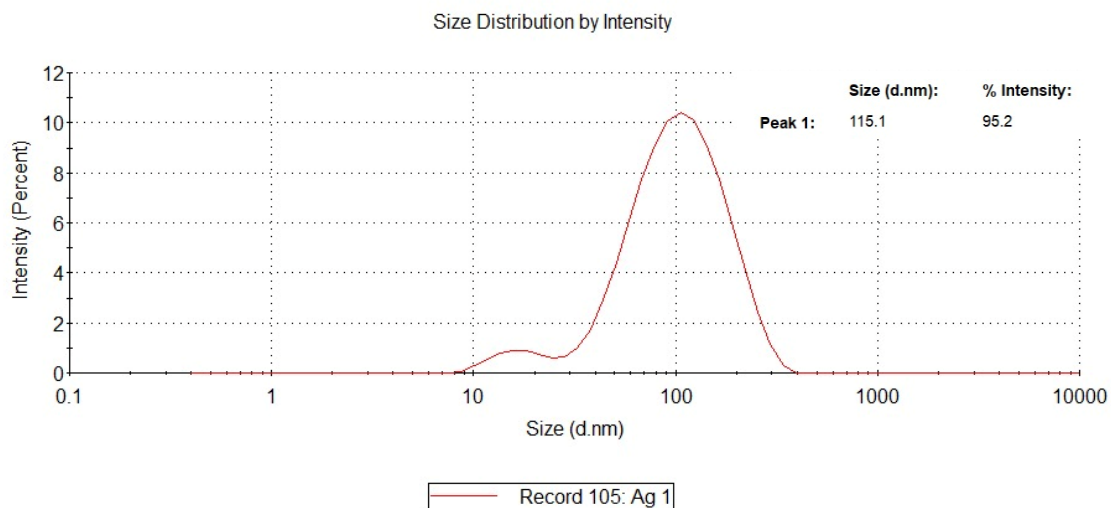
### 9.1 Síntesis y caracterización de AgNP

Durante el proceso de reducción de Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) mediante borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) la mezcla de los reactivos incoloros inmediatamente se tornó amarillo brillante, lo cual es un indicio de la presencia de nanopartículas coloidales aisladas según lo reportó V.V. Pinto y colaboradores en 2018<sup>21</sup>. En el análisis espectral UV-Vis se observa un pico de absorbancia máximo de 402 nm (Figura 9A), que al representarlo en un diagrama de cromaticidad CIE a esa longitud de onda se observa el color amarillo brillante obtenido en la síntesis (Figura 9B). Lo anterior es sumamente significativo para este trabajo ya que según lo estudiado por Jiang Z<sup>22</sup> y Yugang Sun<sup>23</sup> el reporte de un pico de absorbancia máximo de aproximadamente 400nm (como el que se obtuvo en el presente estudio) tiene que ver directamente con el tamaño y configuración de las AgNP. En este caso la posición del pico de absorbancia indica que las nanopartículas obtenidas son de forma esférica<sup>22-24</sup>.



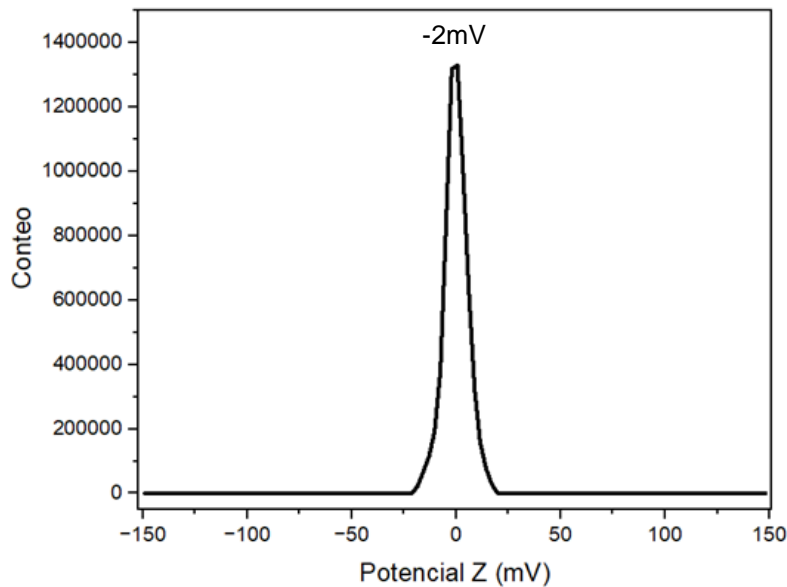
**Figura 9. Análisis espectral UV-Vis** A. Pico de absorbancia máximo obtenido  
B. Diagrama de cromaticidad CIE comparada con el color de la solución de AgNP

En lo que se refiere al tamaño de las nanopartículas Shekhar y colaboradores<sup>19</sup> reportaron que las AgNP exhiben un pico de extinción agudo en longitudes de onda de 393, 394, 398, 401, 406, 411, 420, 429, 449 y 462 nm para AgNP con tamaños promedio de 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 63, 85 y 100 nm respectivamente y predijeron que los máximos de absorción de las AgNP cambiaron a longitudes de onda más largas con el aumento de tamaño<sup>19</sup>, sin embargo difiere con el pico de absorbancia máximo que se observa en el análisis de este estudio el cual es agudo. Para corroborarlo, se optó por el análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS), en el que se puede evaluar el tamaño de la partícula en solución (Figura 10), se puede observar una distribución normal de las AgNP con un promedio de 115 nm de diámetro.



**Figura 10. Análisis de Dispersión dinámica de la Luz (DLS).** Se observa la distribución de tamaño de las AgNP, las líneas de colores diferentes indican las tres lecturas que se realizaron.

La información recopilada por el espectro UV-Vis y el análisis DLS se complementó mediante el análisis de Potencial Z para medir la carga superficial de la partícula en un medio acuoso, los datos obtenidos se presentan en la figura 11, en la cual el gráfico de distribución presenta un pico con valor de -2mV. Diversos estudios como el de Alsharif S.M.<sup>24</sup> y el de Jiménez Ramírez<sup>7</sup> reportaron que los resultados de Potencial Z negativos (valores entre +30 y -30) se relacionan con cargas eléctricas negativas, bien definidas, intensas y estables que ofrecen características para evitar la aglomeración, lo que confirma la presencia de partículas nanoestructuradas con tamaño y forma bien definidos<sup>7,24</sup>.



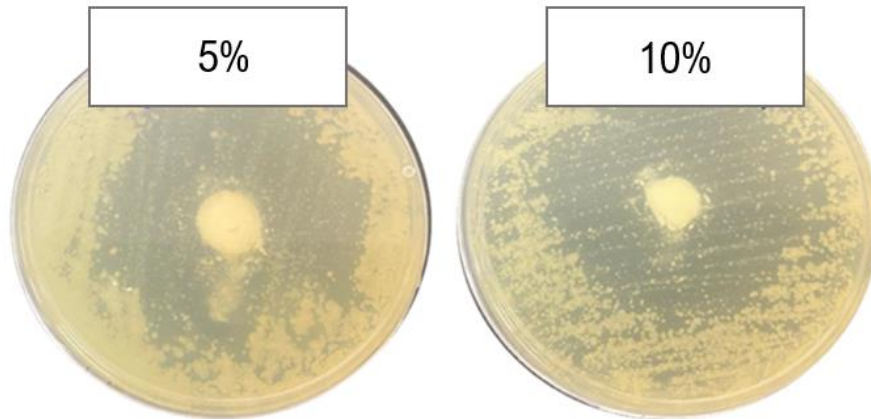
**Figura 11. Gráfico de distribución de Potencial Z. Pico de -2mV**

En cuanto a su toxicidad Coutiño R y colaboradores<sup>25</sup> reportan que los efectos tóxicos de la exposición a las AgNP se deben a su tamaño, ya que esto ayuda a la distribución celular y a la penetración dermal e intestinal, siendo las de menor tamaño (15 nm) las de mayor toxicidad. Otro factor implicado es la composición, siendo las esféricas y alargadas menos tóxicas que las de triangulo truncado. Finalmente, las propiedades toxicológicas propias y específicas de las AgNP se afectan por factores como la solubilidad, pH y concentración de sales, sin embargo, al disolverse pierden dichas propiedades; disueltas y libres siguen consideraciones toxicológicas semejantes a las de los fármacos<sup>25</sup>. Por lo anterior cabe recalcar las características de las AgNP obtenidas en este estudio: nanopartículas esféricas de 115nm de diámetro, con carga superficial negativa en solución, estables con características que evitan la aglomeración.

## **9.2 Prototipo de dentífrico y actividad antimicrobiana**

Estudios anteriores informaron de pruebas de la actividad antimicrobiana de las AgNP en distintas formulaciones, Faiyaz<sup>1</sup> reportó el comportamiento de un dentífrico con AgNP comparado con uno con Quitosano y otro con Flúor, en las pruebas antimicrobianas el dentífrico con AgNP tuvo mayor actividad en la muestra de *Streptococcus mutans* con un halo de inhibición de 20mm<sup>1</sup>. Mientras que Gastelum García<sup>26</sup> en su estudio encontró la presencia de *Streptococcus mutans* en un 100% de las muestras clínicas estudiadas<sup>26</sup> y en el trabajo de Jiménez<sup>7</sup> se reportó que las AgNP tienen actividad en contra de los microorganismos de la biopelícula dental de pacientes pediátricos<sup>7</sup>. Lo anterior corresponde con lo encontrado en el análisis antimicrobiano del

prototipo sintetizado en este trabajo al ser expuesto en concentraciones de 5% y 10% (porcentaje en peso), a la muestra clínica de un paciente pediátrico (Figura 12).

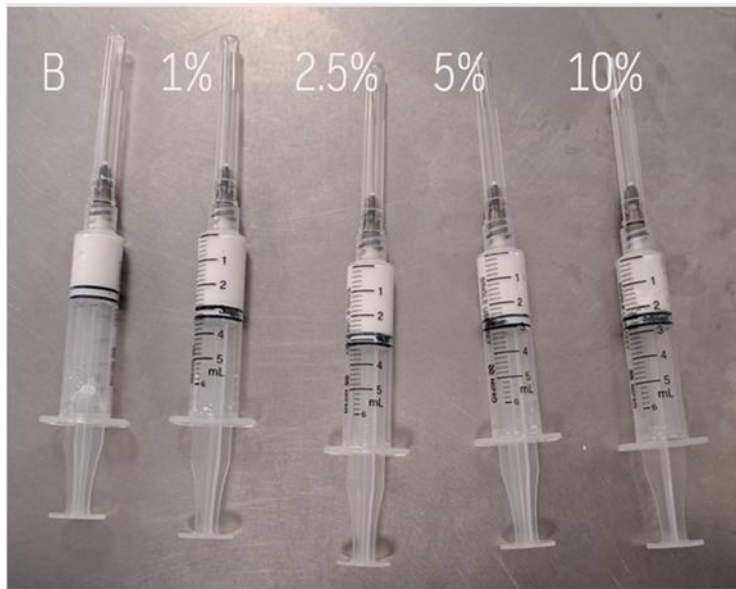


**Figura 12. Resultado de prueba antimicrobiana de muestra clínica**

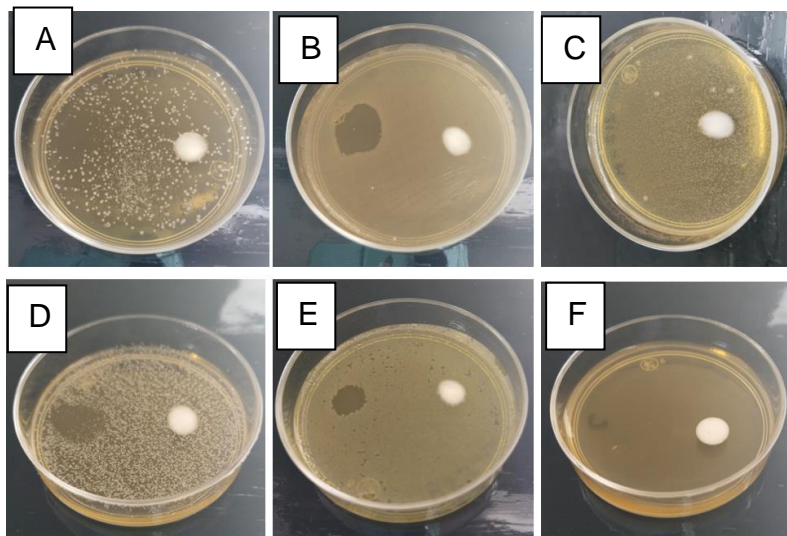
Las investigaciones de Costa- Favaro<sup>10</sup> y Schwass<sup>9</sup>, publicaron que las AgNP tienen la capacidad de inactivar el 100% del crecimiento de *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli* con una configuración predominantemente esférica, de 7 a 30nm dispersadas en solución y de una concentración mejor al 38% utilizado en el fluoruro diamino de plata; además al ponerlas en contacto con esmalte desmineralizado o dentina cariada no se observaron pigmentaciones, lo cual indica un comportamiento estable y alentador para ser utilizadas en el prototipo de dentífrico y su uso a largo plazo<sup>9,10</sup>. En relación con lo anterior la decisión de realizar el prototipo de dentífrico en distintas concentraciones, (Figura 13) fue de vital importancia para las pruebas antimicrobianas.

En dichas pruebas, el comportamiento del prototipo de pasta en sus distintas concentraciones frente a las cepas ATCC coinciden parcialmente con lo obtenido en los

estudios antes mencionados ya que se encontró actividad antimicrobiana del dentífrico con un halo menor, tal como se puede observar en la figura 14.



**Figura 13. Resultado de la síntesis de prototipo de dentífrico.** Se realizó prototipo en 5 concentraciones distintas, de izquierda a derecha: blanco, 1%, 2.5%, 5% y 10 % (porcentaje en peso)



**Figura 14. Análisis de la actividad antimicrobiana.** A. 4300 *Staphylococcus aureus*. B. 25292 *Escherichia coli*, C. 29212 *Enterococcus faecalis*, D. 25293 *Staphylococcus aureus*, E. 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, F. Control

Tras lo obtenido en las pruebas antimicrobianas de la cepa clínica y las cepas ATCC es necesario relacionarlas con el estudio de Harris J.<sup>5</sup> sobre el perfil bacteriano de la biopelícula dental supragingival de niños con dentición temporal y mixta y el de Cruz-Quintana sobre el microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal<sup>27</sup>. Anteriormente se mencionó que en la boca está colonizada por más de 700 especies de microorganismos, de las cuales el 35% no pueden aislarse<sup>5</sup>, todas las especies que componen la microbiota de la mucosa bucal, con excepción de las que habitan en las encías y los labios, son casi exclusivamente cocos Gram + anaerobios facultativos<sup>27</sup>.

Este estudio propone como mecanismo de acción el propuesto por Coutiño R<sup>25</sup> donde las AgNP deben su efecto antimicrobiano a la generación de especies oxígeno reactivas (EROS) y la inducción de estrés oxidativo (EO) por el desacoplamiento del transporte de electrones y la desactivación de enzimas, particularmente a causa de la desnaturalización de los enlaces disulfuro de las proteínas bacterianas, que conduce a la muerte celular<sup>25</sup>.

## 10 Conclusiones

A continuación, se presentan los hallazgos más significativos de este estudio:

- Se obtuvo la síntesis de AgNP de configuración esférica de un diámetro de 115 nm, con carga superficial negativa en solución, estables con características que evitan la aglomeración.
- Las concentraciones del prototipo de dentífrico obtenido fueron las siguientes: 0%, 1%, 2.5%, 5% y 10% (porcentaje en peso).
- El prototipo de dentífrico presenta actividad antimicrobiana frente a las cepas ATCC estudiadas
- El prototipo de dentífrico presenta actividad antimicrobiana frente a los microorganismos presentes en la muestra clínica obtenida de una paciente con dentición mixta, en dos concentraciones distintas 10% y 5% (porcentaje en peso)

## **11 Recomendaciones**

Para fortalecer los hallazgos reportados en este estudio es recomendable realizar ensayos de citotoxicidad en células (fibroblastos) de tejido bucal para medir la citotoxicidad del prototipo de dentífrico. Además, probar el prototipo de pasta contra mayor número de cepas clínicas, con posibilidad de obtenerlas de pacientes que acudan a la clínica de Especialidad en Odontología Pediátrica de la Universidad de Baja California, esto fortalecería los hallazgos encontrados en esta investigación.

## Capítulo II

### 12 Caso clínico

#### Actividad antimicrobiana de dentífrico prototipo con AgNP frente microorganismos de biopelícula dental de paciente con HMI

##### Resumen

**Introducción.** Los biofilm son acumulación heterogénea de una comunidad microbiana. Estos microorganismos pueden adherirse sobre las paredes de los dientes, en la mucosa oral y en la saliva. El *S. mutans*, principal responsable de producción de lesiones cariosas,

La Academia Europea de Odontología Pediátrica (EAPD) ha definido la hipomineralización de los incisivos molares (MIH) como un defecto de uno a cuatro primeros molares permanentes en su mineralización, afectándose de una manera similar; se observan como opacidades delimitadas en extensión y severidad variable. Se ha demostrado la asociación entre la caries dental y la hipomineralización del esmalte, adicionalmente es común que la higiene sea más difícil, lo que favorece el cúmulo de biofilm.

**Objetivo.** Determinar por medio de un ensayo *in vitro* si el prototipo de dentífrico a base de AgNP tiene o no actividad antimicrobiana en contra los microorganismos presentes en la muestra de biopelícula dental de una paciente con HMI

**Descripción del caso.** Paciente femenino de 8 años 3 meses con lesiones de HMI en incisivos centrales y primeros molares acude a la clínica, se decide tomar muestra clínica de biopelícula dental para realizar un ensayo antimicrobiano *in vitro*. Se

realizó sembrado por técnica de aislamiento por agotamiento en placas Petri con Agar Müller Hilton como medio de cultivo, se colocó el prototipo de dentífrico en dos concentraciones (5% y 10% de porcentaje en peso) en el centro con una pipeta, además se dejó una placa Petri sin dentífrico como blanco. Posteriormente se llevaron a una estufa por 18 a 20 horas.

**Resultados.** Se observa un crecimiento uniforme de microorganismos en el blanco. En las placas Petri que contenían las dos concentraciones de dentífrico hay un halo de inhibición irregular y un desplazamiento de la muestra de dentífrico.

**Conclusión.** El prototipo de pasta a base de AgNP, si tiene actividad antimicrobiana contra los microorganismos presentes en la muestra clínica de PDB de esta paciente en específico.

*Palabras clave: Hipomineralización Molar Incisiva, biofilm, lesión cariosa, Streptococcus mutans, microbioma oral*

## **Abstract**

**Introduction.** Biofilms are a heterogeneous accumulation of a microbial community. These microorganisms can adhere to the walls of the teeth, the oral mucosa and saliva. *S. mutans*, mainly responsible for the production of carious lesions, The European Academy of Pediatric Dentistry (EAPD) has defined molar incisor hypomineralization (MIH) as a defect of one to four permanent first molars in their mineralization, being affected in a similar way; They are observed as delimited opacities of varying extent and severity. The association between dental caries and enamel hypomineralization has been demonstrated; in addition, it is common that hygiene is more difficult, which favors the accumulation of biofilm.

**Objective.** To determine by means of an in vitro test whether the AgNP-based toothpaste prototype has antimicrobial activity against the microorganisms present in the dental biofilm sample from a patient with HMI.

**Case report.** A female patient aged 8 years and 3 months with HMI lesions on central incisors and first molars came to the clinic. It was decided to take a clinical sample of dental biofilm to perform an in vitro antimicrobial test. Sowing was carried out by isolation technique by exhaustion in Petri dishes with Müller Hilton Agar as a culture medium, the toothpaste prototype was placed in two concentrations (5% and 10% weight percentage) in the center with a pipette, in addition left a Petri dish without toothpaste as a blank. They were then placed in a stove for 18 to 20 hours.

**Results.** A uniform growth of microorganisms is observed on the target. In the Petri dishes containing the two concentrations of dentifrice there is an irregular halo of inhibition and a displacement of the dentifrice sample.

**Conclusion.** The AgNP-based paste prototype as a principle does have antimicrobial activity against the microorganisms present in the PDB clinical sample from this specific patient.

*Keywords: Molar Incisor Hypomineralization, biofilm, carious lesion, Streptococcus mutans, oral microbiome*

## 12.1 Introducción

La caries dental es una de las enfermedades infecciosas más frecuentes en humanos, la valoración de la composición del microbiota oral es importante para el desarrollo de la caries dental<sup>1</sup>. Con el advenimiento de técnicas moleculares de la identificación de bacterias orales basadas en el ADN, se ha demostrado que el microbiota oral es mucho más compleja y diversa de lo que originalmente se había previsto, la cavidad oral está colonizada por más de 700 especies de microorganismos, los cuales pueden diferir entre la infancia y la edad adulta<sup>5</sup>.

Los biofilm son acumulación heterogénea de una comunidad microbiana, rodeada por una matriz intercelular de polímeros. Estos microorganismos pueden adherirse o depositarse sobre las paredes de los dientes, en la mucosa oral y en la saliva, entre otros. Algunos colonizadores de dientes y favorecedores en la formación del biofilm oral son *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus oralis*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parasanguis*, *Neisseria spp.*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* y otros<sup>5</sup>.

La caries dental es una disbiosis que se caracteriza por ser un mecanismo dinámico de desmineralización y remineralización como resultado del metabolismo microbiano agregado sobre la superficie dentaria, cuya actividad se establece mucho antes de que ocurran las cavidades<sup>28</sup>.

El *S. mutans*, principal responsable de la producción de lesiones cariosas es una bacteria ácido-láctica Gram +, es un productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH7 a pH 4.2 en aproximadamente 24 horas<sup>26</sup>.

Por otro lado, los defectos de desarrollo del esmalte (DDE) son cambios visibles en la apariencia translúcida normal, resultante de la disfunción del órgano del esmalte. Los DDE se clasifican en dos categorías: hipomineralizaciones e hipoplasias. Las hipomineralizaciones se consideran un defecto en el que el grosor del esmalte es normal e interrupción de la maduración de este tiene como consecuencia una anomalía en la transparencia, caracterizada por la difusión de zonas demarcadas<sup>29</sup>.

La Academia Europea de Odontología Pediátrica (EAPD) ha definido la hipomineralización de los incisivos molares (MIH) como un defecto de uno a cuatro primeros molares permanentes en su mineralización, afectándose de una manera similar; se observan como opacidades delimitadas en extensión y severidad variable. En sus características se presentan bordes claros que pueden ser de color blanco, amarillo o marrón<sup>29,30</sup>.

Se ha demostrado la asociación entre la caries dental y la hipomineralización del esmalte, con la que se determinó que la probabilidad de encontrar un niño con MIH y caries dental es 2,1 -4,6 veces mayor que encontrar un niño con MIH sin caries dental. Adicionalmente es común que la higiene sea más difícil, lo que favorece el cúmulo de biofilm<sup>29</sup>.

La saliva es un fluido que en condiciones normales promueve la eliminación mecánica de bacterias de las superficies duras y blandas, su composición le confiere una capacidad amortiguadora y neutralizadora de los ácidos producidos por los

organismos cariogénicos o ingeridos a través de la dieta, permitiéndole mantener un pH constante, es también una fuente de calcio y fosfato necesarios para la remineralización del esmalte<sup>31</sup>. El pH salival crea condiciones en el medio que mantienen el equilibrio medioambiental previniendo la aparición de patologías como la caries<sup>31</sup>.

El flujo de saliva, el proceso de masticación y la higiene bucal eliminan gran cantidad de bacterias de la cavidad bucal, por tanto, una alteración en uno de esos tres factores generará un cambio desfavorable que promueva la formación de caries dental<sup>26</sup>.

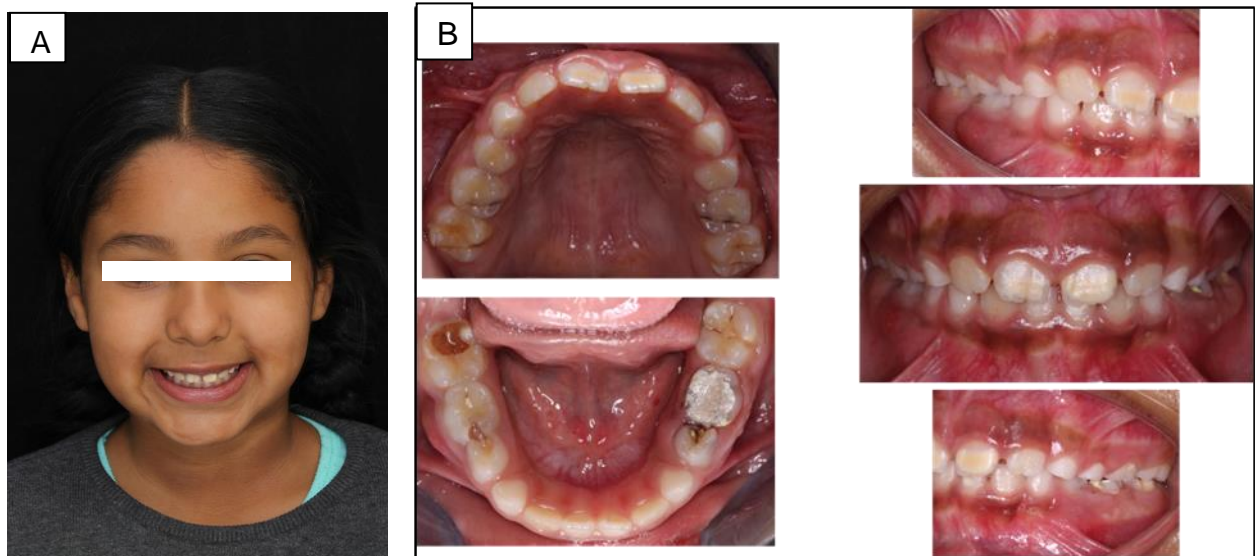
## **12.2 Antecedentes**

Este caso clínico se basó en el estudio de Gastelum- García A y colaboradores en 2022<sup>26</sup>, los cuales realizaron un estudio observacional, comparativo, transversal con 30 sujetos de edad escolar menores de 12 años, realizaron una recolección de muestra de saliva, para identificar *S. mutans* a partir de Reacción en Cadena Polimerasa (PCR), de los cuales el 100% presentaba caries en dentición permanente o temporal.

También se tomó en cuenta el estudio de Carrillo SMB y colaboradores en 2023<sup>29</sup>, los cuales realizaron una revisión sistemática con artículos del 2016 a 2022 en el que buscaban determinar la relación que existe entre el HMI y la prevalencia para formar lesiones cariosas, con el análisis de los 24 artículos participantes en la revisión el grado de severidad del HMI si afecta la aparición de caries y resulta ser un condicionante para la formación de lesiones cariosas.

### 12.3 Objetivo

Por lo anterior el objetivo de este caso es determinar por medio de un ensayo *in vitro* si el prototipo de dentífrico a base de AgNP tiene o no actividad antimicrobiana en contra los microorganismos presentes en la muestra de biopelícula dental de una paciente con HMI.

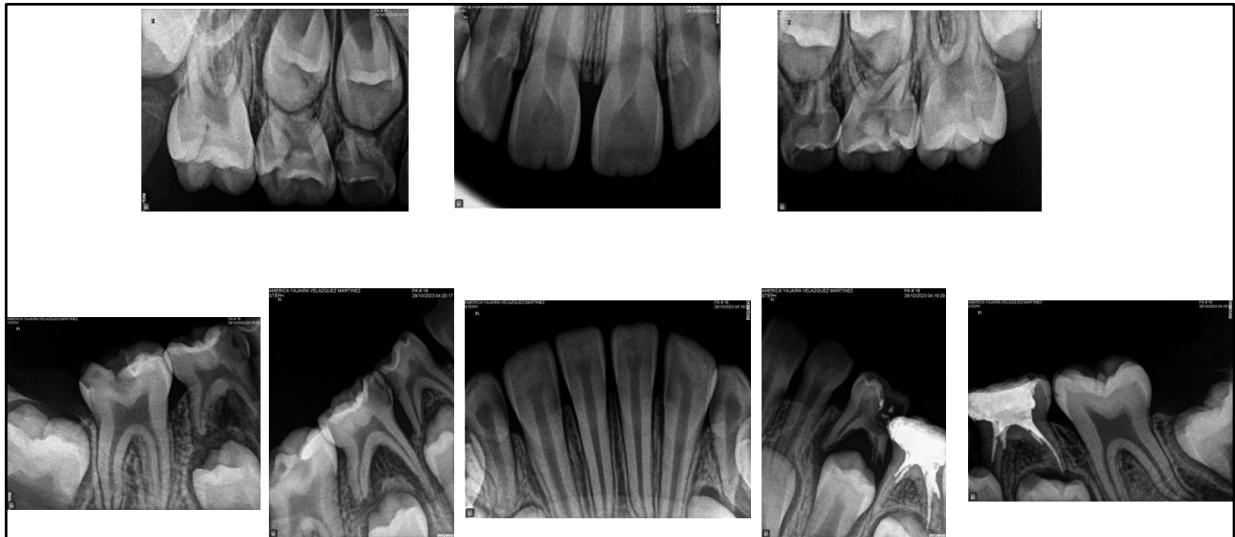


**Figura 15. Paciente 8 años, estado clínico inicial.** A. Paciente femenino de 8 años 3 meses B. Fotografías intraorales iniciales, se observan las manchas de marrón amarillentas en los primeros molares e incisivos centrales.

### 12.4 Descripción del caso.

Paciente femenino de ocho años y tres meses (Figura 15A), se presenta a la clínica del posgrado de Odontología Pediátrica en la Universidad Autónoma de Baja California en compañía de su mamá y hermana mayor por odontalgia. Inicialmente su hermana asistió a consulta referida por la clínica de licenciatura de la institución por un primer molar inferior con manchas café amarillentas por HMI, al platicar con la mamá ella refiere que la hermana menor también tiene esas manchas lo que lleva a ver ambos

casos por separado. Durante el interrogatorio la mamá refiere riesgo de desprendimiento durante el embarazo, en la primera exploración clínica se observan manchas amarillas y cafés en los incisivos centrales y lesión atípica en un primer molar inferior que habían sido referidos por su mamá en primer lugar.



**Figura 16. Estudio radiográfico inicial.** Se observan múltiples sombras radiolúcidas en molares temporales que corresponden a lesiones cariosas, la pieza dentaria 36 a diferencia de los otros primeros molares permanentes con lesiones de MIH se observa una sombra radiolúcida que puede corresponder a una lesión cariosa en el tejido afectado.

Se toman fotografías clínicas intraorales (Figura 15B y radiografías (Figura 16). La clasificación de los defectos se realizó mediante el índice de necesidad de tratamiento de Hipomineralización incisivo molar (HMI-TNI)<sup>30</sup>: las piezas 16, 26, 36, 11 y 21 corresponden a HMI-TNI 2b y la pieza 46 correspondía a HMI-TNI 4b (Figura 12B).

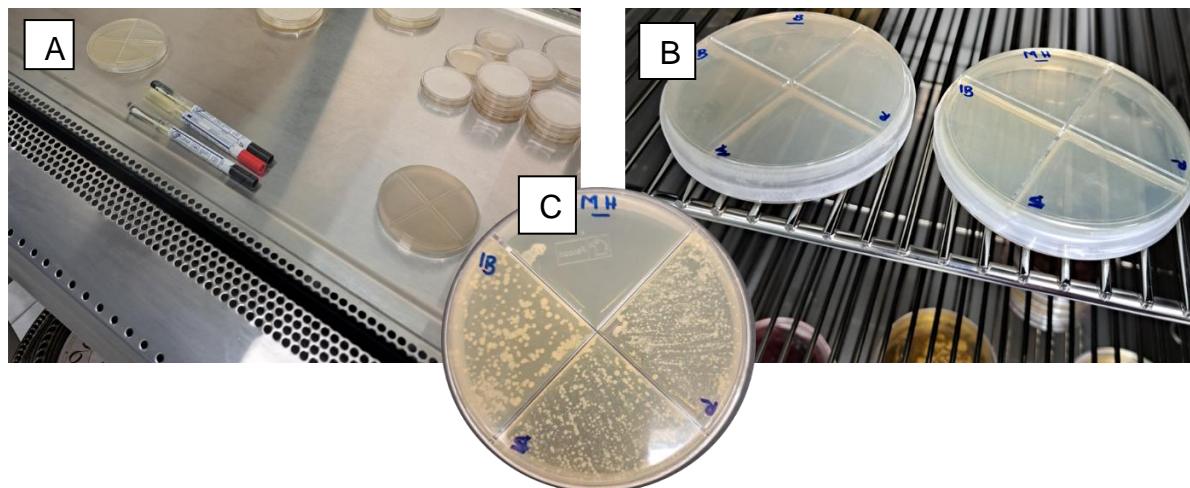
Los datos anteriores llevaron al diagnóstico de HMI en primeros molares permanentes e incisivos centrales superiores, además de lesiones cariosas múltiples en piezas dentales permanentes.

Además del tratamiento restaurador se tomaron tres muestras de biopelícula dental de la cara vestibular de la pieza dentaria 12 cerca del cuello, con una semana de diferencia cada una (Figura 17).



**Figura 17. Toma de muestra clínica.** La muestra se tomó de la cara vestibular de la pieza dentaria 13 a nivel del cuello dental.

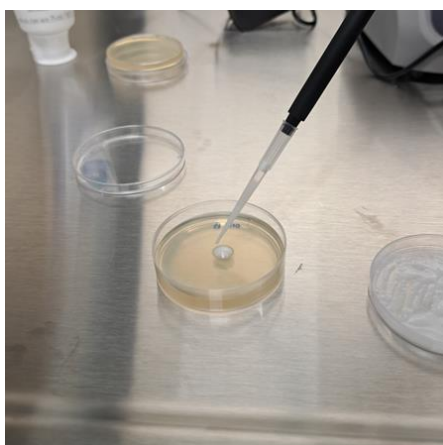
Tras lo anterior, se cultivaron las muestras en el laboratorio en medio de cultivo agar Müller Hilton por medio de sembrado por técnica de aislamiento por Tras lo agotamiento y se llevó a la estufa por 18 a 20 horas. para verificar que existiera crecimiento de microorganismos (Figura 18 A-C).



**Figura 18. Primer sembrado.** A. Muestras clínicas en isopos separados y placas Petri antes del sembrado. B. Placas Petri en la estufa después de realizar el sembrado por técnica de aislamiento por agotamiento. C. Resultado de la siembra 20 horas después. Se puede observar crecimiento de microorganismos a partir de la muestra clínica de los 3 isopos.

Una vez confirmado el crecimiento de microorganismos a partir de las muestras clínicas de biopelícula dental de la paciente con HMI se llevó a cabo el ensayo de la actividad antimicrobiana.

De nuevo se realizó el sembrado por técnica de aislamiento por agotamiento en placas Petri con agar Müller Hilton como medio de cultivo, el prototipo de dentífrico en dos concentraciones (5 y 10 % de volumen de porcentaje en peso) se colocó en el centro de la placa Petri con una pipeta, posteriormente se llevó a la estufa por 18 a 20 horas (Figura 19).

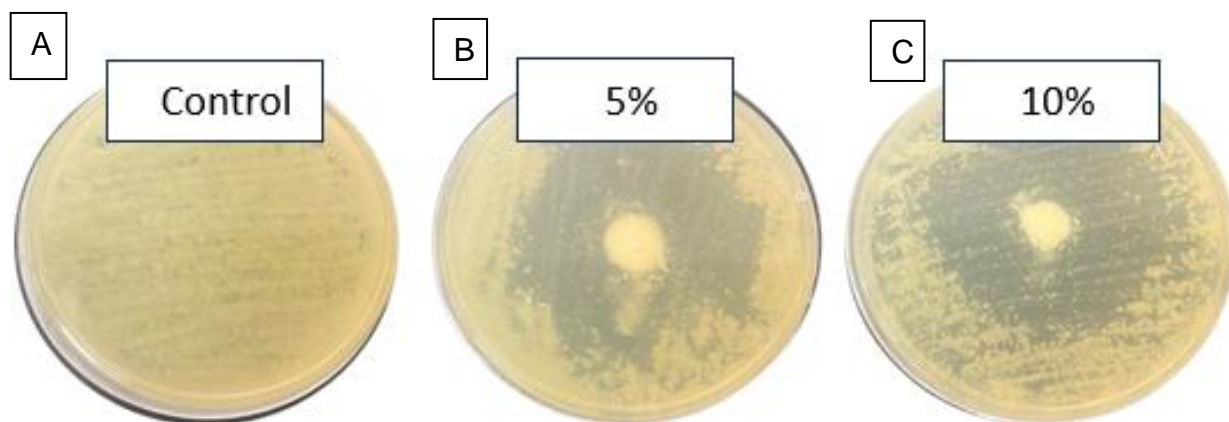


**Figura 19. Ensayo de la actividad antimicrobiana.** Con una pipeta se llevó al centro de la placa Petri con el sembrado de la muestra clínica.

## 12.5 Resultados

Se pueden observar en la figura 20. Una vez pasado el tiempo en que las muestras clínicas debían estar en la estufa se observó el comportamiento de los microorganismos presentes en la muestra clínica y la dilución del prototipo de dentífrico.

El Petri que contenía la muestra control no presenta inhibición de microorganismos un crecimiento uniforme de microorganismos sin intervención de la dilución del prototipo de dentífrico (Figura 20A). La segunda muestra, fue expuesta al prototipo de dentífrico con 5% de porcentaje en peso de AgNP (Figura 20B); y la tercerase expuso a la concentración de 10% de porcentaje en peso de AgNP, estas últimas dos tienen actividad antimicrobiana, aunque el halo se observa irregular por un desplazamiento del dentífrico dentro de la placa de Petri.



**Figura 20. Resultados de ensayo antimicrobiano** A. Muestra control. B. Muestra clínica y dentífrico de concentración de 5% de AgNP (porcentaje en peso) C. Muestra Clínica y dentífrico de concentración de 10% de AgNP (porcentaje en peso).

## 12.6 Discusión.

En su estudio Gastelum-García A en 2022 reportaron que el nivel de *S. mutans* y la actividad de caries a menudo se correlacionan, debido a la cantidad de lesiones cariosas que presenta la paciente en este caso nos indica que es muy probable la

presencia de *S. mutans*. Además, concluyeron que la prevención debe centrarse en la reducción de *S. mutans* y en modificar la dieta, cosa que coincide con el propósito de este caso de restaurar y devolver la función, ya que al eliminar las lesiones cariosas se promueve la eliminación de *S. mutans*.

Este caso clínico coincide también con el estudio de Carrillo SMB. y et al. de 2023, los cuales encontraron una relación entre el HMI y la caries dental, agregando que los pacientes con esta condición son más susceptibles a la caries dental, que el grado de severidad del HMI afecta la aparición de caries y que por ende el HMI es un condicionante para la presencia de caries dental. Debido a que las lesiones cariosas de mayor severidad de la paciente son en el mismo cuadrante en que la lesión de HMI es de mayor tamaño, este caso clínico corrobora lo encontrado por los investigadores.

## **12.7 Conclusión**

Se obtuvo un prototipo de pasta dentífrica en dos concentraciones distintas 5% y 10% (porcentaje en peso) que resultó ser efectivo en contra de los microorganismos presentes en la muestra clínica de placa dentobacteriana de la paciente, probando así que el prototipo tiene actividad antimicrobiana en contra de la muestra clínica.

## 13 Referencias Bibliográficas

1. Ahmed F, Prashanth S, Sindhu K, Nayak A, Chaturvedi S. Antimicrobial efficacy of nanosilver and chitosan against *Streptococcus mutans*, as an ingredient of toothpaste formulation: An in vitro study. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* 2019;37(1):46–54.
2. Espinosa Cristóbal LF, Tovar Carrillo KL, Donohue Cornejo A, et al. Nanopartículas de plata contra bacterias presentes en biofilm dental de pacientes pediátricos. *Revista de la Asociación Dental Mexicana* 2022;79(4):198–203.
3. Yesid Ramírez-Rueda R, Adriana García-Robayo D, Gamboa F. Evaluación comparativa del efecto antimicrobiano inmediato y residual de enjuagues bucales sobre biopelículas asociadas a caries dental. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* [homepage on the Internet] 2023;52(2):626–639. Available from: [www.farmacia.unal.edu.co/Articulodeinvestigacioncientifica/https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.106166](http://www.farmacia.unal.edu.co/Articulodeinvestigacioncientifica/https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n2.106166) ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4612-5592>
4. Davidovich E, Grender J, Zini A. Factors associated with dental plaque, gingivitis, and caries in a pediatric population: A records-based cross-sectional study. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17(22):1–11.
5. Harris-Ricardo J, Fang L, Herrera-Herrera A, et al. Bacterial profile of the supragingival dental biofilm in children with deciduous and early mixed dentition using next generation sequencing (HOMINGS) technique. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2019;37(7):448–453.
6. Rocamundi M, Lagoner A, Lasca Juncal A, et al. Ventajas y riesgos del uso de pastas dentales con nanotecnologías. *Methodo Investigación Aplicada a las Ciencias Biológicas* 2018;3(3):67–72.
7. Jiménez-Ramírez AJ, Martínez-Martínez RE, Ayala-Herrera JL, et al. Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles against Clinical Biofilms from Patients with and without Dental Caries. *J Nanomater* 2021;2021.
8. Barkat MdA, Harshita, Beg S, et al. Current Progress in Synthesis, Characterization and Applications of Silver Nanoparticles: Precepts and Prospects. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2017;13(1):53–69.
9. Schwass DR, Lyons KM, Love R, Tompkins GR, Meledandri CJ. Antimicrobial Activity of a Colloidal AgNP Suspension Demonstrated In Vitro against Monoculture Biofilms: Toward a Novel Tooth Disinfectant for Treating Dental Caries. *Adv Dent Res* 2018;29(1):117–123.
10. Favaro JC, Detomini TR, Maia LP, et al. Anticaries Agent Based on Silver Nanoparticles and Fluoride: Characterization and Biological and Remineralizing Effects-An In Vitro Study. *Int J Dent* 2022;2022.
11. Márquez-Pérez K, Mónica Zúñiga-López C, Torres-Rosas R, Argueta-Figueroa L. Reported prevalence of dental caries in Mexican children and teenagers. 2023; Available from: <http://revistamedica.imss.gob.mx/>
12. Ojeda-Garcés Juan Carlos, Oviedo-García Eliana, Salas Luis Andrés. *Streptococcus mutans* and dental caries. *Revista CES odontología* 2013;26(1):44–56.

13. Alvarracin-Baculima M, Cuenca-León K, Pacheco-Quito EM. Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry: State of the art. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 2021;40(8):839–847.
14. Scarpelli BB, Punhagui MF, Hoepfner MG, et al. In vitro evaluation of the remineralizing potential and antimicrobial activity of a cariostatic agent with silver nanoparticles. *Braz Dent J* 2017;28(6):738–743.
15. Vega-Baudrit J, Gamboa SM, Rojas ER, Martínez VV. Synthesis and characterization of silver nanoparticles and their application as an antibacterial agent. *Int J Biosens Bioelectron* 2019;5(5).
16. Zhao IS, Yin IX, Mei ML, et al. Remineralising dentine caries using sodium fluoride with silver nanoparticles: An in vitro study. *Int J Nanomedicine* 2020;15:2829–2839.
17. Lee SH, Jun BH. Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. *Int J Mol Sci.* 2019;20(4).
18. Raj S, Trivedi R, Soni V. Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles, Characterization and Their Applications—A Review. *Surfaces* 2021;5(1):67–90.
19. Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv* 2014;4(8):3974–3983.
20. Lowry G V., Hill RJ, Harper S, et al. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. *Environ Sci Nano* 2016;3(5):953–965.
21. Pinto V V., Ferreira MJ, Silva R, Santos HA, Silva F, Pereira CM. Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: Effect of the synthesis and storage conditions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2010;364(1–3):19–25.
22. Jiang Z, Wen G, Luo Y, Zhang X, Liu Q, Liang A. A new silver nanorod SPR probe for detection of trace benzoyl peroxide. *Sci Rep* 2014;4.
23. Sun Y, Xia Y. Gold and silver nanoparticles: A class of chromophores with colors tunable in the range from 400 to 750 nm. *Analyst* 2003;128(6):686–691.
24. Alsharif SM, Salem SS, Abdel-Rahman MA, et al. Multifunctional properties of spherical silver nanoparticles fabricated by different microbial taxa. *Heliyon* 2020;6(5).
25. Coutiño R, Ávila Lagunes L, Arroyo Helguera O. Las Nanopartículas de Plata: Mecanismos de Entrada, Toxicidad y Estrés Oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica (REB)* 2017;36(2):39–54.
26. Gastelum-García Antonio, Chaidez-Angulo Alma Ieticia, García-Jau Rosa Alicia, Benítez-Pascual Julio, Gastelum-García Valeria, Valle-Urias Aurea Elizabeth. Presencia de *Streptococcus mutans* en saliva y caries dental en escolares. *Conference Proceedings Jornadas Internacionales de Investigación en Odontología* 2022;1(1):1–6.
27. Cruz-Quintana Sandra Margarita, Sjostrom PD, Socarrás DA, Mazón-Baldeón Gloria Marlene. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal Microbiota of oral cavity ecosystems. *Rev Cubana Estomatol [homepage on the Internet]* 2017;54(1):84–99. Available from: <http://scielo.sld.cu>  
<http://scielo.sld.cu>
28. Achote-Almeida AN, Armijos-Moreta JF, Gavilánez-Villamarín SM. Evaluación de caries dentales en la infancia. *Revista Arbitrada Interdisciplinaria de Ciencias de la Salud Salud y Vida* 2022;6(3):243.

29. Micaela Barrionuevo-Carrillo SI, Alberto Vallejo-Izquierdo LI, Gabriela Flores-Jara III M. La hipomineralización incisivo molar y su susceptibilidad ante la formación de caries, revisión bibliográfica La hipomineralización incisivo molar y su susceptibilidad ante la formación de caries, revisión bibliográfica Molar incisor hypomineralization and its susceptibility to caries formation, literature review Hipomineralização molar incisivo e sua suscetibilidade à formação de cárie, revisão de literatura. 2023;9:2106–2123. Available from: <http://dominiodelasciencias.com/ojs/index.php/es/index>
30. Steffen R, Krämer N, Bekes K. The Würzburg MIH concept: the MIH treatment need index (MIH TNI): A new index to assess and plan treatment in patients with molar incisor hypomineralisation (MIH). *European Archives of Paediatric Dentistry* 2017;18(5):355–361.
31. Barrios Carolina Elizabet, Vila Vilma Graciela, Martinez Sandra Elena, Encina-Tutuy Alejandro J. Ph Salival como factor asociado a la caries dental. *Revista Facultad de Odontología* 2017;10(1):13–19.

## 14 Anexos

Anexo 1.



**Universidad Autónoma de Baja California**  
**Facultad de Odontología Campus Tijuana**  
**Comité de Estudios de posgrado de la**  
**Especialidad en Odontología pediátrica**  
**Cuerpo Académico Odontología Pediátrica y**  
**Ciencias Afines**

Director de tesis: Esteban Hernández Guevara

Investigador principal: Stephanie Citlali De La Cruz Ramos

### CARTA DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Manifiesto, bajo protesta de decir verdad, ante el Comité de Estudios de Posgrado de la Especialidad en Odontología Pediátrica de la Facultad de Odontología Campus Tijuana de la Universidad Autónoma de Baja California, que la integridad de la investigación titulada Desarrollo de un Dentífrico Preparado a Base de Nanopartículas de Plata para su Evaluación Antimicrobiana NO está indebidamente influenciada por un interés secundario de carácter económico o personal, en términos de lo establecido por el artículo 15.2 de la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos de que los beneficios no deben constituir incentivos indebidos para participar en las actividades de investigación.

---