

Acrílico termopolimerizable enriquecido con nanopartículas de cobre: evaluación antibacteriana y citotóxica

Thermo-polymerizable acrylic enriched with copper nanoparticles: Antibacterial and cytotoxic evaluation

Liliana Argueta-Figueroa,^{1,*} Daniela Itzel Mesta-Pichardo,^{*}
Nayely Torres-Gómez,^{**} O. Martínez-Alvarez,^{***}
Ángel David Paulino-González,^{*} M. C. Arenas-Arrocena^{2,*}

ABSTRACT: The objective of this study was to determine the bacterial inhibition on *S. aureus*, *E. coli* and *E. faecalis*, as well as the cytotoxicity of thermo-polymerizable acrylic (PMMA) enriched with copper nanoparticles (Cu NPS) on human gingival fibroblasts. Cu NPS are an area of interest in dentistry especially for its potential antibacterial effect. PMMA is one of the materials whose use is very widespread in current dental practice, but it has bacterial and fungal proliferation, which is why it is necessary to look for new strategies for its improvement. The data obtained in the present study show that the incorporation of Cu NPS in the surface of the PMMA improves its antibacterial properties, either through the inhibition of the bacterial growth, as well as in the bacterial adhesion to its surface. In addition, it exhibits adequate cytotoxicity since it turned out to be light to moderate. Due to the above, this material could be an option to be used in removable prosthesis bases of thermocurable PMMA.

KEYWORDS: copper nanoparticles, acrylic resins, bacterial growth, cell viability, biocompatibility.

Recibido: 10 de enero de 2018.

Aceptado: 28 de abril de 2018.

¹ Liliana Argueta-Figueroa agradece a DGAPA-UNAM por la beca posdoctoral brindada. Gracias por el financiamiento otorgado a través de PAPIIT IN225516 y IA204516. PAPIIME: PE210616, PE201617 y PE208518; SENER-CONACYT proyecto no. 207450 (CEMIE-Sol/27), CONACYT-México (CB176450) y SENER-CONACYT (245811), y Red Farmoquímicos de CONACYT. Gracias a Uvaldo Hernández-Balderas, por el análisis XRD realizado en CCIQS UAEM-UNAM, y a Marina Vega-González por el soporte técnico.

² Autor para correspondencia: (carenas@enes.unam.mx), (mcaa05@gmail.com).

* Universidad Nacional Autónoma de México, Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, Área de Nanoestructuras y Biomateriales, Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria, León, Guanajuato, México.

** Universidad Autónoma del Estado de México-Universidad Nacional Autónoma de México, Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable, Toluca, Estado de México, México.

*** Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Ciudad de México, México.

RESUMEN: El objetivo de este estudio fue determinar la inhibición bacteriana sobre *S. aureus*, *E. coli* y *E. faecalis*, así como la citotoxicidad de acrílico termopolimerizable (PMMA) enriquecido con nanopartículas de cobre (Cu NPs) sobre fibroblastos gingivales humanos. Las Cu NPs resultan un área de interés en odontología especialmente por su potencial efecto antibacterial. El PMMA es uno de los materiales cuyo uso se encuentra muy difundido en la actual práctica odontológica, pero presenta proliferación bacteriana y fúngica, por lo cual es necesario buscar nuevas estrategias para su mejoramiento. Los datos obtenidos en el presente estudio muestran que la incorporación de Cu NPs en la superficie del PMMA mejora sus propiedades antibacterianas, ya sea a través de la inhibición del crecimiento bacteriano, así como en la adhesión bacteriana a su superficie. Además, exhibe adecuada citotoxicidad ya que ésta resultó ser de ligera a moderada. Debido a lo anterior, este material podría ser una opción para ser empleado en bases de prótesis removibles de PMMA termocurable.

PALABRAS CLAVE: nanopartículas de cobre, resinas acrílicas, crecimiento bacteriano, viabilidad celular, biocompatibilidad.

Introducción

Las resinas acrílicas son polímeros muy utilizados en odontología, pues constituyen un material costeable, accesible y de fácil manipulación. (Frazer *et al.*, 2005). Las resinas acrílicas de interés en odontología son las derivadas del ácido acrílico y del ácido metacrílico, que polimerizan por adición y presentan propiedades adecuadas en cuanto a su estabilidad fisicoquímica, manipulación y estética (Pfeiffer y Rosenbauer, 2004). El acrílico termopolimerizable es uno de los materiales cuyo uso se encuentra más difundido en la actual práctica odontológica, con éste se fabrican, usualmente, tanto dientes provisionales como bases para dentaduras parciales o totales, mediante la polimerización de partículas de polvo de polimetilmetacrilato (PMMA) prepolimerizado mezcladas con monómero de metacrilato de metilo (MMA) (Wieckiewicz *et al.*, 2016). Sin embargo, la frecuente colonización de las superficies acrílicas puede generar la presencia de inflamación, dolor e infecciones que afectan a los pacientes que han sido rehabilitados con este material. Diferentes especies de *Candida* y de bacterias se han aislado del 63.3% de las prótesis y de los tejidos bucales de los pacientes desdentados en comparación con aquellos pacientes que conservan sus dientes (Abbas A. Jafari *et al.*, 2014). Debido a esto, la búsqueda de nuevas estrategias para la mejora de este material es indispensable (Arenas-Arrocena *et al.*, 2017).

El desarrollo en la manufactura de este tipo de polímeros es notable y se ve favorecido por los avances tecnológicos actuales, resultando de particular interés para áreas emergentes y prometedoras como la nanotecnología en donde en fechas recientes las investigaciones se han enfocado en el desarrollo de polímeros combinados con NPs metálicas (Allaker y Memarzadeh, 2014). La nanotecnología es considerada una tecnología reciente que partiendo de dimensiones de 1 a 100 nm manipula los materiales con la finalidad de mejorar el diseño, elaboración y propiedades de los mismos a nivel macroscópico (European-Commission 2014).

Con base en la nanoescala antes referida las partículas esféricas dentro de este rango son denominadas nanopartículas (NPs) y éstas poseen propiedades únicas en relación con su naturaleza, tamaño, distribución, morfología y tendencia a la aglomeración (Uskokovic, 2013). Si bien la nanotecnología se ha visto inmersa en todos los campos de la odontología, destaca principalmente su aplicación en la elaboración de materiales de restauración para potenciar sus propiedades y conferirles otras deseables, como propiedades antibacterianas; este potencial efecto resulta de particular interés en materiales que se utilicen para aplicaciones clínicas que impliquen un mayor riesgo para el desarrollo y crecimiento bacteriano, como lo son las bases para dentaduras (Hannig y Hannig, 2013).

Las nanopartículas metálicas más utilizadas y estudiadas en cuanto a su efecto antibacterial son las de dióxido de titanio, plata y óxido de zinc. Sin embargo en fechas recientes las nanopartículas de cobre (Cu NPs) han resultado un área de interés debido a sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas, lo que lo hace un elemento promisorio y potencialmente viable para distintas aplicaciones (Camacho-Flores *et al.*, 2015). En un estudio *in vitro* evaluó la actividad antimicrobiana de las Cu NPs y se encontró que la concentración mínima inhibitoria (MIC) fue de 10 µg/ml para *E. coli*, mientras que para *S. aureus* y *S. mutans* fue de 100 µg/ml. (Argueta-Figueroa *et al.*, 2014), sin embargo no se evaluó la biocompatibilidad. Al revisar la literatura es notorio que se ha determinado dicha actividad antimicrobiana en las nanopartículas metálicas, pero es infrecuente que también se evalúe simultáneamente su citotoxicidad. En otro estudio, se determinó la citotoxicidad en células provenientes de la epidermis de la piel humana de micropartículas y NPs de óxido de cobre (II) (CuO) así como de cloruro de cobre (CuCl₂), con fines de comparación, el contenido de cobre en todos los grupos fue equivalente a 0.21 mg/ml (170 ppm) y se encontró que la viabilidad celular disminuyó al 50% con las micropartículas de CuO, al 87% con NPs de CuO, y al 83% con CuCl₂ (Cohen *et al.* 2013). Sin embargo, se ha postulado que el análisis del impacto biológico y los posibles efectos citotóxicos de los materiales, y en especial de las nanopartículas, debido a sus interacciones a nivel celular, deben ser determinados a la par, con la finalidad de ponderar el riesgo-beneficio de dichos materiales para un uso eficiente y responsable (García-Contreras *et al.*, 2015).

Por lo tanto, el propósito de este estudio fue determinar la inhibición bacteriana (sobre *S. aureus*, *E. coli* y *E. faecalis*) así como la citotoxicidad (sobre fibroblastos gingivales humanos) de acrílico termopolimerizable (PMMA) enriquecido con nanopartículas de cobre.

Material y método

Material

Cloruro de cobre (CuCl₂, Sigma-Aldrich, St Luis, MO, EUA.), borohidruro de sodio (NaBH₄, Sigma-Aldrich), citrato de sodio (Na₃C₆H₅O₇, Sigma-Al-

drich), alcohol isopropílico (Karl, S. A. de C. V. León, Gto., México), yeso (Tipo IV, Manufacturera Dental Continental S. A. de C. V. México), separador yeso-yeso (Mcd dental, Zapopan, Jal. México), acrílico termopolimerizable (PMMA, Opticryl, New Stetic, Powerline Road, Florida, EUA), metilmetacrilato (Opticryl, New Stetic), caldo Mueller-Hinton (Sigma-Aldrich), agar Mueller-Hinton (Sigma-Aldrich), 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenilte-trazol (MTT, Sigma-Aldrich), dimetilsulfóxido (DMSO, J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), Alfa Modificación del Medio de Eagle (α -MEM, Life Technologies, Gibco[®], Gran Island, NY, EUA), suero fetal bovino (FBS, Life Technologies, Gibco[®]), penicilina/estreptomina (Life Technologies, Gibco[®]) y Glutamax (Life Technologies, Gibco[®]), tripsina (Life Technologies, Gibco[®]), EDTA-2Na (Life Technologies, Gibco[®]), solución buffer (PBS(-), Life Technologies, Gibco[®]).

Síntesis de las nanopartículas de cobre

La síntesis de Cu NPs se realizó mediante el método de reducción química de acuerdo con un método previamente reportado (Argueta-Figueroa *et al.*, 2014) con ligeras modificaciones; se empleó CuCl_2 como precursor, NaBH_4 como agente reductor y citrato de sodio como agente estabilizador, este último se agregó a la solución de las nanopartículas de cobre cuando la reacción se completó y se mantuvo en agitación por 10 minutos más. El producto obtenido, se lavó con acetona tres veces con el propósito de retirar residuos de la reacción. Las nanopartículas se suspendieron en agua deionizada, alcohol isopropílico, o se secaron a 60°C antes de realizar los análisis correspondientes de acuerdo a la naturaleza de cada prueba como se describe a continuación en las secciones posteriores.

Caracterización de nanopartículas

Se llevó a cabo la caracterización de las nanopartículas de cobre suspendidas en solución acuosa a través del análisis Uv-vis, empleando un espectrofotómetro (Thermo Scientific, St. Luis, MO, EUA). El espectro obtuvo en un rango de 400-800 nm.

El análisis de tamaño de partícula y morfología se realizó mediante microscopía de transmisión electrónica, TEM (JEOL mod. JEM-1010). Las nanopartículas de cobre se suspendieron en alcohol isopropílico, se sonicaron durante media hora y se colocó una gota en una rejilla de cobre recubierta con fomvar y carbono para la obtención de las micrografías.

Por otro lado, la fase cristalina y la composición de las nanopartículas de cobre se determinaron a través de difracción de rayos X (DRX), utilizando un difractómetro Bruker D8 Advance de rayos X (Frankfurt, Alemania), operado a 35 kV, 30 mA, con radiación $\text{CuK}\alpha 1$ (longitud de onda $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) y filtro de cobre. El difractograma de rayos X se obtuvo en un rango de 2θ de 0° a 80° con una velocidad de paso de 0.049° .

Procesamiento de los discos de acrílico termopolimerizable (PMMA)

Se fabricaron discos de cera rosa toda estación con un tamaño de 15 mm de diámetro con un grosor de 3 mm, lo cual permitió que los discos fueran colocados en los pocillos de la microplaca de 24 pocillos. Se pulieron los discos de cera con espátula de lecrón y se alisaron con monómero y gasas. Todas las superficies internas de la mufia se aislaron con petrolato para evitar que el yeso se adhiriera a ellas. Se vertió yeso tipo IV en la parte inferior de la mufia, se colocaron discos de cera, previa aplicación de petrolato en la superficie de los discos e introduciendo hasta la mitad del grosor de éstos para evitar retenciones.

Después de que el yeso fraguó, se aisló la superficie de éste con separador yeso-yeso y se inició una segunda fase de inclusión de yeso tipo IV cerrando con la mufia superior y cubriendo los discos con el yeso. Una vez terminado el tiempo de fraguado del yeso, se abrió la mufia y se retiraron los discos de cera. Se preparó PMMA termopolimerizable colocando el monómero en un recipiente de vidrio y sobre éste se adicionó el polímero en una relación de tres partes de polímero y una parte de monómero en volumen. El recipiente permaneció cerrado hasta que el acrílico alcanzó el estado filamentososo, entonces se colocó en la mufia, se cubrió con una lámina de polietileno y se cerró la mufia. La mufia se prensó en forma lenta hasta llegar a 1500 psi. Se descargó la prensa, se destapó la mufia y se removió la película de polietileno, retirando el excedente de acrílico. Se cerró nuevamente la mufia y se aplicó una presión definitiva de 2000 psi. Después del prensado final y todavía bajo presión, se instalaron los tornillos, hasta que éstos se apoyaron en la superficie de la mufia.

El horno de microondas que se empleó para la polimerización, debe tener una potencia mínima de 800 watts y máxima de 1300 watts. Se colocó la mufia sobre el plato giratorio dentro del horno, con los tornillos hacia abajo. En la primera fase, se programó el horno 3 minutos a una potencia de 40%. En la segunda fase, se dejó 4 minutos con la mufia dentro del horno apagado. En la tercera fase, se programó el horno 3 minutos a la máxima potencia. Por último, se retiró la mufia del microondas y se colocó en una tina con agua fría, durante 45 minutos. Posteriormente, se retiraron los tornillos de la mufia y se separan cuidadosamente la mufia de la contramufia. Se eliminaron las irregularidades de la muestra dejando una superficie lisa y tersa con ayuda de lijas de agua grano fino.

Recubrimiento del acrílico termopolimerizable (PMMA) con nanopartículas de cobre

Los discos de acrílico se colocaron en el Spin Coater (Holmarc Opto-mechanics, modelo HO-TH-05, Kalamassery, India) y se recubrieron con 40 µl de Cu NPs a diferentes concentraciones (31.5, 15.75, 7.875, 3.9375 y 0 µg). Se inició dicho recubrimiento colocando 40 µl de la solución de las nanopartículas con el dispositivo funcionando a 1500 rpm por 15 s y, posteriormente, a 1200 rpm por otros 15 s. Por último, se colocaron los discos en el horno a 60 °C por 60 s.

Evaluación de la inhibición bacteriana en acrílico termopolimerizable (PMMA) con nanopartículas de cobre

Los experimentos sobre la actividad antimicrobiana se llevaron a cabo según lo descrito por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) (Wikler 2009). La inhibición bacteriana de las Cu NPs en los discos de acrílico termopolimerizable (PMMA) se probó contra las bacterias patógenas humanas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* determinando la concentración inhibitoria mínima (MIC) y la concentración bactericida mínima (MBC) siguiendo el método de dilución en caldo. En una microplaca de 24 pocillos se colocaron los discos de acrílico con recubrimiento a diferentes concentraciones de Cu NPs, discos de acrílico sin recubrimiento, controles positivo y negativo, cada uno por triplicado.

En cada pocillo se adicionó 1 mL caldo Mueller-Hinton. Previamente se habían empleado medios selectivos para cultivar cada cepa y después cada una se cultivó en medio no selectivo y se incubó a 37 °C durante 24 h, el día previo al experimento, para obtener cultivos bacterianos frescos, los cuales se usaron para preparar el respectivo patrón de McFarland de cada cepa bacteriana. Cada patrón de McFarland se diluyó en relación 1:20 utilizando solución salina al 8%. Después de la colocación de los discos en cada pocillo se inoculó cada uno asépticamente con la respectiva suspensión bacteriana (la concentración final fue de aproximadamente 5×10^5 CFU/ml). Una vez inoculada, la microplaca se incubó a 37 °C durante 24 h, en una incubadora con agitación a 200 rpm. Se traspasaron 100 µl de la solución de cada uno de los pocillos a una caja de 96 pocillos y se agregaron 100 µl de MTT (0.0002 g/ml) disuelto en PBS en cada pocillo, se incubó la placa durante 4 h y se adicionaron 100 µl de DMSO en cada pocillo. La presencia o ausencia de turbidez en cada pocillo se observó mediante el método MTT. La densidad óptica se leyó en un lector de microplaca (Thermo Scientific, St. Luis, MO, EUA) a 595 nm.

Los resultados se expresaron como porcentaje de las bacterias viables en comparación con los controles no tratados. La concentración mínima de los pocillos que no mostraron turbidez (ausencia a simple vista de los cristales de formazano) se registró como MIC, para cada cepa bacteriana. El MBC se identificó mediante la determinación de la concentración más baja de agente antibacteriano que reduce la viabilidad del inóculo bacteriano inicial por $\geq 99.9\%$ o ≥ 3 log de reducción del recuento de inóculo. Para esto, se subcultivaron los pocillos en placas de agar Mueller-Hinton para corroborar los datos obtenidos a partir de la lectura de la densidad óptica antes mencionada.

Evaluación de la adhesión bacteriana en acrílico termopolimerizable (PMMA) con nanopartículas de cobre

Se realizaron experimentos de adhesión bacteriana utilizando cepas dos bacterianas gram-positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*) y una cepa gram-negativa (*E.*

coli). La prueba de adhesión bacteriana se realizó como sigue: en una caja de 24 pocillos, se colocaron 6 ml de caldo nutriente Mueller–Hinton en cada uno de los pocillos. Posteriormente se inocularon los pocillos con la respectiva cepa bacteriana a una concentración equivalente a 0.5 de McFarland, es decir, de 1×10^8 CFU/mL. A continuación, los especímenes (discos de PMMA con nanopartículas de cobre a diferentes concentraciones, así como los controles de PMMA sin nanopartículas) se colocaron en los pocillos. Después de 24 h de incubación a 37 °C bajo agitación continua a 100 rpm, se retiraron cuidadosamente los especímenes del medio, las bacterias adheridas se lavaron con PBS para retirar a aquellas bacterias que se encuentran no adheridas a los especímenes. Las bacterias adheridas a cada disco de PMMA se removieron con hisopos estériles y se cuantificaron mediante subcultivos de 100 μ l a una placa de agar Mueller–Hinton y se contaron las bacterias supervivientes después de 24 h de cultivo a 37 °C como CFU. Cada experimento se repitió por triplicado.

Evaluación de la citotoxicidad en acrílico termopolimerizable (PMMA) con nanopartículas de cobre

Cultivo celular. Se subcultivaron fibroblastos gingivales humanos (HGF) en su división celular número 8 en un plato de 10 cm con α -MEM, FBS, penicilina 100 UI/mL, estreptomycin 100 mg/ml y 1% de Glutamax. Las células se recogieron después mediante tratamiento con tripsina al 0.25%, EDTA–2Na en PBS(-).

Ensayo de actividad citotóxica. Se inocularon células HGF (2×10^5 células/ml) en cada pocillo de una microplaca de 24 pocillos y se incubaron durante 48 h para conseguir la adherencia y proliferación celular completa. En cada pocillo se colocan los discos de acrílico con recubrimiento a diferentes concentraciones de Cu NPs, discos de acrílico sin recubrimiento, controles positivo y negativo, cada uno por triplicado, se incubó por 24 h. El porcentaje de células viables se determinó mediante el método MTT. Este método consiste en reemplazar el medio de cultivo con MTT (0.2 mg / ml) disuelto en DMEM y las células se incubaron durante 4 h a 37 °C. Después de sustituir el medio, el producto de formazano se disolvió con DMSO. Las células viables permanecen en el fondo de los pocillos, por lo que el sobrenadante se separa y se lava tres veces, después se realizan las lecturas de los pocillos a una absorbancia óptica de 570 nm usando un lector de microplacas. Adicionalmente, se obtuvieron imágenes en el microscopio óptico (Leica DMIL Led, Axi CAM MRC Zeiss, Alemania). El grado de citotoxicidad se clasificó de acuerdo con la ISO 10993-5, Evaluación biológica de dispositivos médicos, Parte 5: pruebas de citotoxicidad *in vitro*, la cual clasifica como no citotóxico (viabilidad celular superior al 75%), ligeramente citotóxica (viabilidad celular que varía entre 50% y 75%), moderadamente citotóxica (viabilidad celular que varía entre 25% y 50%) y severamente citotóxica (viabilidad celular inferior a 25%).

Resultados y discusión

Caracterización

El cobre, conocido desde hace mucho tiempo por su actividad antibacteriana y por su costo relativamente bajo, es un atractivo agente biocida (Camacho-Flores *et al.*, 2015). El coste económico de las NPs de cobre es bajo en comparación con otros nanomateriales metálicos como el oro y la plata. El uso práctico de las nanopartículas de Cu se enfrenta a la principal dificultad que surge de su inestabilidad debido a la oxidación que sufre en contacto con el ambiente. Además, la estabilidad coloidal de las nanopartículas así como su solubilidad en agua son factores indispensables para su potencial uso en aplicaciones biológicas. Por lo que el empleo de nanopartículas solubles en agua es necesario para asegurar su solubilidad en este medio. En lo que respecta a la caracterización de las nanopartículas de cobre, en la literatura se ha reportado que las nanopartículas de cobre metálico tienen una banda de absorción centrada en 570 y 600 nm asignada a la resonancia del plasmón superficial, pero debido a que el cobre se oxida fácilmente en condiciones ambientales, las nanopartículas podrían presentar una monocapa de óxido la cual puede ser identificada como una banda de absorción residual centrada en 800 nm (Khanna *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010; Silvester *et al.*, 1991). En la figura 1, se observa un valor máximo en 593 nm, por lo que podemos concluir que se obtuvieron nanopartículas de cobre metálico y que el surfactante utilizado evitó la oxidación, ya que no se observa la banda de 800 nm correspondiente al óxido de cobre.

En la figura 1b), se muestra la micrografía del producto de la síntesis de las nanopartículas de cobre recubiertas con el citrato, se distingue que las nanopartículas tienen una morfología similar y una distribución de tamaño uniforme. Se observa un aglomerado de nanopartículas poliedrales, las cuales presentan un tamaño promedio de menor a 20 nm.

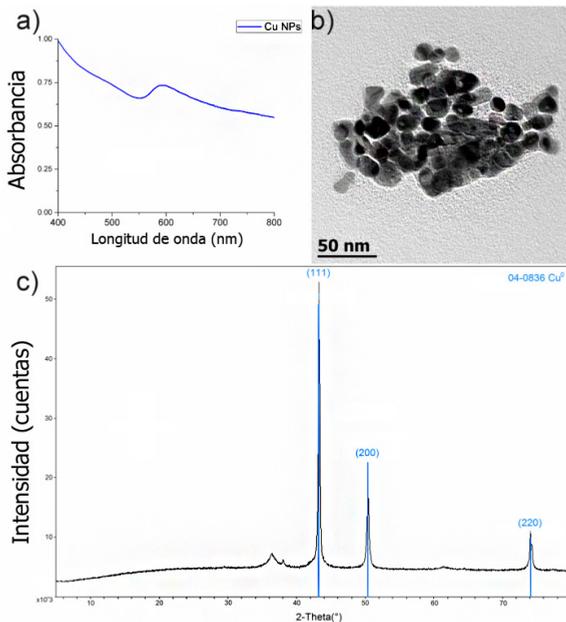
En la figura 1c) se muestra el patrón de difracción obtenido, los picos de difracción indexados (111), (200) y (220), indican la presencia de cobre metálico, al ser comparados con la tarjeta cristalográfica JCPDS 04-0836.

Evaluación de la inhibición bacteriana en acrílico termopolimerizable (PMMA) con nanopartículas de cobre

Las nanopartículas metálicas pueden incorporarse en la superficie de un polímero o incorporarse a la matriz. En particular, las nanopartículas de cobre han sido impregnadas en la superficie de fibras de algodón, látex y otros materiales poliméricos (Borkow y Gabbay, 2005).

Los resultados de este estudio pueden observarse en la figura 2, donde hay un efecto de inhibición del crecimiento bacteriano sobre las bacterias en estudio al estar en contacto con las nanopartículas de cobre sobre los discos de PMMA. En diversos estudios se ha mostrado que las técnicas actuales para procesar bases acrílicas para dentaduras producen cierto grado de porosi-

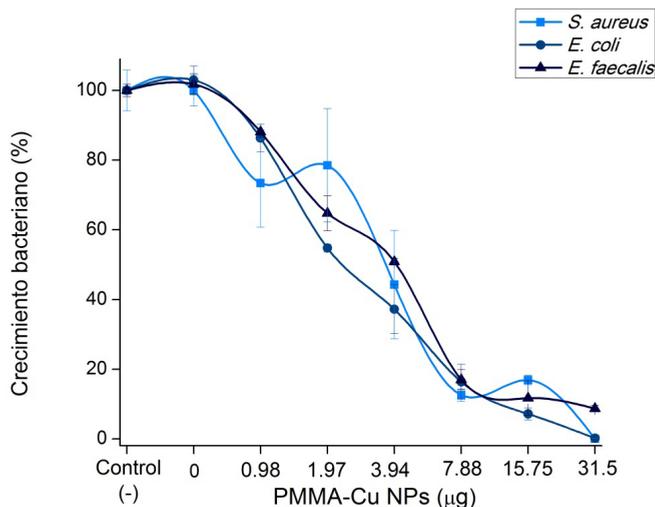
FIGURA 1 a) Espectro Uv-vis de las nanopartículas de cobre. b) Micrografía de TEM en donde se aprecia la morfología y tamaño de las Cu NPs sintetizadas. c) Difractograma de las nanopartículas de cobre.



Fuente: Elaboración de los autores.

dades, las cuales permiten la colonización bacteriana (Lee, Lee y Nam, 2008). Una forma de abordar este problema es cubriendo la superficie de PMMA con nanomateriales que exhiban un efecto antimicrobiano. Desde la introducción de agentes antimicrobianos basados en nanopartículas, éstos han generado un gran interés (García-Contreras *et al.*, 2011). Se han discutido diversos mecanismos para explicar la actividad de los materiales nanoestructurados, como la liberación de iones desde la superficie de las nanopartículas, la internalización a través de la pared celular, la producción de especies reactivas de oxígeno y el daño estructural a la membrana debido a vértices presentes en la morfología de las nanoestructuras (Lemire, Harrison y Turner, 2013; Fu *et al.*, 2014; Mandal, 2016; Van Dong, Ha y Kasbohm, 2012). Por lo que resulta crucial la búsqueda de superficies que cuenten con efecto de inhibición bacteriana. A la máxima concentración de estudio, que fue 31.5 μg por disco de PMMA, se encontró una reducción del crecimiento bacteriano de 99.9%, 99.8% y 91.3% para *S. aureus*, *E. coli* y *E. faecalis*, respectivamente, lo que indica que existe una inhibición bacteriana considerable. En este estudio se emplearon *S. aureus* y *E. coli* como referentes para bacterias gram positivas y gram negativas, respectivamente.

Se observa en el presente estudio al igual que los resultados de otros reportes en la literatura que las bacterias gram positivas resultan más sensi-

FIGURA 2. Gráfico de la inhibición del crecimiento bacteriano al estar en contacto con las nanopartículas de cobre sobre PMMA a diferentes concentraciones.

Fuente: Elaboración de los autores.

bles en comparación con las gram negativas a la acción de las nanopartículas, lo cual es atribuible al tipo de membrana. Mientras que las bacterias gram negativas presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, las bacterias gram positivas presentan una única membrana lipídica, siendo la pared de peptidoglicano mucho más gruesa. Sin embargo, la bacteria que se empleó por su resistencia a muchos agentes antibióticos fue *E. faecalis*. Dicha bacteria se caracteriza por resistir condiciones consideradas extremas, como ser capaz de sobrevivir en un medio con un pH de hasta 11 (McHugh *et al.*, 2004). Por lo que el efecto de la inhibición bacteriana alcanzada en este estudio fue menor que en las dos bacterias mencionadas anteriormente; por lo tanto, para *E. faecalis*, el efecto del PMMA-Cu NPs puede considerarse bacteriostático. En otros estudios se ha reportado el uso de nanopartículas metálicas para proporcionar al PMMA un efecto antimicrobiano. Se ha determinado la inhibición bacteriana de PMMA-Cu NPs inmovilizadas con bentonita para *S. aureus* (ATCC 25123), y los autores concluyeron que este material exhibe un efecto bacteriostático para la cepa en estudio (Weickmann *et al.*, 2005). Además se ha desarrollado un material de PMMA-dióxido de titanio (TiO₂) con actividad antibacteriana, para la fabricación de prótesis dentales impresas en 3D (Totu *et al.*, 2017). Al parecer, el PMMA-TiO₂ (preparado por sol-gel) presenta un efecto antibacteriano fotoinducido para la reducción en el crecimiento bacteriano bajo la luz natural interior, pues casi el 100% de *S. aureus* y *E. coli*, se inactivaron con 2 horas de iluminación. En compa-

ración con el PMMA sin ningún tratamiento, también se demuestra la capacidad superior de antiadhesión de la superficie de PMMA-TiO₂. (Su *et al.*, 2010). Otras nanopartículas de óxido metálico que también se han utilizado para su integración a PMMA son las nanopartículas de dióxido de hierro. Estas nanopartículas mejoraron las propiedades antimicrobianas y mecánicas de las resinas acrílicas (Acosta-Torres *et al.*, 2014). También se ha demostrado que la incorporación de nanopartículas en el PMMA resulta en un material biocompatible y que presenta buenas propiedades físicas y mecánicas (Moreno-Maldonado *et al.*, 2012).

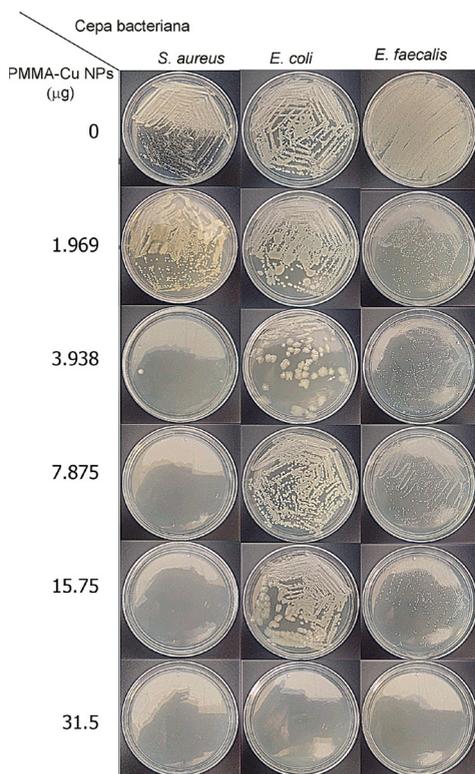
Evaluación de la adhesión bacteriana en acrílico termopolimerizable (PMMA) con nanopartículas de cobre

Se encontró que existe una disminución de la adhesión bacteriana de las cepas en estudio a la superficie de PMMA con nanopartículas de cobre que es dosis-dependiente, es decir, que a mayor concentración de las nanopartículas en la superficie de los discos de PMMA

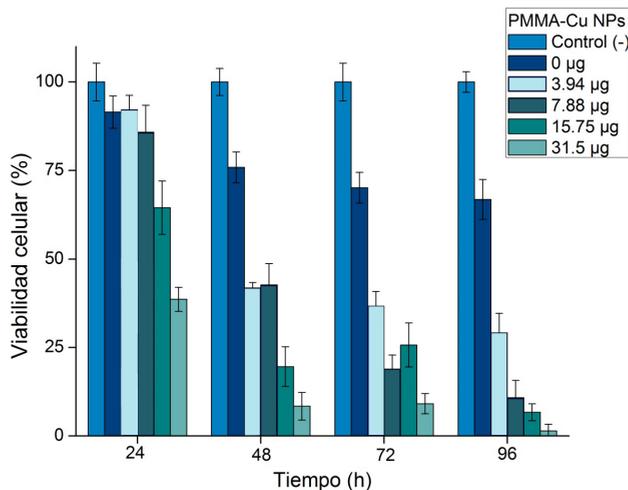
menor es la adhesión de las bacterias (figura 3). *S. aureus* fue la bacteria que presentó una mayor disminución en la adherencia sobre el PMMA-Cu NPs, mientras que *E. coli* y *E. faecalis* solamente no presentaron adherencia bacteriana a la concentración más alta (31.5 µg por disco).

En otros estudios previos, se ha observado que la adherencia de *Candida albicans* se redujo significativamente en el grupo de PMMA con nanopartículas de plata en comparación del PMMA sin nanopartículas (Acosta-Torres *et al.*, 2012). Además del efecto a través de los mecanismos antibacteriales propios de las nanopartículas, es posible que al colocarse las nanopartículas sobre la superficie del PMMA éstas ocupen los espacios de formados por las porosidades propias del procesamiento de este polímero. Dicho efecto físico a través de la reducción de la rugosidad sobre la superficie del PMMA también es posible que prevenga la adhesión bacteriana (Acosta-Torres *et al.*, 2011).

FIGURA 3. Imágenes de los subcultivos que muestran la inhibición de la adhesión bacteriana al estar en contacto con nanopartículas de cobre sobre la superficie de PMMA a diferentes concentraciones.



Fuente: Elaboración de los autores.

FIGURA 4. Gráfico de citotoxicidad de las nanopartículas de cobre en fibroblastos gingivales humanos (HGF) a diferentes intervalos de tiempo.

Fuente: Elaboración de los autores.

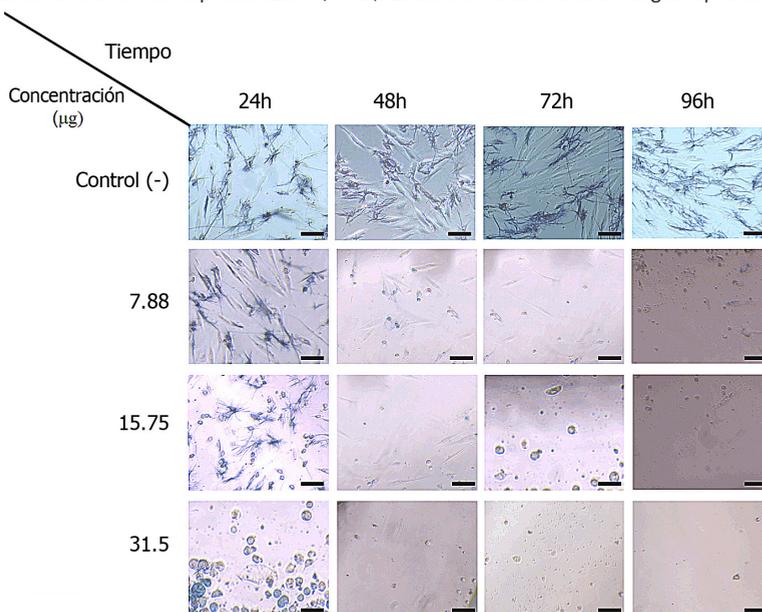
Evaluación de la citotoxicidad enacrílico termopolimerizable (PMMA) con nanopartículas de cobre

En la figura 4 puede observarse la viabilidad celular en los discos deacrílico termopolimerizable (PMMA). De acuerdo con la Norma ISO I10993-5 resultando que el PMMA sin nanopartículas, a las 24 horas, presenta una viabilidad superior al 75%, por lo que se considera no citotóxico, sin embargo, a las 48, 72 y 96 h muestra una citotoxicidad ligera (viabilidad celular menor a 75%). En general, a las 24 horas, se observa una citotoxicidad de ligera a moderada para las dos concentraciones más altas de nanopartículas sobre PMMA. Sin embargo, es evidente que la citotoxicidad aumenta conforme se incrementan los intervalos de tiempo. También se observa que, mientras mayor es la concentración de las nanopartículas, la viabilidad celular decrece, por lo tanto exhiben un comportamiento dosis-dependiente.

Se observa en las imágenes de microscopía óptica la viabilidad de HGF a intervalos de 24, 48, 72 y 96 h en función de la concentración del recubrimiento de las nanopartículas de cobre en los discos de PMMA (figura 5). Las bases para dentaduras formadas por resinaacrílica de PMMA, que están en contacto con la mucosa oral del paciente, es un aspecto crítico para la biocompatibilidad en contacto con los tejidos, por lo cual resulta importante conocer el grado de citotoxicidad.

La citotoxicidad de PMMA se correlaciona con los métodos de polimerización, la temperatura, el ciclo de polimerización y el tiempo de almacenamiento de la resinaacrílica puede influir en la cantidad de monómero residual y la citotoxicidad del material. El PMMA termopolimerizable en sí, presenta un cierto grado de citotoxicidad (Neves *et al.*, 2013) lo cual concuerda con los resultados del presente estudio.

FIGURA 5. Imágenes de microscopía óptica a una magnificación de 200x. Se observa la viabilidad de HGF a intervalos de 24, 48, 72 y 96 h en función de la concentración del recubrimiento de las Cu NPs en los discos de acrílico termopolimerizable (PMMA). La barra de escala en cada imagen representa 5 μm .



Fuente: Elaboración de los autores.

Conclusiones

Bajo las condiciones de este estudio, puede concluirse que la incorporación de nanopartículas de cobre en la superficie del PMMA termopolimerizable mejora sus propiedades a través de la inhibición del crecimiento bacteriano y la inhibición de la adhesión bacteriana en su superficie. El PMMA sin nanopartículas mostró una disminución en la viabilidad celular, la cual aumenta en función del tiempo de exposición. La citotoxicidad que exhibió el PMMA enriquecido con nanopartículas de cobre exhibió una citotoxicidad dosis-dependiente, la cual también se incrementa en función del tiempo de exposición.

Referencias

- Abbas Ali Jafari, Abbas Fallah-Tafti, Ali Fattahi-bafghi, Benafsha Arzy (2014). Comparison the occurrence rate of oral candida species in edentulous denture wearer and dentate subjects. *International Journal of Medical Laboratory*, 1(1): 15-21.
- Acosta-Torres, L. S., Arenas, M. C., Nuñez-Anita, R. E., Barceló-Santana, F. H., Álvarez-Gayosso, C. A., Palacios-Alquisira, J., de la Fuente-Hernández, J., Cajero-Juárez, M y Castaño, V. M. (2014). Nanopigmented acrylic resin cured

- indistinctively by water bath or microwave energy for dentures. *Journal of Nanomaterials*, vol. 2014: 3. Hindawi Publishing Corp.
- Acosta-Torres L. S., López-Marín, L. M., Nunez-Anita, R. E., Hernández-Padrón, G. y Castaño, V. M. (2011). Biocompatible metal-oxide nanoparticles: Nanotechnology improvement of conventional prosthetic acrylic resins. *Journal of Nanomaterials*, vol. 2011: 12. Hindawi Publishing Corp.
<https://doi.org/10.1155/2011/941561>
- Acosta-Torres, L. S., Mendieta, I., Nuñez-Anita, R. E., Cajero-Juárez, M. y Castaño, V. M. (2012). Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 4777-4786.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S32391>
- Allaker, R. P. y Memarzadeh, K. (2014). Nanoparticles and the control of oral infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(2): 95-104.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.11.002>
- Arenas-Aroccena, M. C., Argueta-Figueroa, L., García-Contreras, R., Martínez-Arenas, O., Camacho-Flores, B., Del Pilar Rodríguez-Torres, M., De la Fuente-Hernández, J. y Acosta-Torres, L. S. (2017). New trends for the processing of poly (methyl methacrylate) biomaterial for dental prosthodontics. En *Acrylic Polymers in Healthcare*, 1st ed, InTech, 43-74. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69066>
- Argueta-Figueroa, L., Morales-Luckie, R. A., Scougall-Vilchis, R. J. y Olea-Mejía, O. F. (2014). Synthesis, characterization and antibacterial activity of copper, nickel and bimetallic Cu-Ni nanoparticles for potential use in dental materials. *Progress in Natural Science-Materials International*, 24(4): 321-328.
<https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2014.07.002>
- Borkow, G. y Gabbay, J. (2005). Copper as a biocidal tool. *Current Medicinal Chemistry*, 12(18): 2163-2175. Bentham Science Publishers.
<https://doi.org/10.2174/0929867054637617>
- Camacho-Flores, B. A., Martínez-Álvarez, O., Arenas-Aroccena, M. C., García-Contreras, R., Argueta-Figueroa, L., De La Fuente-Hernández, J. y Acosta-Torres, L. S. (2015). Copper: Synthesis techniques in nanoscale and powerful application as an antimicrobial agent. *Journal of Nanomaterials*, 2015: 1-7.
<https://doi.org/10.1155/2015/415238>
- Cohen, D., Soroka, Y., Ma'or, Z., Oron, M., Portugal-Cohen, M., Brégégère, F. M., Berhanu, D., Valsami-Jones, E., Hai, N. y Milner, Y. (2013). Evaluation of topically applied copper (II) oxide nanoparticle cytotoxicity in human skin organ culture. *Toxicology in vitro*, 27(1): 292-298, Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.026>
- Van Dong, P., Ha, C. H. y Kasbohm, J. (2012). Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles. *International Nano Letters*, 2(1): 9, Springer.
- European-Commission (2014). EU-European Commission Recommendation on the definition of nanomaterial. <<http://osha.europa.eu/en/news/eu-european-commissionrecommendation-on-the-definition-of-nanomaterial>>.
- Frazer, R. Q., Byron, R. T., Osborne, P. B. y West, K. P. (2005). PMMA: An essential

- material in medicine and dentistry. *Journal of long-term effects of medical implants*, 15(6): 629-639.
<https://doi.org/10.1615/JLongTermEffMedImplants.v15.i6.60>
- Fu, P. P., Xia, Q., Hwang, H.-M., Ray, P. C. y Yu, H. (2014). Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species', *Journal of food and drug analysis*, vol. 22, no. 1, Elsevier, 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.005>
- García-Contreras, R., Argueta-Figueroa, L., Mejía-Rubalcava, C., Jiménez-Martínez, R., Cuevas-Guajardo, S., Sánchez-Reyna, P. A. y Mendieta-Zeron, H. (2011). Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *International Dental Journal*, 61(6): 297-301.
<https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2011.00072.x>
- García-Contreras, R., Sugimoto, M., Umemura, N., Kaneko, M., Hatakeyama, Y., Soga, T., Tomita, M., Scougall-Vilchis, R. J., Contreras-Bulnes, R., Nakajima, H. y Sakagami, H. (2015). Alteration of metabolomic profiles by titanium dioxide nanoparticles in human gingivitis model. *Biomaterials*, 57: 33-40.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.03.059>
- Hannig, M. y Hannig, C. (2013). Nanobiomaterials in preventive dentistry. En Subramani, K., Ahmed, W. y Hartsfield, J. K. (eds.), *Nanobiomaterials in clinical Dentistry*, 167-186.
- Khanna, P. K., Gaikwad, S., Adhyapak, P. V., Singh, N. y Marimuthu, R. (2007). Synthesis and characterization of copper nanoparticles. *Materials Letters*, 61(25): 4711-4714, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.03.014>
- Lee, C.-J., Lee, M.-S. y Nam, K.-Y. (2008). Inhibitory effect of PMMA denture acrylic impregnated by silver nitrate and silver nano-particles for *Candida albicans*. *Journal of the Korean Chemical Society*, 52(4): 380-386, Korean Chemical Society.
- Lemire, J., Harrison, J. J. y Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(6): 371-384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>
- Mandal, B. K. (2016). Scopes of green synthesized metal and metal oxide nanomaterials in antimicrobial therapy. En Alexandru Grumezescu (ed.), *Nanobiomaterials in antimicrobial therapy: Applications of nanobiomaterials*. 210-300.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42864-4.00009-9>
- McHugh, C. P., Zhang, P., Michalek, S. y Eleazer, P. D. (2004). pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *Journal of endodontics*, 30(4): 218-219, Elsevier.
<https://doi.org/10.1097/00004770-200404000-00008>
- Moreno-Maldonado, V., Acosta-Torres, L. S., Barceló-Santana, F. H., Vanegas-Lancón, R. D., Plata-Rodríguez, M. E. y Castano, V. M. (2012). Fiber-reinforced nanopigmented poly (methyl methacrylate) as improved denture base. *Journal of Applied Polymer Science*, 126(1): 289-296, Wiley Online Library.
<https://doi.org/10.1002/app.36913>
- Neves, C. B., Lopes, L. P., Ferrão, H. F., Miranda, J. P., Castro, M. F. y Bettencourt, A. F. (2013). Ethanol postpolymerization treatment for improving the biocompatibility of acrylic relines. *BioMed Research International*, vol. 2013: 1-10.
<https://doi.org/10.1155/2013/485246>

- Pfeiffer, P. y Rosenbauer, E.-U. (2004). Residual methyl methacrylate monomer, water sorption, and water solubility of hypoallergenic denture base materials. *The Journal of prosthetic dentistry*, 92(1): 72-78, Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/S0022391304002057>
- Silvester, E. J., Grieser, F., Sexton, B. A. y Healy, T. W. (1991). Spectroscopic studies on copper sulfide sols. *Langmuir*, 7(12): 2917-2922, ACS Publications.
<https://doi.org/10.1021/la00060a009>
- Su, W., Wang, S., Wang, X., Fu, X. y Weng, J. (2010). Plasma pre-treatment and TiO₂ coating of PMMA for the improvement of antibacterial properties. *Surface and Coatings Technology*, 205(2): 465-469. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2010.07.013>
- Totu, E. E., Nechifor, A. C., Nechifor, G., Aboul-Enein, H. Y. y Cristache, C. M. (2017). Poly (methyl methacrylate) with TiO₂ nanoparticles inclusion for stereolithographic complete denture manufacturing- the future in dental care for elderly edentulous patients? *Journal of Dentistry*, 59: 68-77, Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.02.012>
- Uskokovic, V. (2013). Entering the era of nanoscience: Time to be so small. *Journal Biomed Nanotechnol*, 9(9): 1441-1470. <https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1642>
- Weickmann, H., Tiller, J. C., Thomann, R. y Mülhaupt, R. (2005). Metallized organoclays as new intermediates for aqueous nanohybrid dispersions, nanohybrid catalysts and antimicrobial polymer hybrid nanocomposites. *Macromolecular Materials and Engineering*, 290(9): 875-883, Wiley Online Library.
<https://doi.org/10.1002/mame.200500153>
- Wieckiewicz, M., Wolf, E., Richter, G., Meissner, H. y Boening, K. (2016). New concept of polymethyl methacrylate (PMMA) and polyethylene terephthalate (PET) surface coating by Chitosan. *Polymers*, 8(132).
<https://doi.org/10.3390/polym8040132>
- Wikler, M. A. (2009). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Approved Standard M7-A7, CLSI.
- Zhang, Q.-L., Yang, Z.-M., Ding, B.-J., Lan, X.-Z. y Guo, Y.-J. (2010). Preparation of copper nanoparticles by chemical reduction method using potassium borohydride. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, vol. 20, Elsevier, s240-s244. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(10\)60047-7](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(10)60047-7)