

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PLATAFORMAS NANOTECNOLÓGICAS DESTINADAS A LA INFILTRACIÓN DE  
LESIONES POR CARIES CON MATERIALES BIOACTIVOS

Autor: Martín Santiago Sainz Aja

Odontólogo

Tesis para aspirar al título de Magíster en Ciencias Químicas

Director: Prof. Dr. Santiago Palma

Co-Director: Prof. Dr. Gustavo Fabián Molina

Córdoba Argentina

2020

Este trabajo de tesis de maestría se realizó en la Facultad de Ciencias Químicas  
de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Director de Tesis: Prof. Dr. Santiago Palma

Co-Director: Prof. Dr. Gustavo Fabián Molina

Miembro de Comisión de Tesis: Prof. Dra. Miriam Strumia

Evaluador externo: Dra. Jorgelina Ulloque

Evaluador externo: Dra. Fabiana Oliva

## Agradecimientos:

A los integrantes de mi comisión de tesis, director Prof. Dr. Santiago Palma, co director Prof. Dr. Gustavo Fabián Molina y Dra. Miriam Strumia.

A mi comisión evaluadora: Prof. Dra. Jorgelina Ulloque y Dra. Fabiana Oliva

A los integrantes del equipo de investigación de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC: Natalia Angel Villegas, Jazmín Silvero Compagnucci, Diamela Rocca y María Cecilia Becerra.

Al Dr. Ricardo Cabral, Profesor titular de la Cátedra de Materiales Dentales de la UNC.

A las Dras. Raquel Gallará de la Cátedra de Química Biológica, y a las Dra. Alejandra Bojanich de la Cátedra de Microbiología ambas de la de la Facultad de Odontología de la UNC.

A las Doctoras Verónica Brunetti y Eliana Farías de la facultad de Ciencias Químicas de la UNC.

## Tabla de Contenidos

1.	Introducción.....	5
1.1	Antecedentes.....	10
1.2	Hipótesis.....	18
1.3	Marco Teórico.....	19
1.3.1	Odontología Mínimamente Invasiva.....	19
1.3.2	Nanotecnología en Odontología.....	22
1.3.2.1	Nanopartículas.....	23
1.3.2.2	Nanopartículas Metálicas.....	25
1.3.2.3	Nanocristales.....	26
1.4	Objetivo General.....	41
1.5	Objetivos Específicos.....	42
2.	Materiales y Métodos.....	43
2.1	Evaluación de Estabilidad de Nanopartículas de Zinc.....	43
2.2	Determinación de CIM de Nanopartículas de Zinc.....	45
2.3	Evaluación de profundidad de infiltración.....	46
2.4	Evaluación de dureza superficial.....	49
3.	Resultados.....	52
3.1	Resultados Objetivo Específico No. 1.....	52
3.2	Resultados Objetivo Específico No. 2.....	56
3.3	Resultados Objetivo Específico No. 3.....	58
3.4	Resultados Objetivo Específico No. 4.....	59
4.	Discusión.....	61
5.	Conclusión.....	66
6.	Referencias Bibliográficas.....	68

## 1. INTRODUCCIÓN

La caries dental, pertenece al grupo de patologías con mayor tasa de incidencia en la población a nivel mundial, afectando tanto a niños como a adultos. Dicha enfermedad, de etiología multifactorial se manifiesta clínicamente a través de signos como la desmineralización y la degradación de las estructuras del diente. Es un proceso complejo, continuo, localizado que en general progresa de manera lenta.

Se puede afirmar que ésta resulta de la pérdida del equilibrio entre la desmineralización y la remineralización a la que se exponen las piezas dentarias en el medio bucal. El origen del proceso se basa en la acción de un biofilm que se acumula sobre la superficie dentaria y elimina productos metabólicos por medio de sus sistemas enzimáticos que degradan los hidratos de carbono presentes en el medio provenientes de la dieta del individuo.

Los productos de dicha descomposición son ácidos débiles como el láctico y el pirúvico que al difundir actúan desmineralizando. En el metabolismo de un biofilm cariogénico deben interactuar a lo largo de un determinado tiempo, factores relacionados tanto a la dieta del individuo como a las características morfológicas de sus piezas dentales.

La destrucción localizada de las estructuras que componen el diente, en particular esmalte y dentina, son el signo de esta enfermedad, pudiendo ordenarse en escala ascendente desde la pérdida inicial del componente mineral de la matriz ultraestructural hasta la formación de una cavidad. El primer signo de caries en el esmalte es el aumento de su porosidad y opacidad que solo puede observarse

clínicamente luego de ser secado, observándose un cambio de coloración blanco mate debido a la alteración del pasaje de luz a través de los prismas afectados. Esta lesión inicial recibe el nombre de mancha blanca<sup>1, 2</sup>.

La matriz adamantina está compuesta principalmente por cristales de hidroxiapatita empaquetados en prismas. Cada cristal está separado de sus vecinos por un pequeño espacio ocupado por agua y sustancia orgánica, formando una fina red de pasajes de difusión denominados microporos o simplemente poros adamantinos. Al desmineralizarse el esmalte es más poroso; éste pequeño cambio en la porosidad del mismo, provoca un cambio en sus propiedades ópticas con respecto a la refracción de la luz; el esmalte se hace gradualmente menos translúcido y clínicamente se observa el cambio de coloración antes mencionado. Los estudios de microscopía óptica de las lesiones de esmalte no cavitadas han permitido establecer cuatro zonas en las que pueden diferenciarse distintos grados de pérdida de la matriz adamantina. Estas zonas no deben interpretarse como entidades distintas, ya que representan cambios en función del tiempo. Las zonas de la caries en esmalte a partir del frente de avance son: en primer lugar la zona translúcida (frente de avance de la lesión), luego zona Oscura (separa la zona translúcida del cuerpo de la lesión), tercero cuerpo de la lesión y cuarto la zona superficial (relativamente intacta).

Cuando una lesión de caries alcanza el límite del esmalte y su tejido subyacente, la dentina, la lesión del esmalte altamente porosa permite una difusión posterior de los ácidos dentro de la dentina que desencadenan respuestas defensivas del complejo dentino-pulpar. Una vez que se desmorona el esmalte y se

genera una cavidad, los microorganismos de la placa bacteriana invaden la dentina periférica y secretan una gama de enzimas hidrolíticas que degradan la matriz orgánica de ésta estructura.

El armazón orgánico se disgrega y a esta zona se le llama zona de dentina desorganizada o necrótica. Luego, la lesión invade la dentina siguiendo la dirección de los túbulos dentinarios y por consiguiente adopta la forma de un cono de base externa vértice interno, dirigido hacia la cámara pulpar.

Clínicamente desde la superficie hacia la profundidad de la lesión, se distinguen: 1. Dentina Necrótica: Masa pigmentada de color pardo u ocre, húmeda, blanda, fácilmente de retirar con instrumental manual, la cual está contaminada por microorganismos de la placa bacteriana., 2. Dentina infectada: más profunda, de color pardo amarillento, también blanda, de aspecto seco y curtido. Puede eliminarse con instrumental manual y se desprende en capas paralelas al límite amelodentinario, está infectada. 3. Dentina afectada: dentina reblandecida, desmineralizada. Todavía no ha sido invadida por bacterias y su matriz orgánica aún no se ha desnaturalizado irreversiblemente y 4. Dentina esclerótica: se encuentra si la lesión es de avance lento, es dura y de aspecto vítreo.

En la progresión de lesiones por caries las estructuras afectadas varían sustancialmente en su composición y su reparación requiere de materiales que puedan imitar sus características originales. El esmalte está compuesto por prismas de hidroxiapatita que son sales cristalizadas de fosfato de calcio. Estos cristales de naturaleza mineral representan un 97% de su contenido, mientras que el resto de su composición está constituido por el 2% de agua y el 1% de material orgánico.

La dentina, tejido del que se compone en mayor porcentaje un elemento dentario, presenta gran proporción de sustancia orgánica, principalmente colágeno y agua. Histológicamente, está compuesta por túbulos dentinarios, sustancia intertubular y procesos odontoblásticos también conocidos como fibrillas de Thomes. Dichos procesos son las prolongaciones de los odontoblastos, células diferenciadas presentes en la pulpa, por lo que, al referirnos a la dentina y debido a su estrecha relación con la pulpa, se hace referencia al complejo dentino-pulpar<sup>3-4</sup>.

El tratamiento de las lesiones causadas por la actividad de la enfermedad de caries se enfoca en la remoción de las estructuras afectadas, utilizando principalmente instrumental rotatorio o manual, por medio de piedras y fresas a diferente velocidad según la progresión de la lesión. Luego de dicha remoción, la cavidad resultante se rellena con materiales biocompatibles que procuran devolver forma, estética y función<sup>5</sup>.

Con el transcurso de los años los paradigmas que dominaban la odontología restauradora han migrado hacia posturas más conservadoras y con el advenimiento y evolución de materiales restauradores adhesivos, existe un consenso en la comunidad científica internacional, sobre los beneficios de una intervención más localizada, eliminando solo tejido patológico tratando de conservar la mayor parte del tejido sano al momento de realizar la remoción de tejido enfermo es decir un tratamiento mínimamente invasivo.

En los últimos tiempos, la reformulación de los objetivos de la Odontología Restauradora, ha procurado no sólo preservar la viabilidad celular de los tejidos sino más aún, estimular la reparación a partir de la activación de respuestas biológicas.



El aporte de la ingeniería tisular para el desarrollo de materiales biomiméticos o bioactivos como el zinc, permite avizorar un futuro en el que la regeneración de tejidos se convierta en una realidad con aplicación concreta en la reparación de lesiones por caries. En tal sentido, se plantea la posibilidad de anular la actividad bacteriana en el cuerpo de la lesión de caries, recuperando elementos estructurales de los tejidos afectados y aportando aquéllos que permitan devolver las propiedades mecánicas perdidas por la degradación del proceso carioso.

La importancia del desarrollo de un material bioactivo que recupere las estructuras afectadas por caries e induzca la regeneración tisular, supone un avance ultraconservador en el manejo clínico de lesiones cariosas, preservando la totalidad de los componentes estructurales dentarios y evitando la utilización de los instrumentos que atemorizan a los pacientes. Además, podría constituirse en un producto de aplicación sencilla y masiva que alcance a las poblaciones más vulnerables con menor costo de infraestructura y logística.

## **ANTECEDENTES**

En los últimos años, la Odontología Restauradora ha buscado ofrecer alternativas clínicas más acordes con los nuevos paradigmas, que hacen hincapié en la conservación de estructuras dentarias sanas, la mínima intervención y la aplicación de materiales bioactivos capaces de interactuar en las estructuras dentarias afectadas por la enfermedad de caries, ya sea aportando minerales y sustancias perdidas o colaborando con la detención del proceso de caries. A continuación se incluye una breve reseña de las más utilizadas.

### **Fluoruro di amino de Plata AgF (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>:**

Es un material bioactivo, que comenzó a estudiarse en la década de 1960, con la finalidad de detener el proceso de caries y disminuir la sensibilidad dentaria. Se llevaron a cabo numerosos ensayos in vitro e in vivo que analizaron su eficacia potencial para tratar la caries. Algunos estudios recientes realizados por el profesor Edward Lo y su equipo de investigación en la Universidad de Hong Kong<sup>6</sup>, concluyeron que el Fluoruro de amino de Plata al 38% detiene las caries dentales al minimizar la pérdida de mineral y la destrucción de colágeno. Además, la alta concentración de iones de plata y fluoruro inhibió el crecimiento de biopelículas cariogénicas.

Aunque los estudios preliminares demostraron el efecto anticaries del fluoruro de plata, también se reportó, que el uso del fluoruro de plata provocaba manchas negras. Las manchas negras provienen de la reducción de los iones de plata a plata metálica y óxido de plata. Una nueva generación de fluoruro de plata amoniacal<sup>7</sup>, permitió la aplicación inmediata de una solución de yoduro de potasio. El oscurecimiento al aplicar de manera tópica la solución de Fluoruro diamino de Plata en superficies dentinarias, puede reducirse mediante una aplicación inmediata de una solución de KI (yoduro de potasio)<sup>7</sup>.

Este material presenta tres componentes activos, que actúan inhibiendo la caries dental: en primer lugar los compuestos de plata que aportan su conocido efecto antibacteriano, capaz de controlar el proceso cariogénico; en segundo lugar los fluoruros conocidos por su efecto bacteriostático, y su capacidad de reforzar la estructura dental previniendo la desmineralización de la misma, y por último, los materiales a base de yoduro son conocidos como materiales antisépticos cuando se aplican en tejidos vivos para reducir la posibilidad de infecciones, sepsis o putrefacción. En la actualidad, está indicado en pacientes pediátricos, en casos en los que no se puede realizar otros tratamientos más invasivos. Se aplica en la cavidad frotando con un micro cepillo, permitiendo que éste infiltre en zonas afectadas.

El yoduro de potasio utilizado en combinación con el Fluoruro diamino de Plata, proporciona un potente efecto antimicrobiano, al tiempo que reduciría el manchado potencial de los dientes tal como sucedía con su sistema predecesor, aunque esta última propiedad aún se encuentra en discusión.

## **El Fosfato de Calcio Amorfo ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ):**

El fosfato de calcio es un compuesto de sales inorgánicas y terciarias, que permite el suministro de iones de calcio y fosfato libremente disponibles, siendo capaz de intervenir en el proceso de desmineralización y remineralización; previniendo caries o remineralizando las caries incipientes, al expulsar calcio e iones de fosfato, y que, en proporciones adecuadas, pueden formar el mineral de las estructuras dentarias<sup>8</sup>.

Aunque no hay evidencias que el Fosfato de Calcio Amorfo (FCA), sea un componente mineral de las estructuras dentarias, éste juega un papel importante en la fase de biomineralización. Estudios sistemáticos del uso del mismo como material dental preventivo o de restauración comenzaron en 1980. Se considera la hidroxiapatita cristalina el producto estable final, en la precipitación de los iones del calcio y del fosfato de soluciones neutras o básicas.

El posible papel que puede jugar el FCA como precursor para la hidroxiapatita en la clasificación biológica, tiene lugar en la corriente principal de la química del fosfato de calcio como biomaterial, sin embargo, la solubilidad variable respecto a la temperatura del medio y su conversión a hidroxiapatita en ambientes acuosos puede limitar su uso cuando se desea una estabilidad estructural, mecánica y química.

Sin embargo, estas mismas características pueden hacer al FCA un agente de mineralización conveniente. Cuando las resinas incorporan compuestos de FCA

pueden realzar el funcionamiento profiláctico de compuestos, sellantes y adhesivos previniendo la desmineralización del diente y activamente promoviendo la remineralización<sup>9</sup>.

Hace ya muchos años que se sabe que la leche y sus derivados protegen los dientes. Recientemente algunos estudios han demostrado que estos efectos protectores, se deben en parte a los fosfopéptidos de caseína, que contienen calcio e iones de fosfato, en forma de Fosfatos de Calcio Amorfo.

El Fosfato de Calcio Amorfo forma una estructura cristalina en el pH neutro, por otro lado, los fosfopéptidos de la caseína (CPP) mantienen el calcio y el fosfato en un estado amorfo, no-cristalino. Este complejo de CPP-FCA es, por lo tanto, un sistema ideal de suministro de iones de calcio y fosfato libremente disponibles. Cuando se añade a la cavidad oral el Fosfato de Calcio Amorfo, se adhiere al esmalte, película, placa y tejido suave, suministrando el calcio y el fosfato exactamente donde es necesario.

Los iones de calcio y fosfato libres salen del CPP, entran al esmalte y reforman los cristales apatita, como un esmalte fluido. También trabaja en sinergia con el fluoruro que se encuentra en la estructura adamantina, generalmente proveniente de la ingesta de aguas fluoradas o uso de pastas dentales con flúor. Añadiendo FCA a la cavidad oral, se complementa el efecto de la saliva, suministrando una concentración de calcio y fosfato sueltos en el medio oral, restaurando así el balance mineral y dando el equilibrio perdido. El FCA tiene un efecto remineralizador en una solución de baja concentración (0.5 - 1% de CPP - FCA) equivale a 500 ppm de fluoruro, reduce la actividad cariogénica en un 55% y

además inhibe la adherencia de la placa al diente<sup>8</sup>.

Algunas situaciones potenciales para usar productos dentales con FCA incorporado, prometen ser una importante contribución para la protección del medio oral en un amplio número de situaciones, en las que pueda haber un desequilibrio mineral, como pacientes con problemas de saliva como xerostomía, y pacientes que encuentran difícil una higiene oral adecuada.

También puede ser usado confiablemente con materiales dentales comúnmente usados como el ionómero de vidrio, cerámicas y resinas fotopolimerizables para prevenir las caries de recidiva y mejorar el pronóstico de estas restauraciones; en aleaciones; en pastas tópicas para profilaxis periodontal, hechas a base de agua, libres de azúcar, constituyendo mezclas especiales de pulidores y agentes del complejo FCA para el sellado tubular; materiales blanqueadores; complementos artificiales de saliva<sup>10</sup>; enjuagues bucales y como suplemento alimenticio en chicles<sup>11</sup>, (agregado al sorbitol o xilitol resulta en un incremento de la remineralización del esmalte del 63% con 10 mg. de FCA que contenga el chicle sin azúcar) .

También se puede utilizar en casos de problemas óseos, además tiene usos para la fijación de prótesis temporales y para la obturación del canal dental. Un ejemplo de este compuesto es el producto comercial MI Paste® del laboratorio GC. Dicho producto es una crema dental a base de agua y Caseína y Fosfato de Calcio amorfo)<sup>12</sup>, producto indicado a pacientes, con lesión inicial de caries (mancha blanca).

## **Resina Fluida Icon® GC:**

Este material es una resina altamente fluida, capaz de penetrar en lesiones iniciales de mancha blanca, y bloquear los pasajes de difusión de los ácidos cariogénicos, promoviendo la detención temprana de la caries en áreas proximales de difícil de acceso y en superficies lisas, sin necesidad de la utilización de instrumental rotatorio, Icon® cubre la brecha entre las terapias preventivas y las restauraciones correctivas.

Este material se basa en el concepto de la infiltración de caries, cuyo desarrollo comenzó en el Departamento de Operatoria Dental y Periodoncia en Berlín, en el año 2000. La filosofía de este tratamiento, concuerda con el uso preventivo en odontología de materiales fluorados, que favorezcan la inhibición de caries dental. De igual manera, al iniciarse el proceso carioso en esmalte, este producto ofrece una alternativa conservadora al tratamiento que incluye la remoción de grandes cantidades de estructura dental.

El objetivo de esta terapia es detener la progresión de la caries dental, infiltrando la lesión desmineralizada inicial, llamada mancha blanca, bloqueando los caminos de difusión de carbohidratos y ácidos cariogénicos. De esta manera se logra infiltrar y reemplazar las estructuras dentarias desmineralizadas hasta una profundidad de 800µm con resina fluida de baja viscosidad. El protocolo del producto indica la aplicación previa de ácido hidrociorhídrico y luego del lavado del

mismo, la aplicación de un solvente previo a la infiltración con la Resina fluida Icon que finalmente se fotopolimeriza.

### **Precursor Líquido inducido por Polímeros (PILP):**

Este es un trabajo de investigación basado en un paradigma diferente, dirigido por el Dr. Gower y colaboradores<sup>13</sup> en Estados Unidos, que busca reestablecer los minerales perdidos en ciertas estructuras dentarias, utilizando precursores líquidos inducidos por Polímeros (PILP), a diferencia de la mayoría de los otros métodos de remineralización que se enfocan en el uso de fosfato de calcio.

Este nuevo concepto se basa en la hipótesis de que la formación de nanoprecursores líquidos encapsulados por polímeros polianiónicos, es un paso fundamental en el proceso de biomineralización y que aplicando este sistema precursor líquido a lesiones artificiales de caries, resultaría en la remineralización funcional de las lesiones y restaura sus propiedades mecánicas<sup>14</sup>.

Este trabajo<sup>13</sup> reciente, sugiere que el colágeno puede dirigir el proceso de cristalización, una vez que es infiltrado el precursor. Para verificar la hipótesis de dicho trabajo, se prepararon lesiones artificiales en muestras de dentina y remineralizadas en periodos de 7, 14 y 28 días. Luego fueron evaluadas con nanoindentación y la extensión de la mineralización fue determinada usando sistema MicroXCT. Los resultados indican que después del tratamiento de remineralización, las lesiones se redujeron significativamente en comparación con



los grupos desmineralizados. El análisis EDS demostró una alta recuperación pero no completa de niveles de calcio y fósforo.

### **Nanopolímeros modificados con zinc:**

Estudios recientes<sup>14</sup>, se han realizado utilizando nano polímeros modificados con calcio y zinc, en zonas de dentina desmineralizada para facilitar la remineralización de la capa híbrida. Se conoce que las fibras colágenas desmineralizadas en la interfaz de unión entre los materiales de restauración y la dentina son susceptibles a la degradación después de un tiempo, debido en gran manera a la presencia de enzimas líticas llamadas Metaloproteasas.

El mecanismo de acción de las nanopartículas de zinc sería inactivar la actividad degradativa de las enzimas sobre las fibras colágenas. Los resultados de dicho trabajo de investigación<sup>15</sup>, indican que la infiltración de nanopartículas poliméricas modificadas con calcio y zinc facilitaría la remineralización en la interfaz dentina y material de restauración, y su importancia clínica se ve reflejada en el aumento de la longevidad de las restauraciones<sup>15,16</sup>.

En base a lo antes expuesto en el presente trabajo se planteó el desarrollo de materiales que cumplan la función como los que se han presentado previamente, y se formuló la siguiente hipótesis.

## 1.2 HIPÓTESIS

La infiltración de dentina cariada artificial con un vehículo que transporte nanopartículas minerales inhibe la actividad bacteriana y endurece el tejido infiltrado, pudiendo actuar como un material de restauración *in situ*.

## **1.3 MARCO TEÓRICO**

### **1.3.1 Odontología Mínimamente Invasiva (OMI)**

Desde sus comienzos, el enfoque de la Odontología frente al tratamiento de la caries dental ha evolucionado en gran manera. La primera etapa tiene como principal referente a G.V. Black y se caracteriza por un enfoque invasivo en cuanto al tratamiento de las estructuras dentarias. En la misma, el tratamiento involucraba la realización de cavidades en las cuales se eliminaba no solo estructuras afectadas por la caries sino también estructuras sanas, respetando el concepto de prevención que se tenía en cuenta en ese momento, el cual recomendaba realizar una extensión preventiva por todas las fosas y fisuras sanas<sup>17</sup>.

Unos años después, con el advenimiento del grabado ácido y sus ventajas estudiados por el Dr. Buonocore, se da un gran paso en el tratamiento de lesiones por caries debido a los avances en adhesión dental, los cuales por primera vez permiten adherir micro mecánicamente el material de restauración al esmalte dental y posteriormente extender estos principios adhesivos a la dentina<sup>18</sup>.

Durante la década de 1980, se comienzan a tener en cuenta los efectos preventivos frente a la enfermedad de caries de sustancias como el Flúor y su mecanismo de acción sobre la estructura adamantina, por lo que comienza a utilizarse masivamente. Es durante esta década que, en conjunto con los avances en adhesión, algunos autores<sup>19</sup> demuestran anticuadas y poco recomendables las técnicas de preparación de cavidades diseñadas años atrás por autores como Black

e Irving, comenzando a limitar la conformación de la cavidad solamente a tejido afectado por caries.

Comienza a difundirse en ese momento el concepto de Operatoria Dental con mínima invasión, mínimamente invasiva o de invasión mínima<sup>20</sup>. A partir de este nuevo concepto, el cual da origen a cavidades mínimamente invasivas, nace también una nueva filosofía que intenta encontrar opciones para reparar los tejidos en vez de sustituirlos. En los años subsiguientes, la Federación Odontológica Internacional (FDI) y la Asociación Internacional para la Investigación Dental (IADR), recomiendan en una declaración<sup>21</sup>, reducir en lo posible la utilización de materiales restauradores en favor de un mayor énfasis en medidas de prevención en el abordaje precoz de la caries dental.

#### Mínima invasión:

Este concepto según Novy y Fuller <sup>22,23</sup>, comprende "las técnicas que respetan la salud, la función y la estética de los tejidos orales, previniendo las enfermedades e interceptando su progreso con pérdida mínima de tejidos". De este modo, podemos hablar de una filosofía de trabajo más que una técnica. Una filosofía que busca prevenir la enfermedad y, en el caso de tratarla cuando ya está instalada, hacerlo de una manera que el tratamiento afecte lo menos posible el tejido sano remanente, utilizando técnicas poco invasivas, seleccionando materiales dentales cuyas técnicas de adhesión no requieran afectar tejido sano para lograr su permanencia en la pieza dentaria<sup>22,23</sup>.

Desde el punto de vista preventivo, se busca un criterio objetivo al decidir reemplazar una restauración que se considere defectuosa, y no hacerlo de manera sistemática, muchas veces por aparentes defectos o pigmentaciones, debiendo los profesionales corroborar que se trate de caries secundarias, con una brecha marginal significativa que justifique su reemplazo<sup>21</sup>.

La odontología mínimamente invasiva, recomienda evitar la intervención innecesaria, respetar los tejidos sanos, dar una mayor importancia a la realización de un diagnóstico temprano riesgo de caries especialmente en niños y realizar los tratamientos preventivos de acuerdo a la necesidad del paciente. Además incluye tomar las medidas necesarias para interceptar las lesiones cariosas en su etapa temprana, antes de que avancen a cavidades, utilizando diferentes agentes antimicrobianos y remineralizantes<sup>22, 23</sup>.

A nivel mundial se considera que para lograr un mejor efecto en la población, se deben incluir además otros recursos que colaboren de manera preventiva con la salud bucal de la población, estos incluyen: educación para la salud, campañas preventivas de agentes microbianos a nivel público, usos de agentes fluorados, uso de agentes remineralizantes diferentes al flúor, realización de selladores en pacientes niños con mediano y alto riesgo, entre otros<sup>24, 30,30a, 32</sup>.

### 1.3.2 Nanotecnología en Odontología

Se puede definir la Nanotecnología o Nanociencia como el estudio e investigación de una ciencia aplicada a nivel atómico o molecular, es decir a una escala menor a 100nm. El prefijo nano proviene del griego “pequeño o enano” y se aplica al manejo de la materia a escala sub-atómica, siendo un nanómetro el equivalente a la millonésima parte de un milímetro.

En 1959 el Profesor -y luego Premio Nobel de Física- Richard Feynman hizo referencia pública por primera vez a las posibilidades de las nanociencias y la nanotecnología en su célebre discurso titulado “En el fondo hay espacio de sobra” (traducido del Inglés “There is plenty of space in the bottom”). Este acontecimiento se toma actualmente como la piedra angular de los avances científicos y tecnológicos que prometen transformar en realidad la idea de “pequeñas soluciones para grandes problemas”<sup>40</sup>.

En el marco de la Odontología, estas innovaciones se traducen en un universo de potenciales recursos destinados al diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades que se multiplican exponencialmente con los cambios demográficos de la población mundial<sup>40-43</sup>.

En cuanto a los métodos de obtención o síntesis de nanopartículas para su uso en Odontología, las tecnologías involucradas se pueden clasificar como *bottom-up* o *top-down*<sup>36</sup>. El enfoque *top-down* se basa en el uso de un material a granel que luego es sometido a una disminución del tamaño de partículas por debajo de la

micra. Para alcanzar este objetivo se aplica energía y destacan por su uso las técnicas de homogenización de alta presión (HAP), la micro fluidización y la nanomolienda asistida en medio líquido a diferencia de éste, el enfoque *bottom-up* consiste en el “ensamblaje” de moléculas y átomos, para formar estructuras más grandes<sup>36</sup>.

A partir de dichos métodos y la naturaleza de los materiales es posible obtener diferentes tipos de sistemas (nanopartículas, nanocápsulas, liposomas, nanocristales, etc.). A continuación se describen algunos ejemplos de sistemas nanométricos, utilizados en odontología<sup>40-43</sup>.

## **Nanopartículas**

Las nanopartículas son partículas microscópicas con una dimensión menor a 100nm. Se clasifican de acuerdo a su naturaleza química en: Orgánicos, Inorgánicos e Híbridos. En el primer grupo se encuentran coloides orgánicos, nanotubos de carbono, nano partículas poliméricas, nanopartículas (Lípidos, proteínas), nanofibras poliméricas y nanocristales de celulosa entre otros. En el grupo de los Inorgánicos se encuentran nanocristales, nanopartículas de oro, plata, platino, cobre, aluminio, nanopartículas de óxidos metálicos, nanovarillas, nano nitruros y carburos. Este trabajo se enfocó en las Nanopartículas metálicas (Inorgánicas).

Dichos sistemas nanoparticulados metálicos, se han propuesto como

sistemas de administración de fármacos para el control y la restauración de la caries, la remineralización dental, el manejo de la hipersensibilidad dentinaria, la vacuna contra la caries dental, el tratamiento del biofilm oral, la desinfección del conducto radicular, la anestesia local y la infección periodontal.

Por ejemplo, las nanopartículas metálicas mejoran los tratamientos para las enfermedades de las estructuras dentales y orales usando fármacos clásicos. Se postula que las nanopartículas se puedan administrar selectivamente a sitios o células diana. Una de las aplicaciones más importantes es el tratamiento de la enfermedad periodontal<sup>48-50</sup>.

Comparadas con las micropartículas, las nanopartículas ofrecen ventajas, como la capacidad de penetrar áreas extracelulares e intracelulares que pueden ser inaccesibles a otros sistemas de administración debido a su pequeño tamaño, incluidas las zonas de bolsas periodontales debajo de la línea de las encías.<sup>23-35</sup>

Los estudios de microscopía confocal láser llevados a cabo por Ganem-Quintanar y col.<sup>51</sup>, establecieron que las nanopartículas biodegradables, cuando se aplican suavemente al espacio gingival porcino, pueden penetrar en las uniones estrechas del epitelio. Del mismo modo, las nanopartículas en el surco gingival podrían ser un sistema de administración de fármacos que reduzca la frecuencia de la posología, además de proporcionar una acumulación eficaz del agente activo en los sitios diana durante un período prolongado, manteniendo una tasa de liberación de fármaco efectiva en el tiempo.<sup>47</sup>



## **Nanopartículas Metálicas**

Las nanopartículas metálicas son entidades de escala submicrométrica, obtenidas a partir de metales puros (por ejemplo, oro, platino, plata, titanio, zinc, cerio, hierro y talio) o sus compuestos (p. Ej., Óxidos, hidróxidos, sulfuros, fosfatos, fluoruros y cloruros). Uno de los nanosistemas más documentados en odontología son las nanopartículas de plata. Debido a su pequeño tamaño, las nanopartículas de plata poseen una gran área de superficie disponible para la oxidación<sup>52</sup>.

La plata se ha utilizado en la purificación de agua, para curar heridas, prótesis óseas, cirugía ortopédica reconstructiva, dispositivos cardíacos, catéteres y dispositivos quirúrgicos. Los recientes avances en biotecnología han permitido la incorporación de plata ionizable en los tejidos, con el propósito de un uso clínico para reducir el riesgo de infecciones nosocomiales y también para la higiene personal<sup>53</sup>.

El efecto antimicrobiano, antifúngico y antiviral de los compuestos de plata depende de la cantidad de iones bioactivos y su disponibilidad para interactuar con las membranas celulares bacterianas o fúngicas<sup>30</sup>. El ion plata es biológicamente activo y puede interactuar fácilmente con proteínas, especialmente aquellas con grupos tiol, residuos de aminoácidos, aniones libres y receptores en membranas celulares de mamíferos y eucariotas.

Las nanopartículas de plata, ya sea como dispersión o incorporadas en diferentes materiales, han mostrado diferentes propiedades y aplicaciones en la

práctica dental como antimicrobianos, inhibidores de caries, materiales restauradores dentales, cemento de endodoncia, implantes dentales y dispositivos intraorales para prevenir la acumulación microbiana<sup>52-54</sup>.

La nanotecnología está preparada para revolucionar la práctica dental clínica, En un futuro no muy distante, los tratamientos realizados a pacientes, serían menos estresantes para el odontólogo, y mucho más aceptable para los pacientes, como resultado una atención odontológica considerablemente más favorable. La optimización y utilización de las ventajas que ofrece la nanotecnología en el área Odontológica, facilitará a que se produzcan muchas mejoras en la salud oral. De cualquier modo, como otras tecnologías el uso de nanopartículas conlleva también la búsqueda de protocolos que permitan ser utilizados adecuadamente<sup>56</sup>.

## **Nanocristales**

Los nanocristales son partículas cristalinas submicrométricas, de tamaño comprendido entre 1 y 1000 nm (y, más frecuentemente, entre 100 y 400 nm), habitualmente en forma de nanosuspensión. En la actualidad, son tres los métodos a los que es posible acudir para la producción de nanocristales. Uno de ellos, la precipitación controlada, es un método de agregación (*bottom-up* en terminología anglosajona) que parte de una dispersión molecular del sólido y se basa en el equilibrio entre fases. Los otros dos, pulverización húmeda en molinos de perlas y homogeneización a alta presión.

Se han propuesto nanocristales de nitrato de potasio, sales de calcio pobremente soluble, fluoruro de calcio e hidroxiapatita sustituida con carbonato como sustancias activas para el tratamiento de la sensibilidad de la dentina, la remineralización de las superficies dentales y la inhibición de la caries. Estos nanocristales se pueden formular como compuestos para la higiene oral o dental, como soluciones, suspensiones, aceites, resinas u otros productos sólidos. El efecto mejorado de los nanocristales en comparación con sus polvos a granel puede explicarse por su pequeño tamaño, que les permite infiltrar y penetrar en los túbulos dentinarios o las superficies porosas de los dientes formando un depósito terapéutico<sup>38, 44-46</sup>.

### **Aplicación de Nanotecnología en Odontología:**

#### **Prevención y diagnóstico de patologías orales**

La incorporación de nanopartículas en pastas dentífricas se plantea a través de dos mecanismos: Por un lado, el modo más simple de aplicación se propone utilizando partículas nanométricas de elementos químicos con efectos antibacterianos, tales como el zinc o la clorhexidina, en cantidades suficientes para controlar el metabolismo del biofilm cariogénico y periodontopático. Por otra parte, en una propuesta de mayor complejidad se hace referencia al ensamblado de

partículas de carbono entre 1 y 100 nm para formar nano-robots de un diámetro promedio de 0.5 a 3 nm, vehiculizados en pastas dentales (dentifrobots) y programados para interferir con exactitud a nivel celular o molecular en procesos metabólicos de la flora bacteriana<sup>41-43</sup>.

Esta última hipótesis de desarrollo se asimila a la idea de una vacuna para prevención de caries, cuya dificultad se atribuye principalmente a la amplia variabilidad e inestabilidad del medio en el cual la vacuna debería efectivizar su mecanismo de acción. Estas variables podrían programarse en función de las condiciones individuales y aplicarse al diseño de los nano-robots.

En cuanto al uso de nanotecnología para el diagnóstico de patologías orales, el principio básico que se aplica a estas innovaciones implica la utilización de nano-elementos factibles de ser rastreados en órganos o sistemas. En tal sentido, dichos elementos deberán tener afinidad por las células o tejidos que se pretendan identificar, de modo tal que puedan evidenciarlos en imágenes<sup>55</sup>.

### **Usos de la Nanotecnología en la Farmacología Odontológica**

Es muy variada la gama de posibilidades en la utilización de productos farmacológicos, ya que abarca desde el tratamiento de la hipersensibilidad hasta el transporte de sustancias terapéuticas para distintos tipos de cáncer bucal, pasando por el desarrollo de anestésicos locales, que actuarían por difusión a través de los tejidos sin necesidad de agujas infiltrantes, estos últimos en etapa de estudio.

En el caso de los anestésicos, se están desarrollando nano-robots incorporados a sistemas coloidales que se aplicarían a nivel gingival, difundiendo rápidamente hacia los tejidos dentales, penetrando la dentina por sus túbulos hasta alcanzar la pulpa guiados por diferencias químicas y de gradientes de temperatura. Estos nano-componentes estarían programados para que el Odontólogo active su funcionamiento a través de un dispositivo, ordenando la inhibición de la conducción de sensibilidad dolorosa desde el diente durante la realización de los procedimientos, pudiendo luego revertir la situación una vez concluida la sesión<sup>41, 43</sup>.

Este mecanismo también podría aplicarse para el tratamiento de la hipersensibilidad, siendo ésta una alternativa al tradicional bloqueo superficial de los túbulos dentinarios expuestos en las zonas cervicales mediante la quelación de minerales en las áreas de mayor permeabilidad. El potencial de la Nanotecnología en el diseño de medicamentos tiene centradas sus expectativas en la posibilidad de aumentar la especificidad de las drogas, reducir las dosis por una mejor solubilidad y mayor biodisponibilidad, eliminando en gran medida los efectos adversos o secundarios de los tratamientos.

En esta línea existen numerosos desarrollos en etapas preliminares, siendo la terapia génica la que se avizora con excelentes perspectivas, posibilitando la reparación o el reemplazo de genes defectuosos. Los sistemas de distribución de genes se puede dividir en tres tipos: vectores virales, vectores no-virales y para inoculación directa de genes en determinados tejidos<sup>55</sup>. De esta manera, los buenos resultados de proyectos basados en los principios mencionados podrían traducirse

en avances significativos para el tratamiento químico de ciertos tipos de cáncer bucal, destruyendo las células malignas y separándolas de las sanas<sup>57</sup>.

Finalmente, en esta sección se incluye el desarrollo de nanoemulsiones para desinfección y esterilización basadas en nanopartículas de aceites que atacan y destruyen patógenos de amplio espectro, sin teñir ni manchar telas, siendo hipoalergénicas y amigables para el ambiente. Se comercializa actualmente un producto cuyo uso se reporta para la esterilización de impresiones de pacientes protéticos.

### **Odontología Restauradora y Cosmética**

Por mucho tiempo, la amalgama de plata fue el material de elección para restaurar la integridad anátomo-funcional de dientes afectados por el proceso de caries. A comienzos del año 2013, la Asociación Internacional de Investigación Odontológica (IADR) en conjunto con la Federación Dental Internacional (FDI) lanzaron un comunicado de prensa en el que exhortan a la comunidad científica y a los clínicos en general a elaborar una agenda para el desarrollo de nuevas alternativas al uso de la amalgama, en función del compromiso de erradicar definitivamente este material de la práctica odontológica. Esto debido a que este material de restauración incluye Mercurio en su composición, un componente tóxico para el ser humano en ciertas concentraciones.

En este comunicado se enumeran los requisitos que debiera reunir un material de restauración ideal: guardar una buena relación costo-eficacia, no ser

tóxico, sellar la interfaz, tener la máxima estabilidad dimensional al endurecer, contribuir a la cicatrización de la cavidad generada por la lesión de caries (efecto remineralizante), ser fácil de manipular, presentar suficiente resistencia al desgaste y poder repararse<sup>56</sup>.

De los materiales disponibles en la actualidad para restauración dental encontramos los cementos, materiales del grupo de los cerámicos, cuya composición combina minerales que son activados por soluciones que favorecen la formación de sales insolubles. Estos compuestos inician su endurecimiento al mezclar la fase mineral con el activador, pudiendo éste completarse en la cavidad del diente a restaurar. Por su naturaleza inorgánica, estos materiales se integran biológicamente al elemento dentario, aunque sus propiedades físico-mecánicas presentan algunas limitaciones<sup>58</sup>.

Por esta razón se han propuesto diferentes modificaciones que puedan optimizar la resistencia de los cementos al desgaste, a la fatiga, a la compresión y a la flexión, entre las cuales se incluye la incorporación de nanopartículas de plata, oro, hidroxiapatita o zinc<sup>59-61</sup>.

Por otra parte, existe otra línea de materiales restauradores que combinan los beneficios de las partículas cerámicas pero son aglutinadas por una matriz polimérica que les otorgan plasticidad para ser modelados en la misma pieza a restaurar y luego completar su endurecimiento por óxido reducción de los monómeros<sup>62</sup>. Estos sistemas se denominan resinas compuestas.

A diferencia de los cementos polialquenoicos que se unen químicamente al mineral del diente, las resinas compuestas necesitan de un sistema de adhesión

para lograr una retención micro-mecánica al remanente dentario, sea a nivel del esmalte o la dentina. En tal sentido, la humectación/infiltración de las estructuras dentarias ocurre gracias a la utilización de adhesivos basados en formulaciones afines a las de la matriz orgánica de los composites.

Algunas fallas adhesivas a nivel de la dentina se han atribuido a la presencia de enzimas proteolíticas, para lo cual se ha propuesto la incorporación de nanopartículas de zinc con la finalidad de neutralizar la acción de éstas. El zinc competiría con las metaloproteinasas en el sitio de unión con la molécula de colágeno que las enzimas tienden a degradar<sup>63</sup>.

De igual modo que se plantea en los cementos dentales, en las resinas compuestas también se utilizan nanopartículas para mejorar sus propiedades mecánicas y ópticas<sup>64</sup>. De hecho, el surgimiento de los nanorrellenos corresponde en primer término a estos materiales compuestos y luego se aplicó ese principio a los cementos de ionómero vítreo a fines de la década pasada. Las demandas de los pacientes en cuanto a la coloración del diente en las restauraciones, las preocupaciones sobre el impacto ambiental y las reacciones clínicas adversas a los materiales de relleno de amalgama, han acelerado la investigación en el desarrollo de materiales de restauración alternativos.

Uno de los avances más importantes en la tecnología de resinas compuestas fue el desarrollo de materiales basados en resinas fotocurables. Esto fue seguido por el desarrollo de un tamaño de partícula de relleno reducido y una mayor carga de estos rellenos que mejoró significativamente la aplicabilidad de este tipo de materiales.



Los “composites” de resina son ampliamente utilizados en odontología y se han convertido en uno de los materiales restauradores estéticos más comunes debido a su resistencia mecánica, excelentes propiedades estéticas, costo moderado (en comparación con la cerámica), capacidad para unir el diente, formulación mejorada, procedimientos clínicos simplificados y la disminución en el uso de amalgamas debido a la toxicidad del mercurio.

Los avances más importantes en la tecnología de resina compuesta estuvieron precipitados por la creciente demanda en odontología estética que ha llevado al desarrollo de compuestos de resina para restauraciones directas con propiedades físicas y mecánicas mejoradas, mejor desempeño estético y longevidad clínica.

La última innovación en este campo ha sido la introducción de materiales de “nanorellenos”, mediante la combinación de partículas a escala nanométrica y nanoclusters en una matriz de resina convencional. Como estos “*nanofillers*” no dispersan ni absorben la luz visible, proporcionan un método para dotar de opacidad al material sin interferir con su estética. También pueden permitir una alta carga, con la consecuente reducción en la contracción durante polimerización<sup>64</sup>.

Durante la última década, se ha dedicado esfuerzo al diseño de resinas “nanocompuestas” con la el foco puesto en alcanzar mayor estética, resistencia y durabilidad. Sin embargo, la investigación hasta la fecha muestra que la mayoría de los “nanorrellenos” proporcionan sólo mejoras incrementales en las propiedades mecánicas con algunas excepciones.

La nanotecnología en este punto podría ser útil además en la mejora de la

adhesión de los biomateriales a los tejidos, la resistencia mecánica y la adaptación marginal, y por lo tanto, la fiabilidad y longevidad de la restauración. Es importante destacar que los tamaños de partícula de los materiales de restauración oscilan entre 40 nm y 0.7  $\mu\text{m}$ , mientras que los tamaños estructurales del cristal de hidroxiapatita, túbulo dental y varilla de esmalte se encuentran en un rango nanoscópico (1 a 10 nm).

Por este motivo la nanotecnología puede jugar un papel importante en la mejora de la continuidad entre la estructura dental y los biomateriales restauradores, desarrollando sistemas que formen una interfaz más estable y natural con los tejidos duros mineralizados del diente. La mejora continua en la tecnología de resinas compuestas ha dado lugar a materiales modernos con excelente durabilidad, resistencia al desgaste y estética que imitan a los dientes naturales. En particular, la incorporación de la nanotecnología en el control de la arquitectura del relleno ha logrado mejoras dramáticas en estos materiales.

Los materiales de relleno originales de resinas compuestas contenían partículas de relleno grandes de entre 10-50  $\mu\text{m}$  de tamaño. Estos rellenos impartieron gran resistencia al material curado, pero debido al tamaño de los rellenos, el volumen ocupado por la resina era sustancial, lo que significa que estos materiales tendían a desgastarse rápidamente cuando se los cargaba con fuerzas oclusales y no podían pulirse con un alto brillo. Estos rellenos, que ya no se utilizan en la actualidad, eran denominados en inglés *macrofills*.

Debido a lo antes expuesto, los fabricantes buscaron nuevos tipos de rellenos para lograr restauraciones con superficies altamente pulidas que imitasen mejor una

superficie de esmalte. A fines de la década de 1970, se introdujeron las denominadas resinas compuestas *microfill*. Estos compuestos utilizaron nuevos rellenos con partículas muy pequeñas de dióxido de silicio, de aproximadamente 0,04  $\mu\text{m}$  de diámetro. Podría decirse que estos productos fueron los primeros con "nanorellenos", aunque esa terminología todavía no se había introducido en la comunidad científica<sup>62</sup>.

En odontología, los "nanorellenos" podrían definirse como partículas inorgánicas con un tamaño promedio de 40 nm. Sin embargo, la verdadera innovación no es el tamaño propiamente dicho sino la fabricación de los rellenos y la posibilidad de mejorar la carga de la fase inorgánica. El efecto de esta alta carga de relleno mejora ampliamente las propiedades mecánicas. Los compuestos "microhíbridos" con carga adicional de "nanorellenos" son actualmente la mejor opción.

Probablemente, la próxima frontera de investigación en este tipo de materiales es la fabricación de un material de relleno con forma y composición que pueda imitar con mejor performance las características ópticas y mecánicas de las estructuras minerales del diente (esmalte y dentina). Un ejemplo de estos rellenos es la sílice el cual es un material adecuado para aplicaciones biomédicas y en particular en odontología.

Químicamente, la sílice es un óxido de silicio (dióxido de silicio,  $\text{SiO}_2$ ) que se encuentra en numerosos tejidos, incluidos huesos, tendones, aorta, hígado y riñón. La FDA clasifica a la sílice como un agente "generalmente considerado como seguro" (GRAS), por lo que es un candidato ideal para aplicaciones biomédicas. Al

ser el segundo elemento más frecuente después del oxígeno, la sílice es abundante y barata.

Durante mucho tiempo, la sílice se ha utilizado para aplicaciones dentales como un componente de relleno debido a sus propiedades físicas y ópticas.

En la última década, las nanopartículas de sílice, por ejemplo, Aerosil (Degussa), HDK (Wacker), Cab-O-Sil (Cabot Corp.) se han propuesto como rellenos a nanoescala para mejorar las resinas dentales. Estas partículas pueden mejorar el comportamiento reológico, la resistencia al rayado/abrasión y la dureza superficial de los productos finales.

Se considera también la inclusión de nanopartículas de zafiro y diamante en matrices resinosas para el tratamiento superficial cosmético del esmalte. Sin embargo, no existen aún productos que se comercialicen con estas características.

### **Ingeniería tisular en odontología**

La investigación de aplicaciones potenciales y la regeneración total de una pieza dentaria a partir de las conocidas células madre, es el desarrollo que ocupa predominantemente a la ingeniería tisular. En relación a la denominada renaturalización dentaria, el transporte de factores de crecimiento, minerales y elementos antibacterianos a zonas del diente para intentar recuperarlo hasta la restitución de su integridad anatómica y funcional, sería una alternativa "más biológica" para las restauraciones dentarias como consecuencia de lesiones

traumáticas o por caries<sup>65</sup>.

Es posible vincular estos desarrollos con algunos avances en el campo de la endodoncia, en los procesos de revascularización pulpar, a partir de la cual se logra regenerar el tejido en dientes con procesos necróticos<sup>66</sup>. Por otra parte, la ingeniería tisular se vincula con la nanotecnología para la síntesis de minerales que promuevan la regeneración de defectos óseos o la inducción de la neoformación ósea en zonas donde luego se procederá a la instalación de implantes dentales<sup>42-43</sup>.

Cabe mencionar que también se investiga la optimización de la oseointegración, mediante el tratamiento superficial de los implantes con coberturas nanoparticuladas que faciliten depósitos de células óseas y prevengan las peri-implantitis<sup>67</sup>.

### **Materiales de impresión con Nano relleno**

Los materiales de impresión, son aquellos que se utilizan en la práctica odontológica para obtener una copia o impronta negativa de los dientes y tejidos bucales para su posterior vaciado y obtención de un modelo. En la actualidad se ha integrado nanorelleno a ciertos materiales de impresión como el polivinilsiloxano, mejorando la fluidez del material al momento de tomar una impresión de los tejidos bucales, mejorando propiedades hidrofílicas y detalles de precisión.

## **Principales Nanopartículas Utilizadas En Odontología**

### **Nanopartículas de Carbono**

Los nanotubos de carbono tienen propiedades eléctricas y mecánicas únicas. La resistencia y flexibilidad de dichos nanotubos a su unión química covalente y orientación hexagonal. Además posee la propiedad de semi conductividad térmica, estabilidad al calor, baja densidad. Es utilizada principalmente en las fórmulas de materiales de restauración.

### **Nanopartículas de Grafeno**

Es un material casi transparente. Es un alótropo del Carbono, un teselado hexagonal plano formado por átomos de carbono y enlaces covalentes que se generan a partir de la superposición de los híbridos  $sp^2$  de los carbonos enlazados.

El uso de estas nanopartículas es muy efectiva para disminuir la presencia de bacterias como *Streptococcus Mutans* y la consecuente formación de biofilm en ciertas superficies en la cavidad bucal.

## **Nanopartículas de Hidroxiapatita**

Nanopartículas de hidroxiapatita han sido ampliamente usadas en medicina y odontología debido principalmente a su composición similar al hueso y al diente.

La aplicación que tendrían estas nanopartículas, es su fácil integración a ciertas estructuras como los túbulos dentinarios, pudiendo colaborar a disminuir la hipersensibilidad dentaria al sellar esos túbulos, o colaborar con la reparación de zonas erosionadas de la estructura adamantina.

## **Nanopartículas de Zirconio y Sílice**

El uso de partículas de Zirconio se ha popularizado en los últimos años. Debido a propiedades como insolubilidad en agua, reduce disminución de adhesión bacteriana en su superficie, baja citotoxicidad. Y una propiedad a favor que es el color muy similar al diente. Usado en implantes dentales, por su capacidad de osteoinducción.

Por otro lado las Nanopartículas de Sílice tienen un lugar importante en la nanodontología<sup>42,43</sup>, de los últimos años. Debido a sus propiedades como biocompatibilidad, baja toxicidad, baja densidad y capacidad de adsorción. Son utilizadas como liberación controlada de drogas, biosensores y soporte enzimático. En el campo Odontológico con usadas en materiales de restauración, mejorando sus propiedades mecánicas, la estética post pulido y aprovechando su

alta biocompatibilidad. Se han modificado estas nanopartículas para el tratamiento de hipersensibilidad dentaria.

### **Nanopartículas de Plata**

Los compuestos de plata son conocidos por mostrar actividad antimicrobiana<sup>41</sup>. Nanopartículas de Plata son utilizadas ampliamente en purificación de agua, pastas dentales, entre otros. En odontología se ha estudiado su uso en áreas de Endodoncia, materiales de restauración, prótesis, implantes dentales. La incorporación de estas nanopartículas, disminuye significativamente la colonización bacteriana en superficies dentales mejorando la salud oral.

Debido al menor tamaño de estas nanopartículas tienen la capacidad de penetrar fácilmente en la membrana celular bacteriana resultando en una rápida actividad bactericida, afectando el ADN bacteriano y su capacidad de síntesis y respiración celular, resultando en su muerte.



## 1.4 OBJETIVO GENERAL

El Objetivo General de este trabajo de investigación aplicada *ex vivo* fue desarrollar un material o sistema de base nanotecnológica que convierta el tejido afectado por la progresión de la caries en el diente en una estructura de reparación *in situ*, mediante la utilización de un vehículo fluido que transporte nanopartículas tendientes a devolver propiedades biológicas y mecánicas del tejido comprometido por el proceso de caries.

## **1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la estabilidad de las nanopartículas de zinc, en los diferentes vehículos propuestos, para la posterior infiltración de las muestras afectadas con caries.

2. Determinar la Concentración Inhibitoria mínima de las nanopartículas de zinc, frente a microorganismos específicos que intervienen en el progreso de la enfermedad de caries dental.

3. Evaluar la profundidad de infiltración de los vehículos seleccionados en conjunto con las nanopartículas en los tejidos dentarios.

4. Evaluar los cambios en las propiedades de dureza superficial de las muestras tratadas previamente con los vehículos y nanopartículas.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

En base a la Hipótesis, al Marco Teórico de referencia y a los objetivos planteados, se propuso el siguiente esquema experimental para este trabajo de maestría:

### **2.1 Evaluación de la estabilidad de nanopartículas de zinc**

En esta evaluación se utilizaron Nanopartículas esféricas de Óxido de Zinc (CAS N° 1314-13-2) en forma de polvo blanco adquiridas en Sigma Aldrich, utilizadas sin modificar y de un tamaño menor a los 50 nm. Además, se utilizaron medios de cultivo como Caldo Tioglicolato (DMEM) y Caldo Cerebro Corazón ambos obtenidos de Laboratorio Britania. En cuanto a la composición de los mismos el primero está compuesto principalmente por tioglicolato de sodio, cloruro y sulfito de sodio, tripteína, glucosa, peptona entre otros aditivos. Por otro lado el caldo cerebro corazón se compone de una infusión de cerebro de ternera, digerido enzimático de tejido animal y la infusión corazón de buey.

En cuanto al Caldo Tioglicolato, fue esterilizado y previamente a su uso, fue ligeramente calentado en un baño de agua templada hasta que su color indicó la ausencia de oxígeno disuelto en el líquido.

Se utilizó Resina Icon® fluida obtenida del laboratorio DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik, Hamburgo (composición basada en matriz de resina de

metacrilato, no divulgado completamente por el fabricante). Las placas de Petri con Agar suplementado con sangre también fueron obtenidas del laboratorio Britania.

La evaluación de la estabilidad de las nanopartículas se realizó por técnica de espectrofotometría.

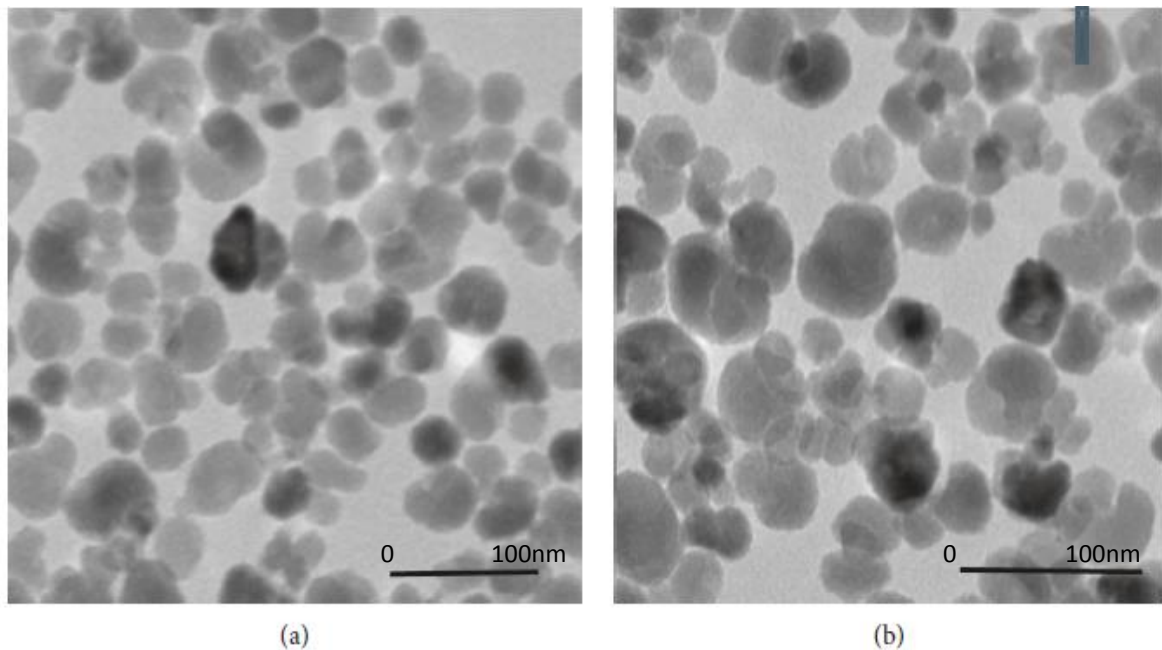


Figura 1: Imágenes TEM de nanopartículas de óxido de zinc utilizadas.

Durante este estudio, se evaluó como grupo control la estabilidad de las Nanopartículas de Óxido de Zinc en Peróxido de Hidrógeno al 3% y al 15%. Se utilizó este vehículo como control debido a su capacidad de infiltrar en la estructura adamantina, probado ampliamente en los tratamientos de aclaramiento dental. En la primera dilución al 3% presentó estabilidad del 20 al 40% las primeras dos horas, y menores al 20% a partir de la segunda hora y hasta las 72 horas. En la segunda dilución al 15% presentó estabilidad del 10 al 20%.

## **2.2. Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de Nanopartículas de Zinc**

Se utilizaron cepas bacterianas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, y *Lactobacillus spp.*, los cuales fueron adquiridas de la colección de cepas del Servicio Especial de Bacteriología (CCBE), del Instituto Malbrán (Buenos Aires, Argentina). Estas cepas fueron continuamente manejadas y mantenidas en condiciones microaerófilas, utilizando una campana de anaerobiosis y se cultivaron en caldo tioglicolato con un indicador colorimétrico o Agar sangre suplementado, según las necesidades de los experimentos.

Se analizó un amplio rango de concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc (entre 0,2 y 2,2 mg/ml) en caldo de tioglicolato) a través del método de micro dilución (en una placa de 96 pocillos) comparándolo contra un inóculo inicial bacteriano ( $10^6$  UFC / mL) recientemente preparado (también en caldo de tioglicolato). Todas las muestras y los controles se realizaron por triplicado. El experimento fue reproducido completamente dos veces.

Las suspensiones bacterianas con diferentes concentraciones de nanopartículas se incubaron durante 18 h a 37 ° C dentro de una jarra de

anaerobiosis. Luego de este período de incubación, se sembraron 10 µL de cada una de las muestras en placas de Petri conteniendo agar sangre y se incubaron en las mismas condiciones durante 18 h. Finalmente, se procedió al conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC). La tinción de Gram se realizó tanto al comienzo como al final del experimento de manera de asegurar la identidad y pureza del cultivo.

### **2.3. Evaluación de la profundidad de infiltración**

Se utilizaron 8 (ocho) terceros molares sanos, completamente desarrollados extraídos por indicación profesional, de individuos mayores de 21 años de edad y que dieron su consentimiento para utilizar los elementos extraídos para esta investigación. Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba.

Se tuvo en cuenta como criterio de inclusión que los elementos dentarios estuviesen libres de manchas blancas, hipoplasias u otro defecto estructural. Todos fueron obtenidos del banco de dientes (Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina - Comité Institucional de Ética Doc. No.3/2016). Una vez extraídos, los especímenes, fueron correctamente lavados con agua destilada y almacenados en recipiente estéril sumergidos en agua destilada a 4°C hasta su procesamiento.

A partir de estos elementos, se realizaron cortes transversales en el tercio medio coronal, perpendiculares a la dirección de los Túbulos dentinarios, obteniendo bloques de dentina de 4 mm de espesor, utilizando una máquina de corte metalográfica Buehler ISOMET Low-Speed Saw (origen: Alemania). Las Superficies de las muestras fueron pulidas con discos abrasivos y posteriormente cubiertas con barniz de uñas, excepto por una ventana de 4,5mm x 4,5mm en su cara oclusal.

Posteriormente, se indujo la formación de Lesiones Artificiales de Caries exponiendo la ventana descubierta de las muestras a una Solución desmineralizante<sup>62</sup>, con el propósito de generar en la dentina una lesión de caries clínicamente visible y sin pérdida de sustancia. Las muestras preparadas como se mencionó anteriormente, fueron sumergidas en solución desmineralizante pH 4,5 a 37°C. (Relación volumen/superficie de 5 ml/mm<sup>2</sup> de esmalte), durante 72 horas con un cambio de solución cada 48 horas. Composición química de la solución desmineralizante: ácido láctico (0,1M), cloruro de calcio (3 mM), fosfato diácido de potasio (1,8 mM) y carboximetilcelulosa 1%, pH: 4,5. (1).

Luego de haber generado las lesiones artificiales de Caries en las muestras (figura 2 c), estas fueron divididas en 2 grupos. Grupo 1: Nanopartículas de óxido de zinc + Resina fluida Icon 0,5mg/100µl, Grupo 2: (control): Solución de Fluoruro diamino de Plata al 38 % de marca Fagamin del laboratorio Tedequim.

En cuanto al método de infiltración de cada grupo, en el caso de los Grupo 1 se siguió el protocolo del fabricante de la Resina fluida Icon, que consiste en una preparación previa de la superficie a tratar, mediante la aplicación de ácido

clorhídrico al 15% en gel tixotrópico durante 40 segundos, a continuación se lavó con agua destilada durante 10 segundos, y se secó la superficie con aire limpio.

Luego se aplicó un solvente a base de etanol para luego ser infiltrada la superficie de las muestras con la combinación de resina fluida y Nanopartículas de Óxido de Zinc. Se fotopolimerizaron las muestras durante 60 segundos y fueron almacenadas. En el caso del grupo Control 2, no se requirió un pre tratamiento de la superficie de las muestras.

En el grupo control No. 2: la solución de Fluoruro diamino de Plata al 38 % se aplicó frotando el líquido con un micro aplicador (Microbrush, 3M Espe, St. Paul, Estados Unidos) durante 10 segundos. Las muestras fueron luego almacenadas. De cada muestra se obtuvo una sección de dentina con caries artificial que fue infiltrado por alguno de los vehículos propuestos, se observó al microscopio de manera tal que pudiera rastrearse la penetración de las nanopartículas en sentido ocluso apical.

La presencia de zinc o plata en caso del grupo control en cada muestra se detectó empleando un espectrómetro dispersivo de energía (EDS), acoplado al microscopio electrónico de barrido FE-SEM Sigma LAMARX-IFEG UNC Conicet, Condiciones experimentales: EHT= 20 keV. Apertura = 60µm



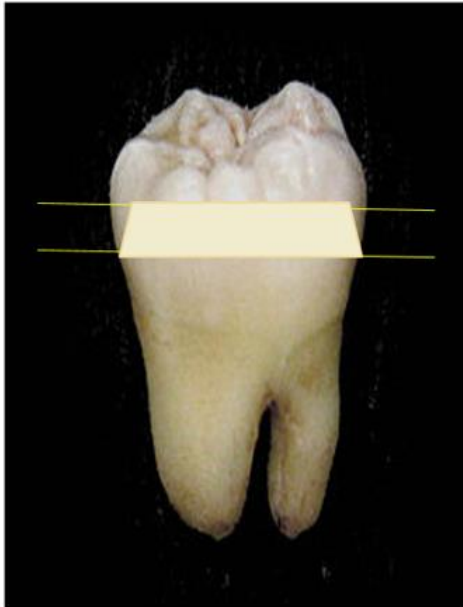


Fig. 2a



Fig. 2b



Fig. 2c

Figura 2a: Esquema zona media coronal donde se realizó el corte del diente utilizada en las pruebas, Figura 2b: muestra antes de cubrir. Figura 2c: muestra con caries artificial en ventana expuesta

## 2.4 Evaluación de la dureza superficial

Del total de las muestras obtenidas se asignaron cuatro grupos: Grupo 1: Diente Sano, Grupo 2: Diente con caries artificial sin tratar, Grupo 3: Diente con caries artificial infiltrado con nanopartículas de óxido de zinc + Resina fluida Icon del laboratorio DMG en una concentración de 0.5mg/100µl, y Grupo 4: Diente con caries artificial infiltrado con Solución de Fluoruro diamino de Plata al 38 % de marca Fagamin del laboratorio Tedequim. En los grupos 3 y 4 se utilizó el mismo protocolo

de formación de caries artificial descrito en pruebas anteriores, es decir el mismo que en los grupos 1 y 2 de la sección 2.3 Evaluación de profundidad de infiltración.

Las mediciones se realizaron a través de un Microscopio de fuerza atómica el cual es un instrumento mecano-óptico que permite detectar fuerzas del orden de los nanonewtons.

Al rastrear una muestra, es capaz de registrar continuamente su topografía mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica. La sonda va acoplada a una palanca microscópica muy flexible de sólo unos 200  $\mu\text{m}$ . El microscopio de fuerza atómica ha sido esencial en el desarrollo de la nanotecnología, para la caracterización y visualización de muestras a dimensiones nanométricas.

Se realizó una técnica de nanoindentación sobre las muestras, la cual permitió utilizando en una modalidad Contacto, obtener imágenes topográficas de las muestras y en modo Tapping el cual brindó información acerca de las propiedades de dureza de las muestras.

En esta evaluación se utilizaron 2 equipos:

1) Microscopio de fuerza atómica (AFM) marca NANOSURF modelo CoreAFM con escáner en XYZ de  $100 \times 100 \times 12 \mu\text{m}$  (LAMARX-IFEG, UNC-CONICET).

2) Microscopio de fuerza atómica (AFM) marca Agilent Technologies modelo 5500 PicoScan con un escáner de  $10 \times 10 \times 2 \mu\text{m}$  (INFIQC, UNC-CONICET).

Para las imágenes de modo contacto con modulación de fuerza se

utilizaron puntas Nanosensor con reflejo en la zona posterior<sup>68</sup>, constante de fuerza de 2.8 N/m y frecuencia de oscilación nominal de 75 kHz. Para las imágenes topográficas y para la medición de superficie en modo de fase se utilizaron puntas multipropósito de Budget Sensors<sup>69</sup>.

La utilización del microscopio de fuerza atómica se constituyó en un recurso de gran valor para el manejo de muestras biológicas de tamaño reducido de este trabajo y fue seleccionado como opción al microdurómetro tradicionalmente empleado para evaluar dureza Vickers. El AFM, entre varios usos, es una herramienta para dirigir el diseño de estructura de andamiaje en ingeniería tisular. En este caso, la simulación de una nanoindentación sobre la superficie derivó de la aplicación de fuerzas atómicas que contrastaban con las respuestas viscoelásticas y plásticas del tejido, generando una curva espectroscópica donde se expresaron las diferentes consistencias de la superficie.

El AFM pasa por diferentes etapas desde el acercamiento de la punta a la muestra, luego etapa de contacto, indentación, alejamiento para dar como resultado final imagen de la misma. Se puede utilizar en diferentes modos de acuerdo a la información que se necesite obtener. En este caso se empleó en modo "contacto", a partir de allí se obtuvieron imágenes topográficas de las muestras dentales, y también se utilizó el modo "Tapping" el cual permitió cuantificar las propiedades de dureza y visco elasticidad de modo de comparar la dureza superficial de las muestras tratadas.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Resultados Objetivo Específico No. 1:

Evaluación de la estabilidad de nanopartículas de Óxido de Zinc, en los diferentes vehículos propuestos, para la posterior infiltración de las muestras afectadas con caries.

Los resultados de estabilidad para las Nanopartículas de Óxido de Zinc en los diferentes medios fueron los siguientes:

Utilizando Resina Fluida Icon® como vehículo: el resultado de estabilidad estuvo entre un 80 y 100% en una dispersión al 12,5%, y la misma se mantuvo hasta el final de la prueba. En dispersión al 25% y 50%, la estabilidad en las primeras 48 horas fue entre 80 y 100%, y disminuyó entre las 48 y 72 h al rango entre 60% y 80%.

Utilizando Tioglicolato como vehículo: el resultado de estabilidad fue entre un 80 y 100% en una dispersión al 12,5%, y la misma se mantuvo hasta el final de la prueba. En los casos en donde se utilizó el mismo vehículo en dispersión de 25%, la estabilidad en las primeras 48 horas fue entre 80 y 100%, y disminuyó entre las 48 y 72 h al rango entre 60% y 80%. Al aumentar la dispersión al 50% presentó un porcentaje de estabilidad entre el 80 y 100% las primeras 4 horas de la prueba, un 60-80% entre las 4 y 24 horas y disminuyó a 40-60% entre las 48 y 72 horas.

Utilizando Caldo Cerebro Corazón como vehículo: el resultado de estabilidad fue entre un 20 y 40% en una dilución al 12,5% las primeras dos horas, disminuyendo a un 10-20% desde la segunda hora y hasta las 72 horas. En los casos en donde se utilizó el mismo vehículo en dilución de 25% y 50%, la estabilidad fue entre 10 y 20%.

En cuanto al resultado del grupo control, la estabilidad de las Nanopartículas de Óxido de Zinc en Peróxido de Hidrógeno dispersión al 3% presentó estabilidad del 20 al 40% las primeras dos horas, y menores al 20% a partir de la segunda hora y hasta las 72 horas. En la segunda dispersión al 15% presentó estabilidad del 10 al 20%. Debido a que las nanopartículas de Óxido de Zinc mostraron estabilidad insuficiente en Peróxido de Hidrógeno, dicho vehículo fue descartado en las pruebas posteriores.

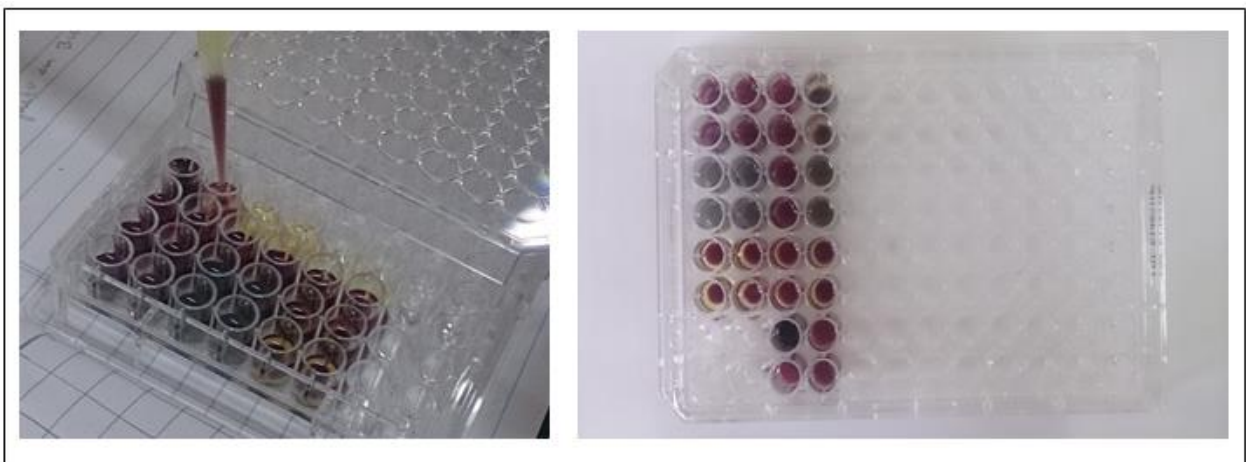


Figura 3: Evaluación de estabilidad en placa de Wells, de Nanopartículas de Óxido de Zinc en diferentes vehículos.

DISOLUCION FINAL	50%	25%	12,5%	TIEMPO
Tioglicolato	★★★★★	★★★★★	★★★★★	0
	★★★★★	★★★★★	★★★★★	2
	★★★★★	★★★★★	★★★★★	4
	★★★★★	★★★★★	★★★★★	6
	★★★★★	★★★★★	★★★★★	12
	★★★★★	★★★★★	★★★★★	24
	★★★★★	★★★★★	★★★★★	48
	★★★★★	★★★★★	★★★★★	72
Caldo C/C	★	★	★★	0
	★	★	★	2
	★	★	★	4
	★	★	★	6
	★	★	★	12
	★	★	★	24
	★	★	★	48
	★	★	★	72
Resina Icon	★★★★★	★★★★★	★★★★★	0
	★★★★★	★★★★★	★★★★★	2
	★★★★★	★★★★★	★★★★★	4
	★★★★★	★★★★★	★★★★★	6
	★★★★★	★★★★★	★★★★★	12
	★★★★★	★★★★★	★★★★★	24
	★★★★★	★★★★★	★★★★★	48
	★★★★★	★★★★★	★★★★★	72

DISOLUCION FINAL	15%	3%	TIEMPO
H2O2	★	★★	0
	★	★★	2
	★	★	4
	★	★	6
	★	★	12
	★	★	24
	★	★	48
	★	★	72

80-100%	★★★★★
60-80%	★★★★★
40-60%	★★★
20-40%	★★
10-20%	★

Figura 4: Estabilidad de Nanopartículas de Óxido de Zn en diferentes vehículos y dispersiones en 72 horas.

### Dispersión al 12,5%

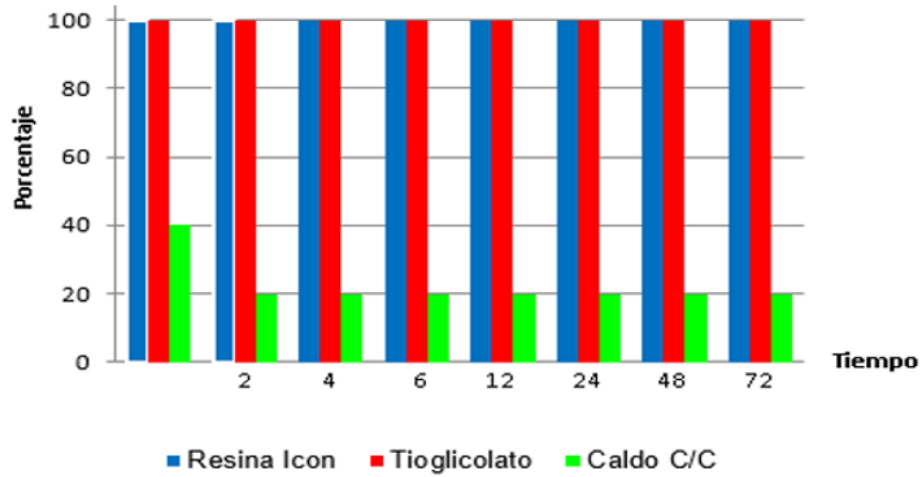


Figura 5: Estabilidad de Nanopartículas de Óxido de Zn en diferentes vehículos al 12.5% en 72 horas.

### Dispersión al 25%

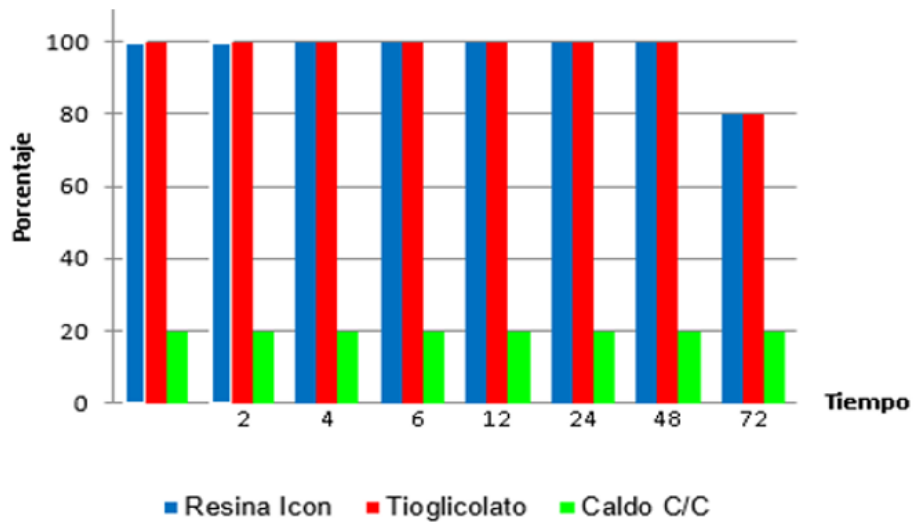


Figura 6: Estabilidad de Nanopartículas de Óxido de Zn en diferentes vehículos al 25% en 72 horas.

### Dispersión al 50%

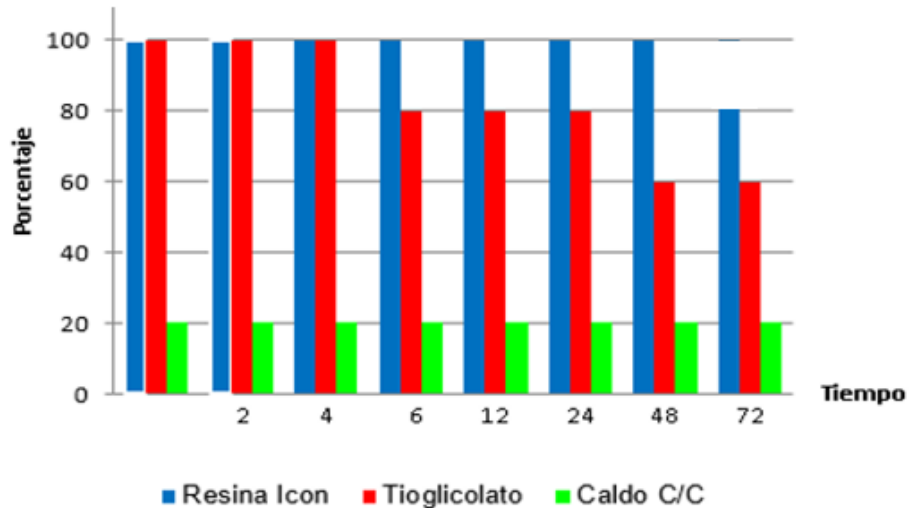


Figura 7: Estabilidad de Nanopartículas de Óxido de Zn en diferentes vehículos al 50% en 72 horas.

### 3.2 Resultados Objetivo Específico No. 2:

El objetivo fue determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las Nanopartículas de Óxido de Zinc, frente a microorganismos específicos que intervienen en el progreso de la enfermedad de caries dental.

La figura 8 muestra un gráfico de barras, que cuantifica en su eje vertical el crecimiento bacteriano de los diferentes microorganismos medido en UFC por su sigla en inglés de unidades formadoras de colonias y en el eje horizontal se cuantifica el incremento de concentración de nanopartículas de óxido de zinc.



La CIM de Nanopartículas de Óxido de Zinc fue 1,2mg/mL para *Streptococcus Mitis* y 0,6mg/mL para *Streptococcus Mutans* y *Lactobacillus spp.*, Sin embargo algunos efectos pudieron observarse en concentraciones de 0,2mg/mL

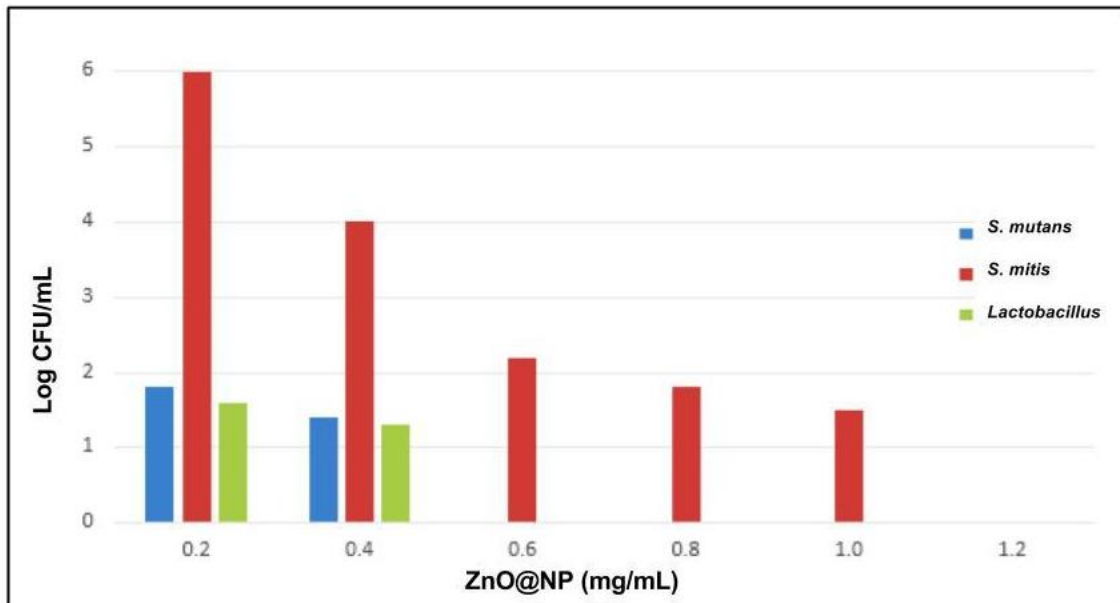


Figura 8: Crecimiento Bacteriano (Log UFC/mL) de *S. mutans* (azul), *S. mitis* (rojo) y *Lactobacillus* (verde) tratados con diferentes concentraciones de ZnO@NP en Caldo Tioglicolato, durante 18 h a 37 °C, bajo condiciones microaeróbicas.

### 3.3 Resultados Objetivo Específico No. 3:

Evaluar la profundidad de infiltración en los tejidos dentarios del Grupo 1 utilizando resina fluida Icon, modificada con nanopartículas de óxido de zinc y grupo 2 Control Diaminofluoruro de Plata al 38%.

Los mapeos mostraron que en el grupo 2 (control), el catión Ag penetró en las muestras tratadas con Fluoruro di-amino de plata al 38% en un promedio de 135  $\mu\text{m}$ , desviación estándar 45 $\mu\text{m}$ . Mientras que el Zn rastreado en las muestras que recibieron el polímero de infiltración modificado con nanopartículas de óxido de zinc no superó valores medios de penetración de 15  $\mu\text{m}$  , desviación estándar 6  $\mu\text{m}$ .

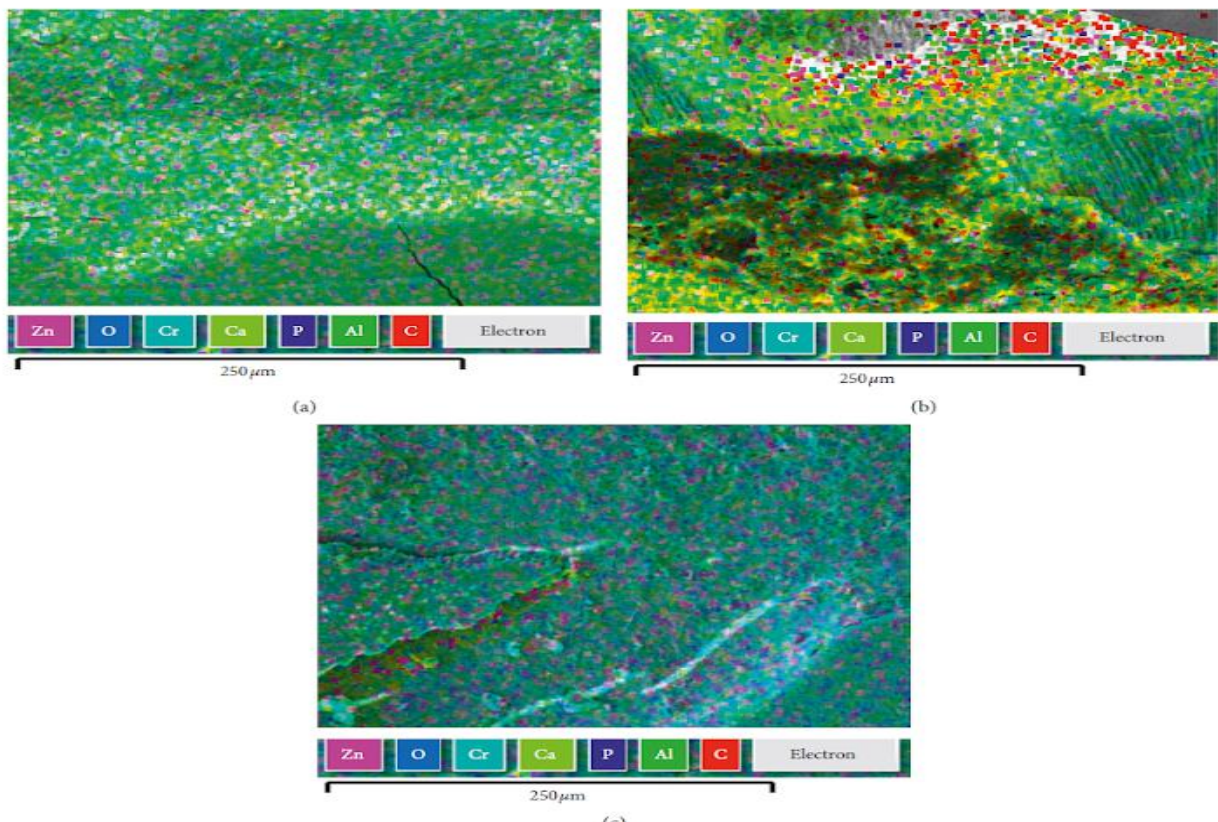


Figura 9: Imágenes SEM Muestras dentales tratadas con resina Icon modificada con ZnO@NP

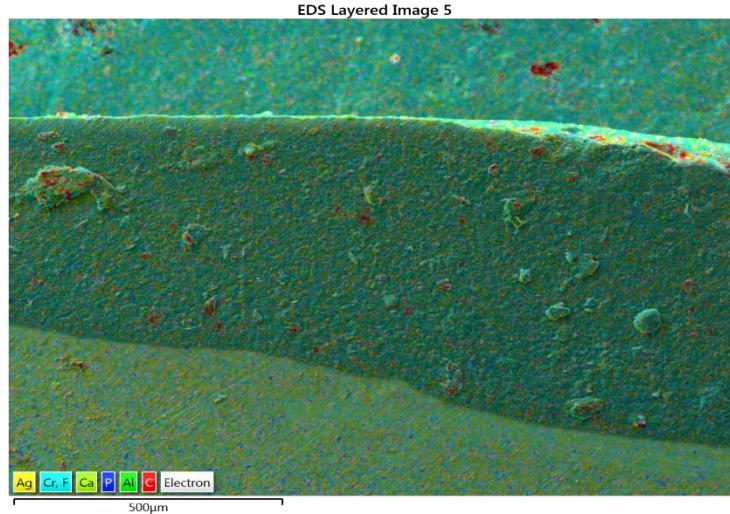


Figura 10: Imágenes SEM Muestras dentales tratadas con Fluoruro di-amino de plata al 38%, el catión Ag se observa color amarillo.

### **3.4 Resultados Objetivo Específico No. 4:**

Evaluar los cambios en las propiedades de dureza superficial de las muestras tratadas previamente con los vehículos y nanopartículas.

Resultados de Dureza obtenido con AFM (Microscopio de fuerza atómica):

Modo Tapping:

- Dureza de contacto en muestras diente sano: Media 65 MPa , desviación estándar 5
- Dureza de contacto en muestras diente con caries artificial: Media 45 MPa, desviación estándar 7 MPa

- Dureza de contacto en muestras dientes con caries artificial tratadas con Nanopartículas de óxido de zinc y Resina Icon®: Media 62 MPa desviación estándar 15 MPa

- Dureza de contacto en muestras dientes con caries artificial tratadas con Ag : Media 89 MPa desviación estándar 12 MPa

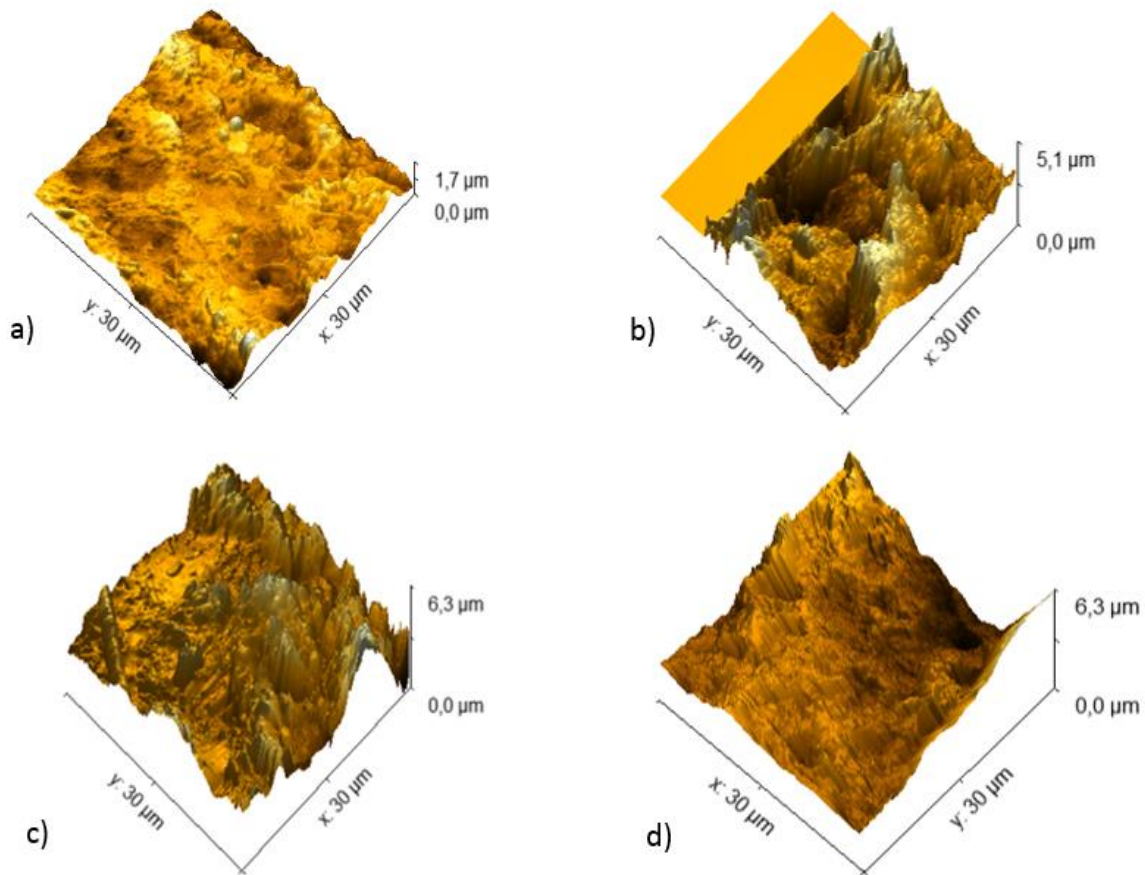


Figura 11: Imágenes topográficas de las muestras, obtenidas por AFM Modo Contacto. 11a. Superficie diente sano, 11b. diente afectado con caries artificial, 11c diente tratado con resina Icon modificada con nanopartículas de Óxido de zinc y 11d. diente tratado con Diaminofluoruro de plata al 38%

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Sobre la metodología utilizada

Las nanopartículas de óxido de zinc fueron elegidas en este estudio debido a sus antecedentes de baja toxicidad en bajas concentraciones y varios estudios previos que avalan su uso en el área de salud y su conocida acción antimicrobiana.

En la primera etapa, se realizó un estudio de estabilidad de dichas nanopartículas en diferentes vehículos los cuales fueron propuestos debido a su naturaleza, algunos de ellos con base acuosa como los caldos Tioglicolato y Caldo cerebro corazón. Por otro lado, se utilizó una resina fluida indicada clínicamente para el tratamiento de lesiones iniciales de caries por lo que se conocen estudios previos de su capacidad de infiltrar estructura adamantina.

En última instancia se decidió sumar un vehículo control conocido por su alta capacidad de infiltración del esmalte dental como el peróxido de hidrógeno, utilizado desde hace varios años como parte de tratamientos de aclaramiento dental. Los vehículos se consideraron estables cuando las nanopartículas en suspensión superaban el 60% de estabilidad por 72 horas.

Las nanopartículas Óxido de Zinc utilizadas en este estudio, fueron seleccionadas por tener un tamaño promedio menor a los 50nm y un potencial global  $z$  positivo  $>35mV$ , estas se encuentran entre las más estables y pequeñas en

medios de pH ácidos, como en los tejidos afectados por caries. Este trabajo en particular se enfoca en el efecto de estas nanopartículas sobre cepas anaerobias que participan en el desarrollo de la enfermedad de caries.

En tal sentido, para la evaluación de la CIM de nanopartículas, se seleccionaron tres cepas vinculadas a la etiopatogenia de la caries. Las bacterias Gram Positivas productoras de ácido láctico, además de ser los principales microorganismos que participan en el desarrollo de la enfermedad, producen una gran cantidad de ácido corrosivo a partir de azúcares. Por esta razón es que para evaluar su capacidad antibacteriana se debieron usar medios con alta concentración de azúcar y baja concentración de oxígeno.

Los resultados obtenidos en cuanto a CIM de las nanopartículas en las diferentes cepas seleccionadas, confirma su capacidad antibacteriana, pudiendo asegurarse que son bactericidas para las cepas de St. Mitis, St. Mutans y Lactobacillus. Es importante destacar que por la configuración del experimento, se pudo observar que dicha capacidad bactericida se da aún en condiciones de microaerofilia, como ocurriría en la cavidad de caries.

Uno de los mecanismos antibacterianos sugeridos para las nanopartículas de óxido de zinc, es que producen especies reactivas de oxígeno como radical peróxido que afecta el crecimiento y desarrollo microbiano, esto se da efectivamente en un medio aeróbico, aunque se pudo comprobar que esta capacidad antimicrobiana se puede dar independientemente de la disponibilidad de oxígeno.

Al ser capaces estas nanopartículas de destruir las bacterias anaeróbicas sin ningún tipo de radiación, no habría necesidad de explorar su actividad fotocatalítica,

la cual ha sido observada en campo oscuro por otros autores, pero nunca ha sido probado en condiciones de microaerofilia<sup>70-71</sup>. Dichos autores atribuyen al mecanismo antibacteriano observado en campo oscuro, el cual muestra la modificación de la actividad de la membrana celular a partir de una interacción electrostática<sup>72</sup>, al mismo tiempo iones zinc se filtran en el medio de crecimiento interrumpiendo el medio de azúcar esencial desplazando iones esenciales para los sistemas enzimáticos bacterianos como el magnesio<sup>73</sup>.

Con el propósito de generar en las muestras dentinarias una lesión de caries artificial, clínicamente visible y sin pérdida de sustancia se utilizó un método<sup>78</sup> de referencia utilizado en múltiples estudios. Este permite la desmineralización de las muestras simulando el patrón irregular que se produce en lesiones de caries en la cavidad bucal. La sustancia desmineralizante utilizada esta compuesta químicamente por ácido lácido (0,1M), cloruro de calcio (3 mM), fosfato diácido de potasio (1,8 mM) y carboximetilcelulosa 1%, pH: 4,5.

Finalmente, la dureza superficial se determinó por medio de diagramas de fuerza obtenidos a través de un microscopio de fuerza atómica (AFM,) el cual realizó mapas bidimensionales de curvas de fuerza, elasticidad, adhesión y deformación registradas de las superficies de las muestras evaluadas.

## 4.2. Sobre los resultados obtenidos

La mayor estabilidad de nanopartículas fue probada en vehículo polimérico.

Tal como era previsible, la causticidad del peróxido de hidrógeno desestabilizó la concentración de nanopartículas en un breve período, desestimando la posibilidad de utilizar este vehículo para transportar estas partículas al interior de una lesión por caries. Esta situación motivó que para los siguientes ensayos sobre Capacidad Inhibitoria Mínima, Capacidad de Infiltración y Cambios en la Dureza Superficial de lesiones artificiales de caries, se descartara el estudio de un grupo que utilizara el peróxido de hidrógeno como vehículo.

Es importante aclarar que además del poder antibacteriano del zinc, tiene un rol potencialmente positivo en la regeneración tisular. Autores como Larsen y Auld<sup>74</sup>, afirman que dicho agente es capaz de estabilizar proteínas, y tiene un efecto protector al unirse al colágeno en zonas sensibles a la acción de enzimas proteinasas. Aparentemente el Zinc actúa como un inhibidor competitivo de las Metaloproteinasas disminuyendo la degradación de colágeno en capas híbridas de enlace simple.

Para medir la infiltración del óxido de zinc en diferentes vehículos, se midieron las nanopartículas de dicho elemento por un microanálisis EDS (espectrómetro dispersivo de energía acoplado al microscopio electrónico de barrido, donde la masa o porcentaje de los elementos presentes en las muestras se calculan y se identifican. De esta manera se pudo observar la profundidad de infiltración de los



vehículos con las nanopartículas de óxido de zinc.

Esta capacidad de infiltrar la muestra dental afectada por caries es fundamental para alcanzar todos los focos infecciosos bacterianos en el proceso patológico. Los vehículos utilizados para probar la infiltración de los vehículos con las nanopartículas fueron por un la resina fluida, y por otro lado el grupo control con Diaminofluoro de plata al 38%. En lugar del peróxido de hidrógeno, se decidió utilizar como control un producto comercial a base de diamino fluoruro de plata cuyo uso clínico es ampliamente conocido en Odontopediatría para detener la progresión de lesiones por caries dental.

Los ensayos de infiltración mostraron que las nanopartículas óxido de zinc presentan mayor afinidad en las zonas desmineralizadas de las muestras comparadas con las regiones sin afectar por la lesión artificial.

Uno de los vehículos que mayor infiltración mostró fue el grupo control diamino fluoruro de plata. En segundo lugar de capacidad de penetración se ubicó la resina fluida Icon® a la cual se le agregaron las nanopartículas. Es importante aclarar que estudios anteriores informan que la incorporación de nanopartículas en resinas no afecta sus propiedades adhesivas pudiendo tener un efecto positivo en sus propiedades mecánicas<sup>76</sup>. Por otra parte, se descarta una potencial citotoxicidad de monómeros residuales proveniente de resinas comerciales a partir de estudios implementados con bajas concentraciones<sup>77</sup>.

## 5. CONCLUSION:

Se puede concluir que es posible en estudios in vitro infiltrar las lesiones artificiales de Caries e incluir en este vehículo nanopartículas de zinc aprovechando su actividad antimicrobiana, pudiendo detener su actividad y dando lugar a una reparación del tejido in situ.

Las nanopartículas de Óxido de zinc mostraron estabilidad por 72 horas en los vehículos Resina Icon y Caldo Tioglicolato.

En el Caso de los otros vehículos propuestos como Peróxido de Hidrógeno y Caldo cerebro Corazón, las nanopartículas presentan baja Estabilidad.

Se determinó la Concentración Inhibitoria mínima de nanopartículas de zinc frente a bacterias que participan en el proceso de enfermedad de caries, confirmando su actividad antimicrobiana la cual fue 1,2mg/mL para *Streptococcus Mitis* y 0,6mg/mL para *Streptococcus Mutans* y *Lactobacillus spp.*, Sin embargo algunos efectos pudieron observarse en concentraciones de 0,2mg/mL

Los ensayos de infiltración tanto en Resina Fluida como en grupo control mostraron que las nanopartículas de óxido de Zn tienen mayor afinidad en las zonas desmineralizadas comparadas con las regiones normales de la pieza dental. Los vehículos de mayor infiltración en tejido dentinario fueron el vehículo control Diamino fluoruro de plata y en segundo lugar la resina fluida Icon.

En cuanto a la dureza del tejido, las pruebas con AFM muestran que al producirse la lesión de caries el tejido pierde dureza superficial y que luego al ser

tratados, esta aumenta. En el caso de ser tratados con Diamino fluoruro de Plata presenta una dureza significativamente mayor que al ser tratada con resina fluida.

La importancia del presente trabajo y los experimentos realizados, es que sientan bases para futuros estudios para poder perfeccionar diferentes plataformas de infiltración que utilicen nanopartículas que mejoren las propiedades de los tejidos afectados por caries, pudiendo ser utilizadas en su tratamiento.

El perfeccionamiento, investigación y desarrollo de nuevas plataformas nanotecnológicas, con la finalidad de mejorar el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades en el campo oral, permitirá a la Odontología avanzar hacia nuevos paradigmas que lleven a la implementación de técnicas y protocolos más sencillos y eficaces en un futuro cercano.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Domínguez-Medina N, González-López S, Menéndez-Núñez M. "Estudio de las vías de difusión de la lesión de mancha blanca del esmalte" RCOE Año: 2002; 7(5):469-476.
2. Barrancos Mooney J. Rodríguez G. "Operatoria Dental" 3era. Ed. Buenos Aires. Editorial Medica Panamericana Año: 1999 Capitulo 8 p. 139-78
3. Gomez de Ferraris ME, Campos Muñoss A. "Histología y embriología bucodental". 2da. Edicion, Editorial Médica Panamericana Año: 2002.
4. Carranza, Newman. "The tooth-supporting structures". Clinical Periodontology 8va Ed. Filadelfia WB Saunders Co, Año:1996.
5. Elderton RJ, Jenkins CB, Marshall KJ, Hooper SM, Foster LV, Hooper GR, Roberts K. "Changing perceptions of the requirements of cavity preparations. British Dental Journal, 6,168(1), 30-32. Año:1990
6. Yu OY, Mei ML, Zhao IS, Li QL, Lo EC, Chu CH. "Remineralisation of enamel with silver diamine fluoride and sodium fluoride" Faculty of Dentistry. The University of Hong Kong, Hong Kong, China.
7. Miller MB, López L, Quock RL. "Silver diamine fluoride, potassium iodide, and esthetic perception: An in vitro pilot study Department of General Practice and Dental Public Health", University of Texas School of Dentistry at Houston, Houston, Texas, USA.
8. Tung MS, Eichmiller FC. "Amorphous calcium phosphates for tooth mineralization" American Dental Association Foundation and National Institute of Standards and Technology. Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology.
9. Eric C. Reynolds PhD "Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides". A review Journal Literature Pubmed Central.

10. Hay K.D.M Orton. "The efficacy of casein phosphoprotein calcium phosphate complex as a mouth moistener in patients with severe xerostomia". Oral Health Unit, Green Lane Hospital New Zealand
11. Lijima Y, Cai F, Shen P, Walker G, Reynolds C, Reynolds EC. "Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate". Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry. Nagasaki, Japan Año:2004
12. [www.gceurope.com/es/products/mipasteplus/](http://www.gceurope.com/es/products/mipasteplus/)
13. Gower L. y col. "Influence of fluoride on the mineralization of collagen via the polymer-induced liquid precursor (PILP) process" Department of Polymer Science and Engineering, University of Massachusetts, Department of Materials Science and Engineering, University of Florida, USA Año: 2008
14. Osorio R, Yamauti M, Sauro S, Watson T, Toledano M. "Experimental resin cements containing bioactive fillers reduce matrix metalloproteinase-mediated dentin collagen degradation". J Endod Año: 2012  
Toledano M, Yamauti M, Ruiz-Requena ME, Osorio R. (2012) A ZnO-doped adhesive reduced collagen degradation favouring dentine remineralization.
15. Osorio, Cabello, Medina-Castillo, Osorio E . "Zinc modified nanopolymers improve the quality of resins dentin-bonded interfaces". Osorio, Cabello, Medina-Castillo, Osorio E, Toledano Año:2016
16. Toledano, Osorio, Osorio. Medina-Castillo, Aguilera "Ions modified nanoparticles affect functional remineralization and energy dissipation through dentin-resin interface" Elsevier Año:2017
17. Lanata Julio, Operatoria Dental. Estética y Adhesión.. Capítulo 5. Grupo Guía 2003.
18. Buonocore M. "A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces". Journal of Dental Research, 34(6), 849-853. Año:1955

19. Lanata Julio, Operatoria Dental. Estética y Adhesión.. Capítulo 5. Grupo Guía 2003.
20. (Lanata 2003; Lanata 2008; Lanata 2011).
21. Declaración de Principios de la Federación Dental Internacional, "Intervención mínima en el tratamiento de caries dental" Aprobada por la Asamblea General de la FDI: 1 de Octubre de 2002, Viena, Austria.
22. Ericson D, Kidd E, McComb D, Mjör I, Noack MJ. "Minimally Invasive Dentistry concepts and techniques in cariology". Oral Health & Preventive Dentistry, 1(1), 59-72. Año:2003
23. Ericson D. "Minimally invasive dentistry". Department of Cariology, Suecia. Año:2003
24. Mount GJ, Ngo H. "Minimal intervention: early lesions". Quintessence International, a31 (8), 535- 546. Año:2000
25. Phillip J Review. Mount GJ. "Uppermost command: substance preparation. New micro cavity design"., Germany. Año:2000
26. Murdoch-Kinch CA. McLean. ME. "Minimally invasive dentistry". Journal of the American Dental Association,134 (1), 87-95. Año:2003
27. Nový BB, Fuller CE. "The material science of minimally invasive esthetic restorations". Compendium of Continuing Education in Dentistry, 29(6), 338-346, quiz 347. Año:2008
28. Peters MC. McLean ME. "Minimally invasive operative care II. Contemporary techniques and materials: an overview". The Journal of Adhesive Dentistry, xb3 (1), 17-31.Review. Año:2008
29. Peters MC. McLean ME. "Minimally invasive operative care. I. Minimal intervention and concepts for minimally invasive cavity preparations". The Journal of Adhesive Dentistry, A3 (1), 7-16. Review. Año:2001

30. Peters MC. Academy of Operative Dentistry Hollenback Memorial Prize. Dr. James B. Operative Dentistry, 34(2), 239-240. doi: 10.2341/1559- 2863-34.2.239. Año:2009
- 30a. Tyas MJ. Anusavice KJ. Frencken JE. Mount GJ. (2000). "Minimal intervention dentistry, Review". FDI Commission Project 1-97. International dental Journal. Año:2000
- 30b. Welk DA. Lanswell HR. "Rationale for designing cavity preparations In light of current knowledge and technology". Dental Clinics of North America Año:1976
31. Bustamante A. "Adhesión al tratamiento en Odontología".. Atlas de Operatoria Dental. Alfaomega (ed) Buenos Aires, 430-445 Año:2008
32. Elderton RJ, Nuttall NM. "Variation among dentists in planning treatment". British Dental Journal, 9,154 (7), 201-206. Año:1983
- 33a. Anisa Mnyusiwalla, Abdalla S Y Peter Singer "Mind the gap" Science and ethics in nanotechnology.. Año 2003.
34. Chen F, Cai W, eds. Hybrid Nanomaterials. Design, Synthesis, and Biomedical Applications"" , CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, Año:2017.
35. Silva GA. "Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges". Nat Rev Neurosci. 2006;7:65–74.
36. Silva GA. "Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges\*". Nat Rev Neurosci. 2006;7:65–74.
37. Mhraryan A, Ferraz N, Strømme M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. Prog Mater Sci 2012,57:875-910.
38. Gazzaniga G, Roveri N, Rimondini L, Palazzo B, Lafisco M. "Biologically active nanoparticles of a carbonate-substituted hydroxyapatite process for their preparation and compositions incorporating the same". Año:2007.

39. Zhang S. "Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly". *Nat Biotechnol.* Año:2003
  
40. Cantín M, Vilos C, Suazo I. "Nanodontología: el Futuro de Odontología Basada en Sistemas Nanotecnológicos". *Int J Odontostomat,* Año:2010
  
41. Nagpal A, Kaur J, Sharma S, Bansal A, Sachdev P. "Nanotechnology-the Era Of Molecular Dentistry". *Indian J Dent Sci* Año:2011
  
42. Freitas RA Jr. Nanodentistry. *J Am Dent Assoc* 2000 ;131(11):1559-65.
  
43. Kanaparthi R, Kanaparthi A. "The changing face of dentistry: nanotechnology". *Int J Nanomed* 2011;6;2799–804.
  
44. Henkel AAK, Sutech GMBH Co. KG, Barth A, Kropf C, Poth T. "Oral and dental care product". 2005, WO020878A2.
  
45. Chen FM, An Y, Zhang M. "New insights into and novel applications of release technology for periodontal reconstructive therapies". *J Control Release*,149:92-110. Año:2010
  
46. Xu HHK, Weir MD, Sun L, Moreau JL, Takagi S, Chow LC, Antonucci JM. "Strong nanocomposites with Ca, PO<sub>4</sub>, and F release for caries inhibition". *J Dent Res* ,89:19-28. Año:2010
  
47. Kong, L.X., Peng, Z. Li, S.D., Bartold, P.M. "Nanotechnology and its role in the management of periodontal diseases". *Periodontology*;40:184-196. Año:2006
  
48. Jain N, Jain GK, Javed S, Iqbal Z, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK. Recent approaches for the treatment of periodontitis. *Drug Discov Today* 2008,13:932-943.
  
49. Kashi TSJ, Eskandarion S, Esfandyari-Manesh M, Marashi SMA, Samadi N, Fatemi SM, Atyabi F, Eshraghi S, Dinarvand R. "Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method". *Int J Nanomed*,7:221-234. Año:2012



50. Bhardwaj A, Bhardwaj, SV, Pandey R. "Advances in periodontal drug delivery systems". *Int J Novel Drug Deliv Tech*,2:271-275. Año:2012
51. Ganem-Quintanar A. "Étude de la perméabilité de la muqueuseorale: évaluation de différentes approches pour augmenter le passage des principesactifs", Ph.D. thesis, Université de Geneve, Université Claude Bernard, Lyon, Genève, Año:1997.
52. García-Contreras R, Argueta-Figueroa L, Mejía-Ruvalcava C, Jiménez-Martínez R, Cuevas Guajardo S, Sánchez-Reyna PA, Mendieta-Zeron H. "Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice". *Int Dent J*,61:297-301. Año:2011
53. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Rodríguez de Camargo E, Filho ACR, Barbosa DB. "Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles". *J Prosthodont*,21:7-15. 2012
54. Lansdown AB. Silver 2: Toxicity in mammals and how its products aid wound repair. *J Wound Care*,11:173 -177. Año 2002
55. Lansdown AB. Silver I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care* 2002,11:125 - 130.
56. International Association for Dental Research. "Launching a dental materials research The Association; 2012 [cited 2013 Jan 14]. Available from: [http://www.iadr.org/files/public/13DMIW\\_Summary.pdf](http://www.iadr.org/files/public/13DMIW_Summary.pdf)
57. Jain KK. Nanodiagnostics: application of nanotechnology in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:153 - 61.
58. Sidhu SK, Nicholson JW. A Review of Glass-Ionomer Cements for Clinical Dentistry. *J Funct Biomater*. 2016 Jun 28;7(3). pii: E16. doi: 10.3390/jfb7030016.
59. Baig MS, Fleming GJ. "Conventional glass-ionomer materials: A review of the developments in glass powder, polyacid liquid and the strategies of reinforcement". *J Dent*. 2015, Aug; 43(8):897-912. doi: 10.1016/j.jdent.2015.04.004.

60. Molina GF, Cabral RJ, Mazzola I, Brain L, Frencken JE. "Mechanical performance of encapsulated restorative glass-ionomer cements for use with Atraumatic Restorative Treatment (ART)". *J Appl Oral Sci* 2013; 21(3):243-249.
61. Najeeb S, Khurshid Z, Zafar MS, Khan AS, Zohaib S, Martí JM, Sauro S, Matinlinna JP, Rehman IU. "Modifications in Glass Ionomer Cements: Nano-Sized Fillers and Bioactive Nanoceramics". *Int J Mol Sci*. 2016 Jul 14;17 (7). pii: E1134. doi: 10.3390/ijms17071134.
62. Beun S, Glorieux T, Devaux J, Vreven J, Leloup G. "Characterization of nanofilled compared to universal and microfilled composites". *Dental Materials*; 23 (1):51-9. School of Dentistry and Stomatology, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium Año 2007
63. Osorio R, Cabello I, Medina-Castillo AL, Osorio E, Toledano M. "Zinc-modified nanopolymers improve the quality of resin-dentin bonded interfaces". *Clin Oral Investig*. 2016 Dec; 20(9):2411-2420. doi: 10.1007/s00784-016-1738-y
64. Vollath D. Nanoparticles – "Nanocomposites – Nanomaterials. An Introduction for Beginners", WILEYVCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, Germany, Año: 2013.
65. Chen HF, Clarkson BH, Sunk, Mansfield JF. "Self assembly of synthetic hydroxyapatite nanorods into enamel prism like structure". *J Colloid Interface Sci*; 288 (1):97-103. 2005
66. Lin LM, Ricucci D, Huang GT. "Regeneration of the dentine-pulp complex with revitalization/revascularization therapy: challenges and hopes". *Int Endod J*. 2014 Aug;47(8):713-24. doi: 10.1111/iej.12210.
67. Le Gu'éhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. "Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration", *Dent Mater* 2007;23(7):844-
68. [www.nanosensors.com/pointprobe-plus-force-modulation-mode-reflex-coating-afm-tip-PPP-FMR](http://www.nanosensors.com/pointprobe-plus-force-modulation-mode-reflex-coating-afm-tip-PPP-FMR)

69. [www.budgetsensors.com/all-in-one-afm-probes](http://www.budgetsensors.com/all-in-one-afm-probes)
70. R. Mahendra and S. Ranjita, *Metal Nanoparticles in Pharma*, Springer, Berlin, Germany, 1st edition, 2017.
71. L. Zhang, Y. Jiang, Y. Ding, M. Povey, and D. York, "Investigation into the antibacterial behavior of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids)," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 9, no. 3, pp. 479–489, 2006.
72. A. Sirelkhatim, S. Mahmud, A. Seenii et al., "Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity Journal of Healthcare Engineering 7 mechanism," *Nano-Micro Letters*, vol. 7, no. 3, pp. 219–242, 2015.
73. M. A. S. Melo, S. F. F. Guedes, H. H. K. Xu, and L. K. A. Rodrigues, "Nanotechnology-based restorative materials for dental caries management," *Trends in Biotechnology*, vol. 31, no. 8, pp. 459–467, 2013.
74. K. S. Larsen and D. S. Auld, "Characterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A," *Biochemistry*, vol. 30, no. 10, pp. 2613–2618, 1991.
75. K. S. Larsen and D. S. Auld, "Characterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A," *Biochemistry*, vol. 30, no. 10, pp. 2613–2618, 1991.
76. M. Saffarpour, M. Rahmani, M. Tahriri, and A. Peymani, "Antimicrobial and bond strength properties of a dental adhesive containing zinc oxide nanoparticles," *Brazilian Journal of Oral Sciences*, vol. 15, no. 1, p. 66, 2016.
77. R. M. Al-Mosawi and R. M. Al-Badr, "The study effects of dental composite resin as antibacterial agent which contain nanoparticles of zinc oxide on the bacteria associated with oral infection," *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, vol. 16, no. 1, pp. 49–55, 2017.
78. Rooij JF, Nancollas GH. "The formation and remineralization of artificial white spot, Lesions: a constant composition approach". *J DentRes*. 1984; 63(6): 864