



Actividad antibacteriana de Nanopartículas de plata inmovilizadas en cemento de óxido de zinc eugenol contra el *Enterococcus faecalis*: Estudio in vitro

INVESTIGADORES

DRA. LIZA MARIA ISAZA AREIZA

DR. JUAN CAMILO DUQUE ARISTIZABAL

ASESORES

DRA. MARTHA ELENA LONDOÑO LÓPEZ

DR. DIEGO TOBÓN CALLE

MAESTRÍA CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIVERSIDAD CES

GRUPO DE INVESTIGACIÓN GIBEC

GRUPO DE INVESTIGACIÓN CBO

INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS APLICADAS A LA ODONTOLOGÍA

MEDELLÍN

SEPTIEMBRE 2017

CONTENIDO

1	<u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	<u>6</u>
2	<u>MARCO TEÓRICO</u>	<u>9</u>
3	<u>OBJETIVOS</u>	<u>15</u>
3.1	OBJETIVO GENERAL:	15
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4	<u>METODOLOGÍA</u>	<u>16</u>
4.1	ENFOQUE METODOLÓGICO:	16
4.2	TIPO DE ESTUDIO:	16
4.3	POBLACIÓN DE REFERENCIA:	16
4.4	UNIDAD DE ANÁLISIS:	16
4.5	DISEÑO MUESTRAL:	16
4.6	VARIABLES:	16
4.7	PRUEBA PILOTO:	17
4.8	CONTROL DE ERRORES Y SESGOS	17
4.9	PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN:	18
5	<u>PLAN DE DIVULGACIÓN DE RESULTADOS</u>	<u>19</u>
6	<u>CONSIDERACIONES ÉTICAS</u>	<u>20</u>
7	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	<u>21</u>
7.1	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN SUSPENSIÓN Y SÓLIDAS:	21
7.2	ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE:	23
7.3	ESTANDARIZACIÓN EN LA MEZCLA DE ÓXIDO DE ZINC EUGENOL:	25
7.4	GENERACIÓN DEL MATERIAL INTEGRADO: ÓXIDO DE ZINC EUGENOL CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA SÓLIDAS Y EN SUSPENSIÓN	27
7.5	CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL INTEGRADO: ÓXIDO DE ZINC EUGENOL CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA SÓLIDAS Y EN SUSPENSIÓN:	30
8	<u>RESULTADOS</u>	<u>31</u>
8.1	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO - SEM:	31
8.2	ESPECTROSCOPIA INFRAROJA TRANSFORMADA DE FOURIER-FTIR	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (A-G): Cambio de color de la solución en el transcurso del tiempo....	2324
Figura 2: Espectro UV-vis de nanopartículas en extracto de guayaba.....	2425
Figura 3: Espectro UV-vis de nanopartículas en extracto de tamarillo.....	2425
Figura 4 : Consistencia en gota de la preparación óxido de zinc eugenol.....	2627
Figura 5 : Mezcla de óxido de zinc-eugenol por triplicado en portaobjetos.	2728
Figura 6 (A-C): Muestras finales en portaobjetos	2930
Figura 7 : Muestras en el horno a una T° de 36°C.	3034
Figura 8 : Muestras cubiertas en oro para ser estudiadas en SEM.....	3233
Figura 9 (A-C): Imágenes obtenidas del SEM en 20um, 3000x.	3233
Figura 10 : FTIR de óxido de zinc eugenol.....	3334
Figura 11 : FTIR de óxido de zinc eugenol con nanopartículas de plata en suspensión.....	3435
Figura 12 : FTIR de óxido de zinc eugenol con nanopartículas de plata sólidas.	3435
Figura 13 (A-C): Halos de Inhibición	3944

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Prueba Kirby- Bauer primera repetición (Anexo 1-5).....	35 <u>36</u>
Tabla 2: Prueba Kirby - Bauer controles y óxido de zinc eugenol para repeticiones 2 y 3 (Anexo 6-7).	36 <u>37</u>
Tabla 3: Prueba Kirby - Bauer Segunda Repetición (Anexos 8-11).	37 <u>38</u>
Tabla 4: Prueba Kirby - Bauer Tercera Repetición (Anexos 12-15).	37 <u>39</u>
Tabla 5: Promedios medición de halos.....	40 <u>42</u>

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los propósitos del tratamiento endodóntico es la eliminación de infecciones pulpares y la afección de los tejidos periapicales, mediante los procedimientos de conformación, desinfección, y obturación del sistema de conductos radiculares. Para este último, el uso de gutapercha y un cemento sellador han sido sugeridos para lograr un selle tridimensional, en donde el cemento debe tener características bactericidas que inhiban el crecimiento de microorganismos residuales en el conducto radicular y puedan favorecer el resultado exitoso del tratamiento (1).

La complejidad anatómica del sistema de conductos y la presencia de ramificaciones del conducto principal, sobretodo en el tercio apical de la raíz, son algunos de los factores predictores que alteran el éxito de un tratamiento endodóntico, convirtiéndose en un reto para que los endodoncistas realicen una correcta desinfección durante la conformación y la irrigación además de poder realizar una obturación tridimensional. La presencia de bolsas periodontales que indiquen un compromiso endo-perio en el diente, el estado preoperatorio del espacio pulpar, la presencia o ausencia de una lesión apical y el tamaño de la misma (diagnóstico pulpar y periapical inicial), la realización de una restauración posoperatoria incorrecta, el número de citas que involucre la realización del tratamiento, la longitud de trabajo que se obtenga, los conductos radiculares omitidos durante la realización del procedimiento, si es primera vez que se realiza el tratamiento endodóntico o es un retratamiento, entre otros, son otros factores relacionados con el resultado final de la endodoncia que pueden llevar a la persistencia de microorganismos tanto en los túbulos dentinales como en las ramificaciones del conducto radicular (2). El *Enterococcus faecalis* es la cepa bacteriana aislada más frecuentemente encontrada en los conductos radiculares tratados endodónticamente y es la causa más importante de fracaso del tratamiento endodóntico (3).

Teniendo entonces en cuenta que el fracaso en endodoncia es un problema que afecta a gran porcentaje de la población tratada (6 20%) (1,4,5), es de suma importancia tener todos los factores predictores mencionados anteriormente controlados, un sistema de conductos completamente desinfectado y obturado tridimensionalmente, un correcto diagnóstico inicial y una restauración final adaptada que se puede conseguir a partir de la utilización de materiales como la gutapercha y cementos selladores que tengan propiedades bactericidas que puedan inhibir el crecimiento microbiano de especies que no fueron eliminadas durante la irrigación y la conformación ya que el fracaso del procedimiento involucra un tratamiento inmediato porque trae consigo consecuencias, como aparición de sintomatología nuevamente en el paciente, progresión negativa y rápida de la lesión que empeora el pronóstico con el pasar de los días generando mayor debilidad del diente problema, y creando la necesidad de realizar tratamientos más complejos y más costosos desde un retratamiento o una cirugía apical, hasta llegar a terminar en una posible exodoncia (6).

Observando que aún con los materiales, técnicas e instrumentos que se tienen en la actualidad, el porcentaje de fracaso de un tratamiento de endodoncia es todavía muy alto, se hace necesario buscar otras alternativas para evitarlo, y garantizar un éxito del 100% buscando nuevas estrategias. Aparece entonces la nanotecnología como una opción que podría brindar algunas soluciones a esta situación, pero aún no ha sido evaluada ni estudiada lo suficiente como para determinar su eficacia y que podría ser útil en el campo de la endodoncia. De acuerdo con este vacío en el conocimiento y con el desarrollo de ésta nueva ciencia y su posible uso en la odontología, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

PREGUNTA: ¿Cuál es la capacidad antimicrobiana que tienen las nanopartículas de plata suspendidas en el cemento de óxido de zinc-eugenol contra el *Enterococcus faecalis*?

JUSTIFICACIÓN:

La importancia de la salud oral de cualquier persona radica en la significancia de evitar cualquier tipo de enfermedad que pueda producirse en la boca, incluso aquellas en las que se pueda hacer necesario la realización de un tratamiento endodóntico.

Debido a los posibles fracasos en la realización de un tratamiento de endodoncia y a las consecuencias que trae consigo, se hace importante para todo paciente que necesite una endodoncia evitar al máximo cualquier factor predictor de fracaso, dando mayor importancia a la realización de un tratamiento exitoso donde se minimicen costos y mayor pérdida de estructura dental remanente. Se ha demostrado que con las técnicas, materiales e instrumentos utilizados actualmente, no se ha logrado tener un éxito total de la terapia endodóntica exhibiendo todavía un porcentaje de fracaso alto. Se pretende entonces, lograr un mayor porcentaje de éxito, reduciendo las posibles complicaciones en el paciente, favoreciendo y proporcionando un estado de salud evitando los signos y síntomas que trae consigo la enfermedad pulpar y periapical, a partir de la utilización de nanotecnología y el cambio en la composición del cemento sellador óxido de zinc eugenol, cemento más utilizado en la actualidad para la obturación de los conductos radiculares (1,4,5,7), mezclado con nanopartículas de plata, las cuales han demostrado tener eficacia en la inhibición del crecimiento bacteriano. Se busca entonces, determinar la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de plata y de la mezcla de éstas con el cemento óxido de zinc eugenol, contra el microorganismo encontrado con mayor frecuencia en los fracasos de los tratamientos endodónticos, el *Enterococcus faecalis*.

2 MARCO TEÓRICO

La Endodoncia es una de las ramas de la odontología que se encarga de resolver las patologías inflamatorias e infecciosas en el tejido pulpar y periapical. Para tal efecto, la conformación e irrigación, deberán proveer un ambiente libre de microorganismos en el sistema de conductos y permitir su obturación (8,9).

Los fracasos de la endodoncia se detectan a partir de los signos (radiolucidez, tracto sinuoso, hinchazón) y los síntomas (dolor) de la enfermedad en el diente que surge o se desarrolla post tratamiento endodóntico. Los tratamientos endodónticos fracasan usualmente cuando los procedimientos no alcanzan estándares satisfactorios para la prevención y el control de las infecciones endodónticas. Muchos estudios demuestran que la mayoría de los pacientes con fracasos postratamiento se deben a: fallas en la conformación y en la irrigación de los conductos radicular además de una incorrecta obturación de los mismos. La complejidad anatómica de los conductos radiculares, la presencia de abundantes ramificaciones, la presencia de bolsas periodontales con comunicaciones endoperio, el estado preoperatorio del espacio pulpar, la presencia o ausencia de una lesión apical y el tamaño de la misma (diagnóstico pulpar y periapical inicial), la realización de una restauración posoperatoria incorrecta, el número de citas que involucre la realización del tratamiento, la longitud de trabajo que se obtenga, los conductos radiculares omitidos durante la realización del procedimiento, si es primera vez que se realiza el tratamiento endodóntico o es un retratamiento, entre otros, son las causas de la persistencia de la enfermedad, trayendo consigo la prevalencia de microorganismos en la infección intra o extraradicular. Las bacterias persistentes pueden sobrevivir en un conducto tratado por muchos años y están disponibles para inducir inflamación tisular nuevamente. El concepto de la erradicación total de las bacterias del sistema de conductos radiculares debería ser la meta final del tratamiento de endodoncia en dientes con presencia de la enfermedad (6,9,10,11).

El conducto radicular ofrece condiciones ideales para que las bacterias puedan evadir los efectos mecánicos por la acción de las limas y los efectos químicos de los irrigantes o medicamentos. Así, estos microorganismos pueden colonizar las ramificaciones que pueda tener el conducto principal y los túbulos dentinarios, en donde se establecen como comunidades llamadas biopelículas cuyas características son: la protección en los tejidos remanentes de dentina o suero de las células muertas, adaptación al nuevo ambiente activando genes sobrevivientes y vías metabólicas alternativas, que les confiere capacidad para sobrevivir períodos largos de tiempo sin nutrición. Las bacterias gram negativas están involucradas en las infecciones primarias y son comúnmente eliminadas, a excepción de algunas especies como *Fusobacterium nucleatum*, especies de *Prevotella* y *Campylobacter rectus* que se encuentran pos-instrumentación y pos-medicación. Muchos estudios han revelado que las bacterias que resisten frecuentemente a los procedimientos del tratamiento endodóntico son las gram positivas facultativas y las anaerobias incluyendo *Streptococci*, *Parvimonas micra*, especies de *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *lactocacilli*, *Enterococcus faecalis* y *Olsenella uli*. Esto soporta la noción de que las bacterias gram positivas son más resistentes al tratamiento antimicrobial y se adaptan fácilmente a diferentes condiciones ambientales (12).

El *Enterococcus faecalis* es una bacteria gram positiva anaerobia facultativa, frecuentemente encontrada en conductos radiculares tratados, con una prevalencia por encima del 90%. Posee alta habilidad de penetración en los túbulos dentinarios (900 μ m), los túbulos dentinarios tienen un diámetro hacia la pulpa entre 2,5 y 3,2 μ m. *Enterococcus faecalis* tiene un tamaño de 0,5 y 0,8 μ m) donde puede escapar de la acción de los instrumentos endodónticos y medicamentos. Además, puede resistir niveles de pH elevados lo que la hace una bacteria resistente al hidróxido de calcio, es capaz de colonizar conductos en infecciones simples y vivir relativamente independiente de nutrientes. Adicionalmente, se adapta a condiciones variables y adversas mediante la regulación de la expresión génica por señales del medio ambiente y entra en

en una escala muy pequeña, escrita y leída en átomos. Sin embargo, el término de nanotecnología fue introducido por primera vez por Tanigushi en un artículo publicado en 1974 [Concept of Nanotechnology](#) el Dr. Eric Drexler, en 1986, con su libro [Nanotechnology](#) popularizó el potencial de la nanotecnología (18).

Existen muchas definiciones de la nanotecnología, como la que se encuentra en el diccionario de la Real Academia de la Lengua Española, donde la definen como tecnología de los materiales y de las estructuras en la que el orden de magnitud se mide en nanómetros, con aplicación a la física, la química y la biología también definida como la ciencia de la manipulación de materiales en una escala de la billonésima parte de un metro o escala nanométrica, aproximadamente el tamaño de dos o tres átomos (19). El gobierno de los Estados Unidos de América, en su página www.nano.gov. define nanotecnología son el estudio y aplicación de cosas muy pequeñas, que se puede utilizar en todos los demás campos de la ciencia, como la química, la biología, la física, ciencia de los materiales y la ingeniería. Como éstas, muchas otras definiciones dan a conocer que la nanotecnología es la ciencia que estudia las partículas, de diversos materiales y composiciones, cuyas medidas oscilan entre 1-100 nm, para ser utilizadas en los diferentes campos de la ciencia con múltiple variedad de aplicaciones (19).

En el campo de la medicina, al igual que en la odontología, la nanotecnología es aplicada en el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades. Las partículas de tamaño nanométrico se han usado para producir diferentes materiales ya que poseen buenas propiedades mecánicas (19), además se han aplicado también en la implantología dental y otras áreas de la odontología (18).

Los antimicrobianos son agentes químicos, capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. En Odontología se han introducido varios de ellos, como los antibióticos, el flúor, la clorhexidina, los iones de plata, el yodo y los compuestos de amonio cuaternario. Las nanopartículas con actividad

antibacteriana, como las partículas de plata, son utilizadas en selladores y pastas de dientes (20).

La plata ha sido ampliamente utilizada desde hace miles de años, sus propiedades antimicrobianas se explotaban antiguamente con la medicina tradicional en la fabricación de apósitos para heridas, dispositivos anticonceptivos, instrumental quirúrgico y prótesis óseas, todos recubiertos o integrados con plata para evitar el crecimiento bacteriano. Se ha evaluado su utilización contra el tratamiento de enfermedades que requieren una concentración sostenida del fármaco en la sangre, o con un direccionamiento específico a células u órganos (7,21). La plata tiene gran aplicación en diversos sectores incluyendo la industria textil, electrónica, alimentación (22).

En la odontología de mediados de siglo XX se utilizó la plata para la realización de conos para obturación de conductos radiculares, pero dejaron de utilizarse ya que presentaban varias desventajas como la oxidación seguida por la pigmentación de la estructura dental, no podían moldearse por lo que no sellaban las paredes del conducto en sus 360°, en ocasiones no lograban llegar al extremo apical, se utilizaban poco en dientes con anatomía irregular, conductos curvos o estrechos (14,15).

El desarrollo de la nanopartículas debe ir acompañado de estudios de toxicidad que permitan conocer los efectos de éstas en la salud humana y en el medio ambiente. Algunos estudios han demostrado que la toxicidad intrínseca de las nanopartículas de plata depende de una serie de factores como el tamaño, forma, área y carga superficial, solubilidad y estado de aglomeración. La exposición humana puede tener lugar a través del aire o por contacto. La Comisión Europea concluye que la toxicidad de la plata en nanopartículas es por lo general baja, no se han identificado efectos adversos claros relacionados con la exposición a la plata, pero es una cuestión que debe examinarse más a fondo ya que es limitada la información (7). Sin embargo, en comparación con otros metales, la plata es menos tóxica para las células humanas si se utiliza en concentraciones bajas. Al

encontrarse en escala nano y tener una concentración baja de plata, tienen poco potencial de pigmentación de la estructura del diente (21).

Los nanomateriales tienen un gran potencial para disminuir la formación del biofilm bacteriano, inhibiendo el proceso de desmineralización (23), es por esto que se ha investigado su posible unión con materiales dentales a los cuales podrían generarles un gran poder antimicrobiano mejorando así las características de éstos, en pro de encontrar la mejor solución para el manejo de las patologías orales del paciente. Dentro de estas patologías, la más estudiada hasta el momento es la caries dental, al incorporar nanopartículas de plata con óxido de zinc y resinas compuestas, se ha logrado una alta actividad antibacteriana sobre el *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*; principales microorganismos presentes en el proceso de la caries dental (24).

Las nanopartículas de plata, con las cuales se trabajará en el presente estudio, han sido incorporadas a diferentes materiales como ionómeros de vidrio (25), resinas compuestas y al Mineral Trióxido Agregado (MTA), al cual se le incorporaron diluyendo la solución de nanopartículas de plata, de 10 nm de diámetro en una concentración de 0,1mg/mL, en 350 μ L de agua estéril, con la cual se prepararía el MTA; logrando así, además de propiedades físicas de resistencia y fuerza, propiedades antibacterianas; mejorando el desempeño del material en los diversos procedimientos odontológicos. Sin embargo, la aplicación de nanopartículas de plata en endodoncia no ha sido suficientemente estudiada (26).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Evaluar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata inmovilizadas en un cemento óxido de zinc eugenol contra *Enterococcus faecalis*, para su potencial uso en tratamientos endodónticos.

3.2 Objetivos específicos:

- 3.2.1 Verificar la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de plata contra *Enterococcus faecalis*.
- 3.2.2 Integrar las nanopartículas de plata sólidas y en suspensión al cemento de óxido de zinc eugenol.
- 3.2.3 Determinar las propiedades morfológicas del cemento de óxido de zinc-eugenol con nanopartículas de plata sólidas y en suspensión.
- 3.2.4 Establecer la capacidad antimicrobiana del cemento de óxido de zinc-eugenol con nanopartículas de plata sólidas y en suspensión.

4 METODOLOGÍA

4.1 Enfoque metodológico:
Cuantitativo, analítico experimental

4.2 Tipo de estudio:
Diseño experimental *in Vitro*

4.3 Población de referencia:
No aplica, estudio *in Vitro*

4.4 Unidad de análisis:
Cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, cultivada en agar Müller-Hinton.

4.5 Diseño muestral:
La muestra será cada uno de los materiales a evaluar. El diseño experimental usado se describe a continuación: Sustrato: cemento con nanopartículas de plata en suspensión y sólidas. Factor: presentación de nanopartículas de plata: sólidas o en suspensión. Grupo control: nanopartículas de plata (en estado sólido y en suspensión), cemento óxido de zinc eugenol, antibiótico (penicilina) y solución salina. Grupo experimental: Cemento óxido de zinc eugenol con nanopartículas de plata en suspensión y sólidas. Se realizan 2 repeticiones (aleatorización) y 5 réplicas (aleatorización).

4.6 Variables:

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO/ESCALA	CODIFICACIÓN
Presentación de las nanopartículas de plata	En suspensión de extracto de guayaba y de tamarillo y sólidas	Cuantitativo/razón	NLG: NPs en suspensión en extracto de guayaba. NLT: NPs en suspensión en extracto de tamarillo. NS: NPs sólidas.
Tiempo	-Período que se demora el material (eugenato-	Cuantitativo/razón: Minutos	

	nanopartículas de plata) en fraguar		
Diámetro del halo	Inhibición o incapacidad de división del microorganismo (debido a la presencia de nanopartículas o por algún otro factor)	Cuantitativo/razón	0: hay inhibición del microorganismo 1: no se inhibe el microorganismo

4.7 Prueba piloto

Teniendo como grupo control el óxido de zinc eugenol, se realizaron aproximadamente 30 pruebas de mezcla del cemento de óxido de zinc eugenol con las nanopartículas de plata, para explorar la compatibilidad entre los materiales, identificar la viabilidad de la mezcla y encontrar las cantidades apropiadas de cada componente para obtener una muestra manejable en las siguientes pruebas y que no alterara las propiedades del material inicial. Estas pruebas se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido para observar la morfología del material y determinar las presentaciones a utilizar en las pruebas siguientes.

4.8 Control de errores y sesgos

Todo el procedimiento fue realizado por un mismo operador, con los mismos instrumentos calibrados y estandarizados según los protocolos del laboratorio de Biomateriales del grupo GIBEC ubicado en la Universidad CES, sede Sabaneta.

Una persona diferente a los participantes de la investigación fue quién miró los diferentes grupos experimentales para evitar conveniencia de los investigadores.

Los grupos experimentales fueron aleatorizados, cada muestra se enumera y se elige al azar por un operador diferente al que las realizó en el momento de comenzar a separar las diferentes muestras.

Se evaluó cada una de las muestras a las 24 horas para observar si existía o no inhibición del microorganismo.

4.9 Procesamiento de la información

Las muestras generadas de cemento de óxido de zinc-eugenol sólo y con nanopartículas de plata, se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido-SEM y espectroscopia infra-roja. Ambas metodologías han sido recomendadas para el análisis de la morfología de los materiales y el análisis cualitativo/cuantitativo de los grupos funcionales respectivamente (27,28). Así, la morfología de las muestras observadas por SEM permitió visualizar en detalle las estructuras internas y la distribución de las nanopartículas dentro del cemento. La espectroscopia infrarroja es un método de absorción o emisión de energía radiante originada por la interacción entre la radiación electromagnética y el material de estudio. Se basa en la posibilidad de rotación de las moléculas y su vibración a distinta frecuencia, una molécula puede absorber la energía mientras ocurre un movimiento vibracional lo que se traduce a una banda específica dentro del equipo determinando el tipo de grupo funcional por el que está compuesto, observando así la presencia o ausencia de nanopartículas inmersas en el material. Por último, se desarrollará un Ensayo Kirby Bauer, también conocido como método de difusión en agar: es un método usado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o un agente químico a partir de la medición de halos de inhibición, establece si la bacteria es: Sensible (S), moderadamente sensible (I) o resistente (R) (29).

5 PLAN DE DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos de este proyecto serán presentados en jornadas de investigación de la Universidad CES, en el Encuentro Latinoamericano de Investigación mediante artículos originales en revistas de indexación internacional.

6 CONSIDERACIONES ÉTICAS

La presente investigación fue desarrollada bajo la norma 8430 del 4 de Octubre de 1993, Título IV - Capítulo I- Investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos. En la cual está clasificada como GRUPO DE RIESGO I: microorganismos que representan escaso riesgo para el individuo y para la comunidad (30).

El proyecto de investigación, cumple con los 4 principios éticos que son: respeto por la autonomía, no maleficencia, beneficencia y justicia. Al ser un estudio en el cual se van a desarrollar nuevos materiales para el uso odontológico, específicamente en el campo de la endodoncia, donde se utilizarán los materiales, equipos de laboratorio y algunos medios de cultivos para evaluar la eficacia antibacteriana contra el *Enterococcus faecalis*; el estudio no tiene pruebas en seres humanos.

Los materiales que se utilizaron para el estudio no tienen ningún riesgo biológico a excepción de las nanopartículas de plata cuyo efecto aún se encuentra en discusión. Se siguió con los protocolos de seguridad establecidos en el Laboratorio de Biomateriales EIA-CES, Sabaneta para su manipulación.

Para el manejo de residuos se tuvieron en cuenta los protocolos de seguridad diseñados por el Instituto Colombiano de Medicina Tropical de la Universidad CES, Sabaneta acerca del manejo de su destino final, vigente para el año en curso para el laboratorio de Biomateriales y Biotecnología del grupo de investigación GIBEC.

Como todas las muestras que se utilizaron se contaminaron e infectaron por la bacteria en estudio, *Enterococcus Faecalis* (medios de cultivos microbiológicos), se consideraron como residuos peligrosos y se depositaron en las canecas rojas del laboratorio.

Este proyecto fue aprobado por el comité de ética y el de investigación de la Universidad CES.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Síntesis de nanopartículas de plata en suspensión y sólidas:

Se siguió el protocolo propuesto en el Laboratorio de Biomateriales (Universidad EIA y Universidad CES, Sabaneta, Antioquia, Colombia), para la fabricación de las nanopartículas de plata sólidas y en suspensión.

Obtención extracto de tamarillo: en una licuadora se trituró y mezcló 0.5 g de tamarillo seco con 50 ml de agua MQ (relación 1:100), luego se llevó la solución a un erlenmeyer de 250 mL y se calentó en plancha con agitación magnética entre 50 y 60°C por 20 min a 250 rpm. La mezcla se llevó a un tubo Falcon de 50 mL, se almacenó a 4°C durante 12 horas, al cabo de las cuales se centrifugó a 9000 rpm por 15 min, se tomó el sobrenadante y se filtró al vacío con papel de poro de 5 µm. Se midió el pH del extracto filtrado y con una solución de hidróxido de sodio se lleva el pH a 7. La solución obtenida se almacenó a 4°C en una nevera convencional.

En un balón volumétrico cubierto con aluminio, se agrega 12,5 mL de Nitrato de Plata (AgNO_3), se termina de llenar con agua des-ionizada hasta 100 mL y se agita manualmente. Se adapta una plancha de agitación y calentamiento en la cabina de extracción. Se introduce un beaker con 300 mL de agua de la llave a un baño termostático (baño María) hasta alcanzar un rango de temperatura de 60 a 70° C. Una vez que el agua presente la temperatura adecuada, se debe modificar el pH del extracto de tamarillo a 7 con NaOH. Después de que el agua alcance el rango de temperatura, se toma un Erlenmeyer y se adiciona AgNO_3 con agua des-ionizada y extracto de tamarillo en una relación 3:1 a un pH de 7. Se agita con un magneto a 300 rpm y se deja bajo estas condiciones por una hora para que se lleve a cabo la reacción. Se observa el cambio de color en la solución el cual con el transcurso del tiempo, pasa de un color dorado a un color marrón, lo que indica presencia de nanopartículas de plata en la solución ([Figura 1](#)~~Figura-1~~). Al finalizar la reacción, se debe medir el pH de las soluciones y la temperatura. Se enfriaron

las soluciones en un baño de hielo y se envasaron en frascos de almacenamiento recubiertos con papel aluminio previo a su refrigeración a 4°C en una nevera convencional.

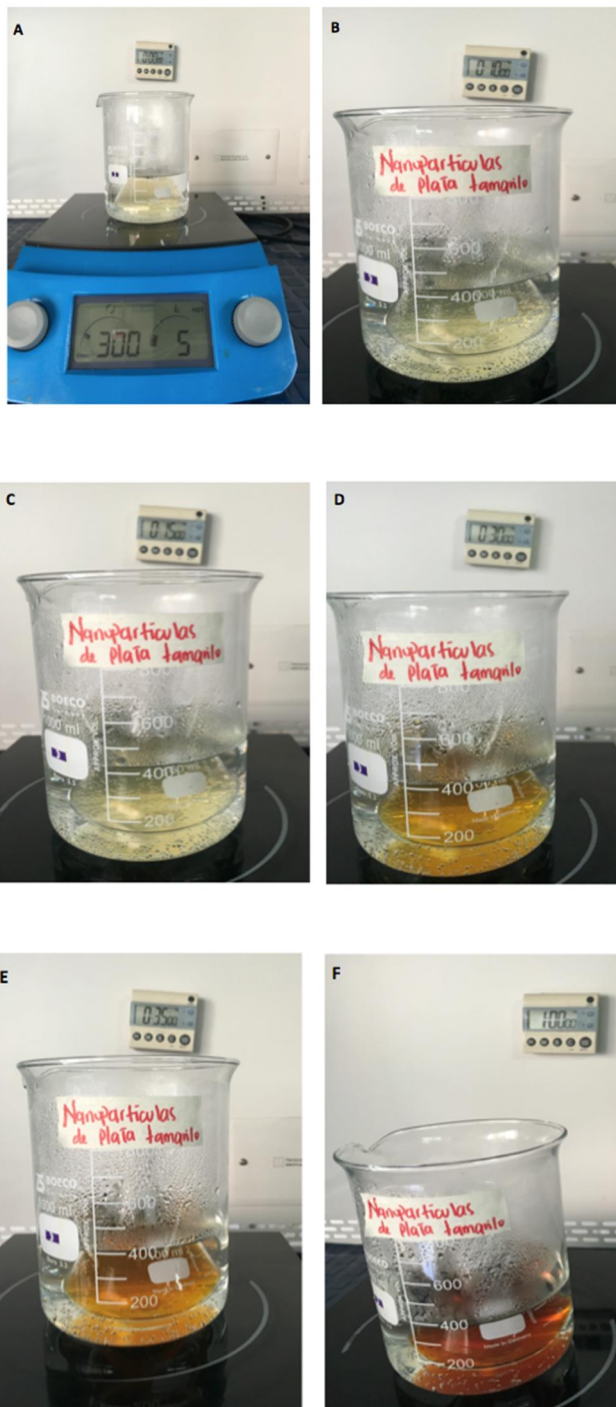




Figura 1 (A-G): Cambio de color de la solución en el transcurso del tiempo. (A)Tiempo 0: comienzo de la reacción (B) 10 minutos (C) 15 minutos (D) 30 minutos (E) 35 minutos (F) 1 hora (G) Resultado final obtenido. Se observa el paso de un color dorado a un color marrón

Para obtener un sólido de las nanopartículas de plata sólidas, se tomó 1,5 mL de la solución que ya contiene las nanopartículas en suspensión y se colocaron a liofilizar en liofilizador (ADP-3-XL-E-V-A-X, Londres, United Kingdom) Para preparar las nanopartículas usando el extracto de guayaba se sigue el mismo procedimiento descrito previamente .

7.2 Espectroscopía UV-visible

Mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 Thermo Scientific (Wilmington, Estados Unidos) se realizó un análisis de absorbancia entre 190 y 840 nm. Se colocó 1µl de cada muestra en el pedestal del equipo para realizar el análisis (Figura 2 y 3).

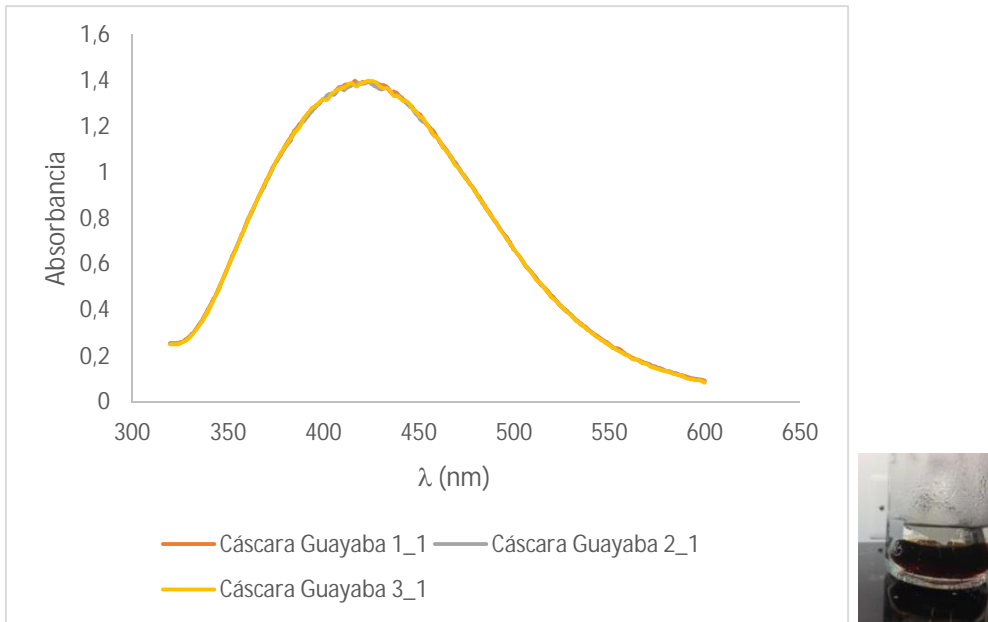


Figura 2: Espectro UV-vis de nanopartículas de plata obtenidas con extracto de guayaba

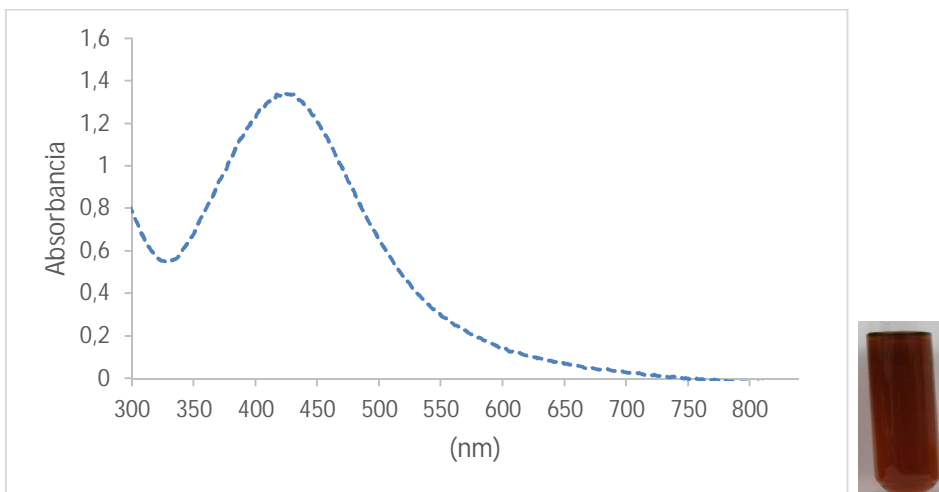


Figura 3: Espectro UV-vis de nanopartículas de plata obtenidas con extracto de tamarillo

En las figuras 2 y 3 se observa el resultado del análisis de UV-Visible para las dos soluciones de nanopartículas obtenidas a partir de los extractos vegetales de guayaba y tamarillo. El pico máximo de absorbancia se da alrededor de 418nm para solución guayaba y 440nm para la solución tamarillo. Estos picos son característicos de la presencia de nanopartículas de plata y se explican por el

fenómeno de los plasmones de superficie que se generan en la interacción de nanopartículas metálicas con el campo electromagnético de la luz. Como se muestra en las Figuras 2 y 3 (derecha), el color final de las soluciones de nanopartículas después de proceso de síntesis es rojo ocre oscuro, de acuerdo al espectro de absorbancia las soluciones de nanopartículas se tornan de colores diferentes, los picos de absorbancia alrededor de 450nm son propios de la gama de amarillos (31,32). En ningún momento se observó sedimentación o agregación de las nanopartículas, mostrando que este sistema es estable por lo menos durante el período de trabajo (un mes).

7.3 Estandarización en la mezcla de óxido de zinc eugenol:

Teniendo en cuenta que en la actualidad el cemento de óxido de zinc eugenol utilizado para este estudio, cemento de Grossfar (Bogotá, Colombia), no presenta indicaciones en cuanto a la manera correcta de ser manipulado y que su presentación comercial no especifica la proporción determinada, correcta y exacta para su manipulación, se debe tener en cuenta que siempre se pueden emplear proporciones variables con la desventaja de poder obtener cambios en las propiedades del material, lo que hace necesario la estandarización de la proporción polvo/líquido de la mezcla a generar para poder garantizar homogeneidad de la muestra, además de tener la certeza de estar utilizando siempre la misma cantidad tanto de polvo como de líquido en todas las muestras a generar. Se realiza entonces la estandarización de la proporción polvo/líquido de la siguiente manera: un único operador es el encargado de realizar todas las muestras desde que se comienza con la prueba hasta el final. En una cabina de extracción (ESCO Serie E Changi, Singapore) a temperatura y humedad ambiente se realizó, inicialmente, en una loseta de vidrio y con una espátula de metal, una mezcla de 1 gota de líquido (eugenol) y 0,46 g de polvo (óxido de zinc), hasta obtener una consistencia en gota con una superficie brillante (Figura 4).

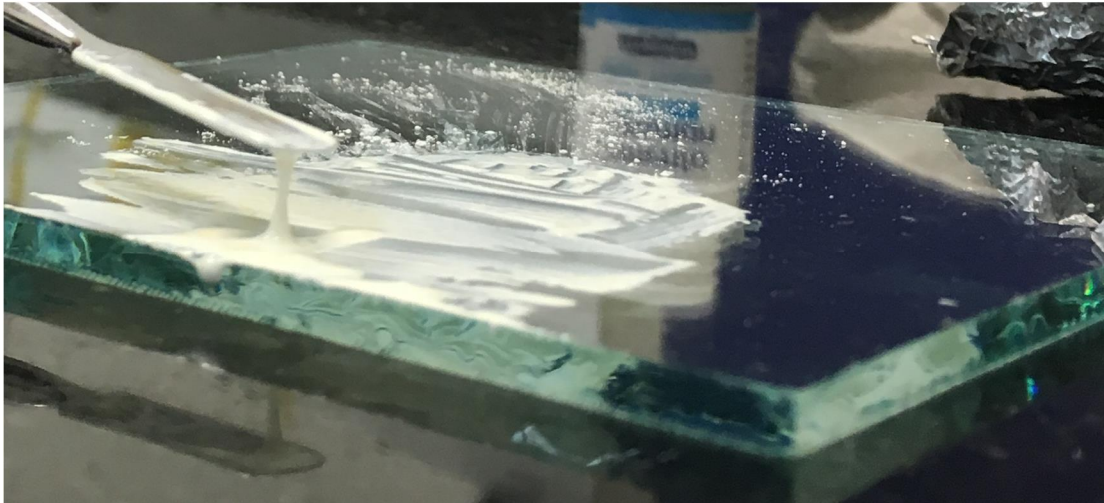


Figura 4 : Consistencia en gota de la preparación óxido de zinc eugenol.

Una vez obtenida la mezcla, se ponen las muestras en un portaobjetos, por triplicado, (Figura 5) y se montan a una plancha calentadora (BOECO MSH 130- Massachusetts, Estados Unidos) a 35°C, queriendo simular las condiciones de la boca. Con un cronómetro se toma el tiempo de fraguado, que corresponde al tiempo que transcurre una vez se realiza la mezcla hasta que el material endurece completamente, en este experimento se encontró que el material se tardó en fraguar 6 horas.



Figura 5 : Mezcla de óxido de zinc-eugenol T1 por triplicado en portaobjetos.

Una vez obtenidas las cantidades de polvo y líquido, usando una balanza analítica y en una micropipeta (20-200 μL) respectivamente, se realiza nuevamente la mezcla por triplicado usando las mismas condiciones descritas previamente, donde se observaron las mismas características de la mezcla incluyendo el mismo tiempo de fraguado. Así quedan determinadas lo que se determina la estandarización de la proporción polvo/líquido de la siguiente manera 0,2301g/30 μL . Cuando se obtiene la medida individual, se realiza la mezcla duplicando y triplicando la cantidad de polvo y líquido, cada una tres veces (total de muestras generadas: 9), para observar que el comportamiento del material no cambie y el tiempo de fraguado sea el mismo garantizando que al mantener las mismas proporciones se obtiene el mismo efecto.

Se realiza repetición del experimento en 3 días diferentes, en cabina de extracción, a 35°C de temperatura y humedad ambiental. Se concluye finalmente, que no existe ningún tipo de cambio en las características del material y que el tiempo de fraguado es el mismo, 6 horas.

7.4 Generación del material integrado: óxido de zinc eugenol con nanopartículas de plata sólidas y en suspensión

Se realizaron todas las pruebas en la cabina de extracción (ESCO Serie E Changi, Singapore) a una temperatura de 21,6 °C y humedad relativa de 65%. Una vez realizada la mezcla de nanopartículas de plata con el óxido de zinc eugenol se contabilizó el tiempo para determinar cuál es el tiempo de fraguado de cada una de ellas. Cada muestra se realizó por triplicado. Posteriormente, se montan a un portaobjetos y se marcan. Se introducen en horno a 36°C para su secado (Figura 6, Figura 7).

Nomenclatura de las muestras:

T1: Óxido de zinc mezclado con eugenol

Polvo: 0,4602 g de óxido de zinc

Líquido: 60 μ L de eugenol

Tiempo de fraguado: 4 horas 45 minutos

T2: óxido de zinc con eugenol + nanopartículas en suspensión

Polvo: 0,4602 g de óxido de zinc

Líquido: 60 μ L de eugenol

Nanopartículas de plata en suspensión: 80 μ L

Se mezcla inicialmente el óxido de zinc-eugenol (según indicaciones del fabricante) y posteriormente se adicionan 80 μ L de la dispersión de nanopartículas de plata en suspensión hasta obtener una mezcla homogénea.

Tiempo de fraguado: 4 horas 35 minutos

T3: óxido de zinc con eugenol + nanopartículas liofilizadas

Polvo: 0,4602 g de óxido de zinc

Líquido: 60 μ L de eugenol

Nanopartículas de plata liofilizadas: se liofiliza 1,5mL de las nanopartículas en suspensión para posteriormente obtener las nanopartículas sólidas, 1,5 mL de nanopartículas en suspensión equivalen aproximadamente a 0,0127g.

Se mezcla inicialmente el óxido de zinc con eugenol (según indicaciones del fabricante) y posteriormente se introducen las nanopartículas de plata sólidas realizando la mezcla hasta que quede homogénea.

Tiempo de fraguado: 4 horas 25 minutos

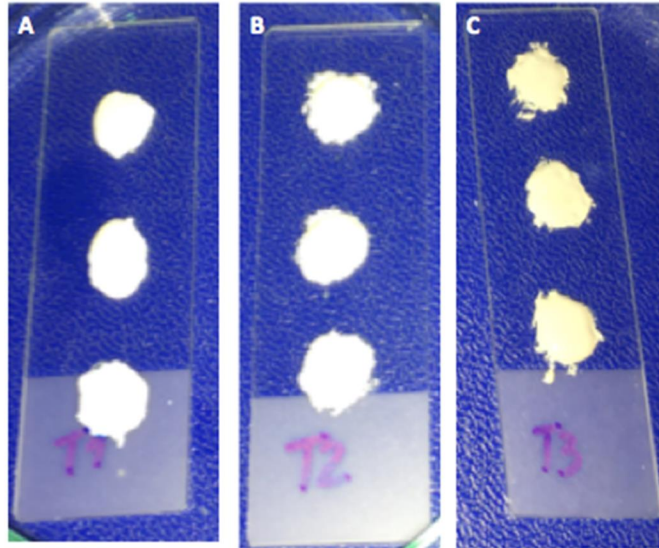


Figura 6 (A-C): Muestras finales en portaobjetos (A) T1: Mezcla de óxido de zinc eugenol. (B) T2: Mezcla de óxido de zinc eugenol + Nanopartículas de plata en suspensión. (C) T3: Mezcla de óxido de zinc eugenol + Nanopartículas de plata sólidas. Físicamente todas las muestras se observaban igual, el único cambio observado es el cambio de color, T3 se observa un poco más amarilla que las demás.



Figura 7 : Muestras en el horno a una T° de 36°C.

Se concluye en esta primera parte del proyecto que las nanopartículas intergradadas al material óxido de zinc-eugenol, en condiciones similares a las que se encuentran en la boca, no alteran las propiedades del material.

7.5 Caracterización del material integrado: óxido de zinc eugenol con nanopartículas de plata sólidas y en suspensión:

Con las muestras fraguadas, se procede a realizar la caracterización del material para asegurar que las nanopartículas se encuentren inmersas dentro de la mezcla de óxido de zinc con el eugenol y estén distribuidas en él, de manera homogénea.

La caracterización se realiza mediante el análisis de las muestras con microscopía electrónica de barrido y espectroscopía infrarroja, con la primera se determina la morfología del material y la distribución de las nanopartículas de plata en éste y con la segunda, los grupos funcionales presentes en las muestras.

8 RESULTADOS

8.1 Microscopía electrónica de barrido - SEM:

Las muestras delgadas se fijaron en una cinta de grafito y se recubrieron con una capa delgada en oro (Figura 8) (Denton Vacuum Desk IV, Beijing, China) con el fin de que sea una muestra conductora (Figura 8). Posteriormente, las muestras son analizadas en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM 6490 LV, Beijing, China) en alto vacío para obtener imágenes de alta resolución a aumentos de 20um, 3000x. Se empleó un detector de electrones secundarios (Denton Vacuum Desk IV, Beijing, China) para evaluar morfología y topografía de las muestras.

En la Figura 9A se presenta la micrografía SEM del óxido de zinc con el eugenol tomada a 3000x donde se observa una superficie rugosa con aparente presencia de aglomeraciones parecidas a granos y sin presencia de fisuras en la superficie

En la Figura 9B se presenta la micrografía SEM del óxido de zinc con eugenol + nanopartículas en suspensión tomada a 3000x, donde se observa una superficie rugosa con presencia de nanopartículas visibles de diversos tamaños (aproximadamente entre 0,1 y 1 μm) y formas muy similares en toda el área de la muestra por lo que se esperaría que al estar distribuidas más homogéneamente sean más efectivas en el proceso de inhibición bacteriana.

En la Figura 9C se presenta la micrografía SEM del óxido de zinc con eugenol + nanopartículas sólidas tomada a 3000x, no se observan nanopartículas sólidas distribuidas en toda el área de la muestra lo que puede deberse al método manual de mezclado de las nanopartículas que no permitió una distribución homogénea de ellas en el sistema ya que desde su preparación las nanopartículas no estaba agregadas ni precipitadas Figura 2, Figura 3.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se puede observar que las nanopartículas de plata se integran al sistema óxido de zinc eugenol tanto en forma sólida como en forma líquida manteniendo su apariencia física.



Figura 8 : Muestras cubiertas en oro para ser estudiadas en SEM. T1: Muestra de óxido de zinc eugenol. T2: Muestra de óxido de zinc eugenol con nanopartículas de plata en suspensión, T3: Muestra de óxido de zinc eugenol con nanopartículas de plata sólidas.

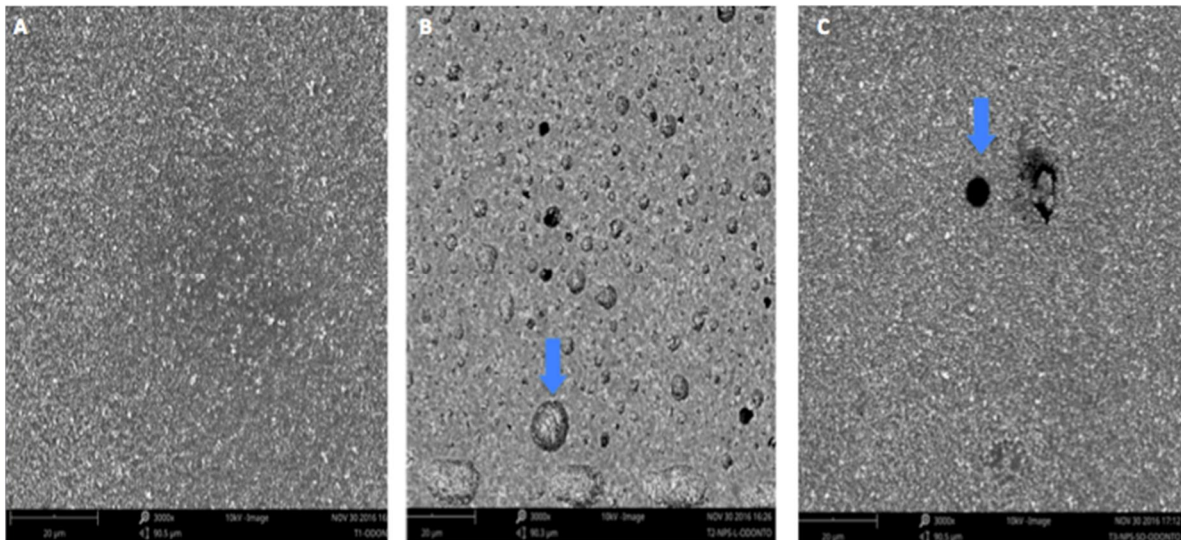


Figura 9 (A-C): Imágenes obtenidas del SEM en 20um, 3000x. (A) Óxido de zinc eugenol observado (B) Óxido de zinc eugenol + nanopartículas en suspensión observadas. La flecha señala la presencia de nanopartículas de plata en el material. (C) Óxido de zinc eugenol + nanopartículas sólidas. La flecha señala la presencia de nanopartículas de plata sólidas inmersas en el material.

8.2 Espectroscopía infraroja transformada de Fourier-FTIR

Los espectros FTIR de las muestras fabricadas se midieron en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Spectrum 100, Beaconsfield, United Kingdom). Las muestras se evaluaron en presentación en forma de polvo en un promedio de 32 exploraciones en el rango de número de onda estándar de 4000-550 cm^{-1} a una resolución de 4 cm^{-1} . Los resultados se muestran en la (Figura 10,11 y 12).

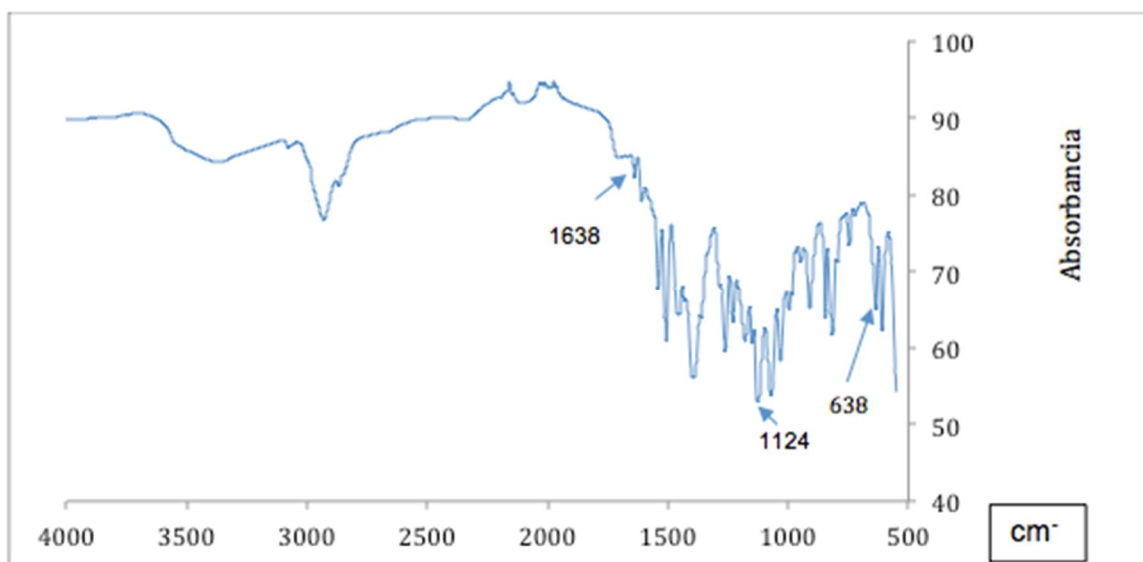


Figura 10 : FTIR de óxido de zinc eugenol.

Las bandas representativas son lo siguientes:

1641 cm^{-1} y 620: tensiones y vibraciones de deformación del óxido de zinc y el eugenol respectivamente.

1205 cm^{-1} - OH (deformación plana) del óxido de zinc.

1124 - OH Tensión debida principalmente a la absorción de agua del óxido de zinc.

1035 cm^{-1} C-H vibración de tensión del anillo de benzeno del óxido de zinc (33).

420- 480 Vibración de tensión del eugenol (34).

Los resultados exhiben las mismas bandas que las muestra de referencia de óxido de zinc eugenol sólo (bandas 1641 óxido de zinc y 620 eugenol) (33,34)

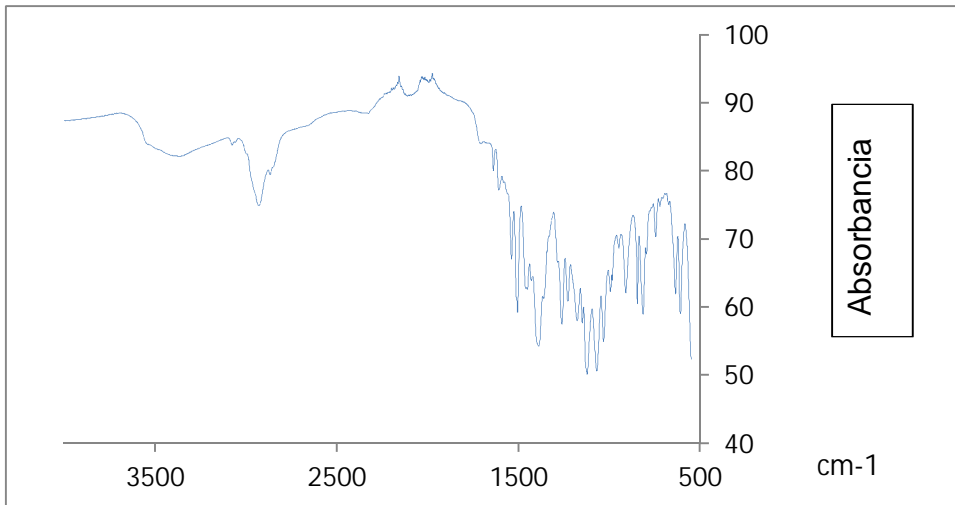


Figura 11 : FTIR de óxido de zinc eugenol con nanopartículas de plata en suspensión.

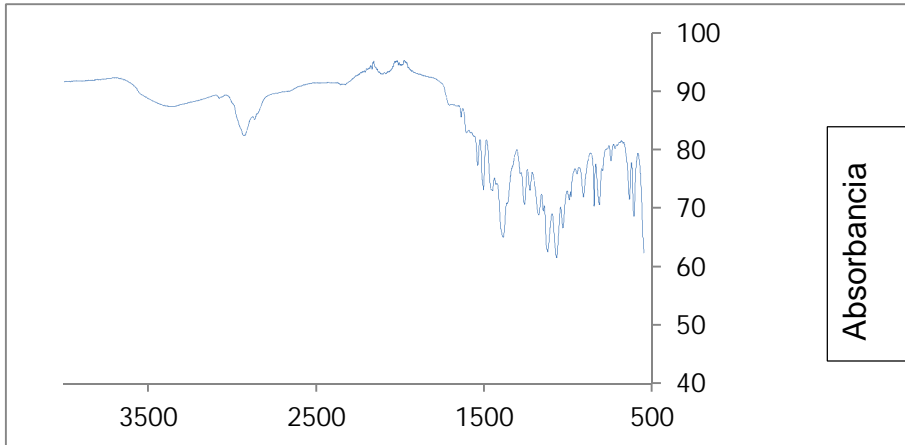


Figura 12 : FTIR de óxido de zinc eugenol con nanopartículas de plata sólidas.

En las figuras 11 y 12, las bandas en 1638 cm^{-1} óxido de zinc y 638 cm^{-1} eugenol aparecen desplazadas, lo que indica que la presencia de dichas nanopartículas afectó las posiciones de estos grupos. Se puede concluir que en el material creado hay presencia de nanopartículas de plata tanto las que se encontraban en suspensión como las sólidas.

8.3 Realización de prueba Kirby-Bauer

Se realizó Ensayo de Kirby-Bauer, siguiendo el protocolo del laboratorio de Biomateriales del Convenio CES-EIA (29).

La cepa ATCC 29212 de *E. faecalis* se activó en agar sangre. Se diluyeron 3 colonias en medio infusión cerebro corazón (BHI), quedando en una concentración equivalente al patrón 0,5 de Mac Farland (35). Se prepararon los platos de agar Müeller-Hinton (MH) suministrado por Instituto Colombiano de Medicina Tropical (Universidad CES, Sabaneta, Antioquia Colombia).

Se realizó la inoculación de las placas de agar Müeller Hinton en la superficie mediante hisopo de algodón estéril impregnado en la solución del microorganismo, se distribuyó en forma homogénea (también conocida como trapeado) rotando la caja de Petri 60° cada vez que se complete un patrón (por un total de 3 veces) sobre toda la superficie del agar. Esto se realizó en el número de cajas necesarias para cada una de las muestras y repeticiones realizadas.

Una vez inoculadas las cajas para cada uno de los montajes, se realiza en 3 momentos de la siguiente manera:

En 5 cajas de Petri inoculadas con el microorganismo *E. faecalis*, se realiza el montaje de las muestras de la siguiente manera [Tabla 1](#)~~Tabla-4~~:

Tabla 1: Prueba Kirby- Bauer primera repetición (Anexo 1 5).

CAJA	NOMENCLATURA	MUESTRA	UBICACIÓN
1	T1 (x 4)	Óxido de Zinc Eugenol	Todas
2	T1 (x 1)	Óxido de Zinc Eugenol	Superior Derecha
	T2 (x 3)	Óxido de Zinc Eugenol con nanopartículas de plata en suspensión	Superior Izquierda, Inferior
3	T2 (x 2)	Óxido de Zinc Eugenol con nanopartículas de plata en suspensión	Superior
	T3 (x 2)	Nanopartículas de plata en suspensión	Inferior

4	T3 (x 3)	Nanopartículas de plata en suspensión	Todas
5	CP (x 1)	Control Positivo (Penicilina G)	Superior
	CN (x 1)	Control Negativo (Solución Salina)	Inferior

A las 24 horas siguientes se procede a realizar la lectura de las cajas.

Al evaluar esta primera repetición, y ver que los halos de inhibición que estuvieron presentes y fueron tan similares se decide montar un nuevo experimento introduciendo las nanopartículas en suspensión de extracto de guayaba y de extracto de tamarillo, además de nanopartículas en forma sólida inoculadas en el cemento óxido de zinc eugenol.

Con el microorganismo ya inoculado en las cajas de Petri con el agar Müeller Hinton, se procede a colocar las muestras de la siguiente manera [Tabla 2](#), 3 y 4:

Tabla 2: Prueba Kiiirby - Bauer controles y óxido de zinc eugenol para repeticiones 2 y 3 (Anexo 6-7).

CAJA	NOMENCLATURA	MUESTRA	UBICACIÓN
Óxido de Zinc Eugenol	T1 (x 5)	Óxido de Zinc Eugenol	Todas
Controles	CP (x 1)	Control Positivo (Penicilina G)	Superior
	CN (x 1)	Control Negativo (Solución Salina)	Inferior

Se realizan dos repeticiones de las muestras del óxido de zinc-eugenol con las nanopartículas de plata inoculadas: nanopartículas sintetizadas con extracto de tamarillo, de extracto de guayaba y sólidas.

Repetición 2

Tabla 3: Prueba Kirby - Bauer Segunda Repetición (Anexos 8-11).

CAJA	NOMENCLATURA	MUESTRA	UBICACIÓN
1	ONT (x 5)	Óxido de Zinc Eugenol con nanopartículas de plata en suspensión en extracto de tamarillo	Superior, medio e inferior izquierda
	ONG (x 1)	Óxido de Zinc Eugenol con nanopartículas de plata en suspensión en extracto de guayaba	Inferior derecha
2	ONG (x 4)	Óxido de Zinc Eugenol con nanopartículas de plata en suspensión en extracto de guayaba	Superior y medio
	ONS (x 2)	Óxido de Zinc Eugenol con nanopartículas de plata sólidas	Inferior
3	ONS (x 3)	Óxido de Zinc Eugenol con nanopartículas de plata sólidas	Superior y medio izquierda
	NLG(x 3)	Nanopartículas de plata en suspensión en extracto de guayaba	Medio derecha e inferior
4	NLG (x 2)	Nanopartículas de plata en suspensión en extracto de guayaba	Superior
	NLT(x 5)	Nanopartículas de plata en suspensión en extracto de tamarillo	Medio e inferiores

Repetición 3

Tabla 4: Prueba Kirby - Bauer Tercera Repetición (Anexos 12-15).

CAJA	NOMENCLATURA	MUESTRA	UBICACIÓN
1	ONT (x 5)	Óxido de Zinc Eugenol con nanopartículas de plata en suspensión	Superior, medio e inferior izquierda

		en extracto de tamarillo	
	ONG (x 1)	Óxido de Zinc Eugenol con nanopartículas de plata en suspensión en extracto de guayaba	Inferior derecha
2	ONG (x 4)	Óxido de Zinc Eugenol con nanopartículas de plata en suspensión en extracto de guayaba	Superior y medio
	ONS (x 2)	Óxido de Zinc Eugenol con nanopartículas de plata sólidas	Inferior
3	ONS (x 3)	Óxido de Zinc Eugenol con nanopartículas de plata sólidas	Superior y medio izquierda
	NLG(x 3)	Nanopartículas de plata en suspensión en extracto de guayaba	Medio derecha e inferior
4	NLG (x 2)	Nanopartículas de plata en suspensión en extracto de guayaba	Superior
	NLT(x 5)	Nanopartículas de plata en suspensión en extracto de tamarillo	Medio e inferiores

Las muestras fueron revisadas y evaluadas, a las 24 horas

~~Tabla~~ ~~5~~ ~~Tabla~~ ~~5~~,

~~Figura 13~~ ~~Figura 13~~ . (Anexos 7-15)

Transcurridas las 24 horas de incubación, se realizan los análisis respectivos, se procede a desechar las cajas con los agares y las muestras según el protocolo del Instituto Colombiano de Medicina Tropical.

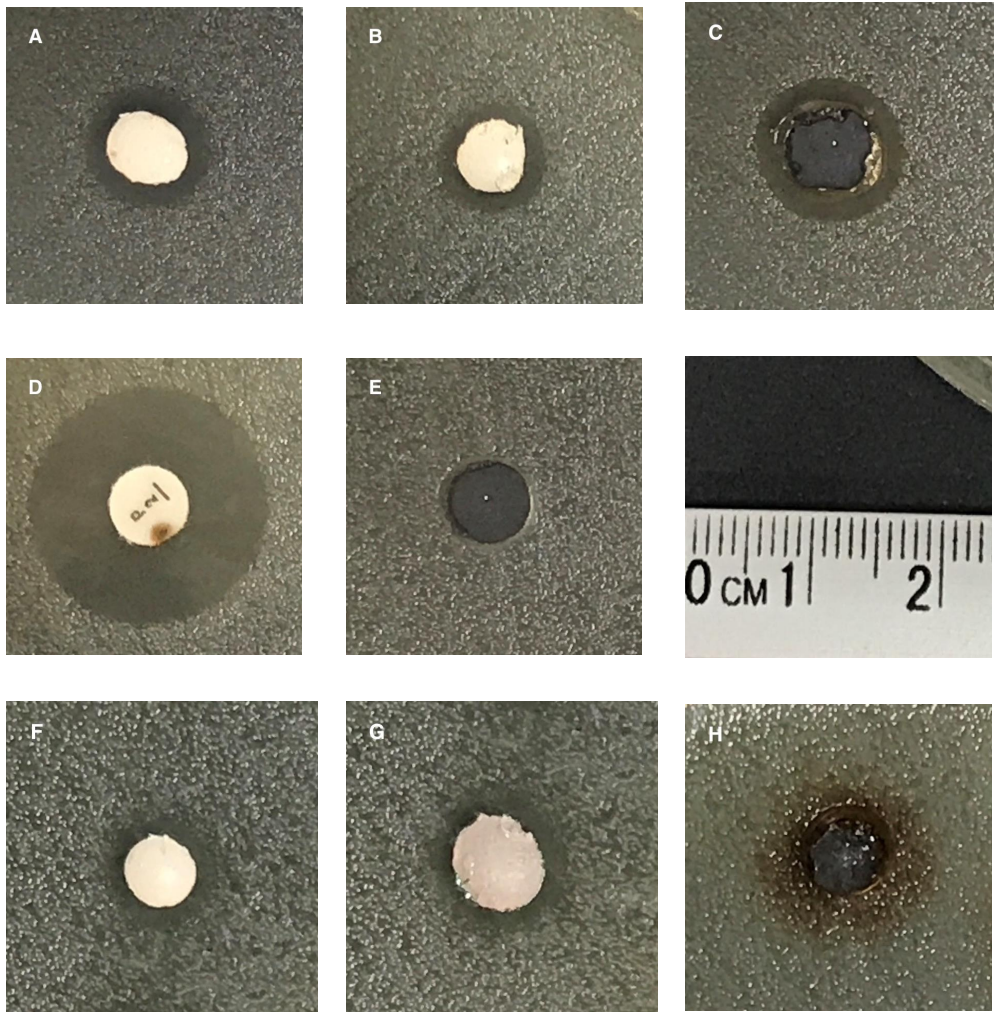


Figura 13 (A-C): Halos de Inhibición: (A) Óxido de Zinc Eugenol (B) Óxido de zinc eugenol con nanopartículas de plata en extracto de tamarillo (C) Nanopartículas de plata en suspensión en extracto de tamarillo (D) Control positivo, Penicilina G (E) Control negativo, solución salina (F) Óxido de zinc eugenol con nanopartículas en suspensión en extracto de guayaba (G) Óxido de zinc eugenol con nanopartículas sólidas (H) Nanopartículas en suspensión en extracto de guayaba

Muestra	Promedio halo (m)
CP	7838,90
CN	4973,90
T1	4313,22

T2	3850,15
T3	5616,99
ONT	4137,10
ONG	4366,58
ONS	4528,80
NLG	7257,09
NLT	4896,08

Tabla 5: Promedios medición de halos. CP control positivo, CN control negativo, T1 Óxido de zinc eugenol, T2 Óxido de zinc eugenol nanopartículas de plata, T3 Nanopartículas de plata en suspensión, ONT Óxido de zinc eugenol nanopartículas de plata en suspensión en extracto de tamarillo, ONG Óxido de zinc eugenol nanopartículas de plata en suspensión en extracto de guayaba, ONS Óxido de zinc eugenol nanopartículas de plata sólidas, NLG Nanopartículas de plata en suspensión en extracto de guayaba, NLT Nanopartículas de plata en suspensión en extracto de tamarillo.

Con los datos obtenidos en las mediciones de los halos, y mediante el uso del programa estadístico Stata, se realiza la codificación de la siguiente manera:

1. ONT: Óxido de zinc eugenol con nanopartículas de plata extracto de tamarillo.
2. ONG: Óxido de zinc eugenol con nanopartículas de plata extracto de guayaba.
3. ONS: Óxido de zinc eugenol con nanopartículas de plata sólidas.
4. NLG: Nanopartículas de plata en suspensión de extracto de tamarillo.
5. NLT: Nanopartículas de plata en suspensión de extracto de guayaba.
6. CP: Control positivo (Penicilina).
7. CN: Control negativo (Solución salina).

8.4 Análisis estadístico

Se realiza la prueba Shapiro France, para observar la normalidad en la distribución de los datos, para la prueba 2 ($p=0.00060$) y 3 ($p=0.00040$). En ambas se rechaza la hipótesis de normalidad en la distribución de los datos, por lo cual se corre una prueba de Kruskal-Wallis, en ésta se observa que hay un rechazo en la hipótesis

($p=0.0045$ y $p=0.0345$), al menos uno de los grupos presenta diferencia significativa con los demás. En ambas pruebas se observa que el grupo 4 (NLG), presentan una suma de rangos muy superior a las demás. Por lo cual se realiza una Anova, con la prueba de Shaffe, para observar las diferencias entre los diferentes grupos. Se encuentra que en la prueba 2, el grupo de las nanopartículas en suspensión en extracto de guayaba (grupo 4) presentan diferencia significativa con cada uno de los otros grupos; sin embargo, en la prueba 3, esta diferencia se da con todos los grupos, excepto con el grupo de nanopartículas en suspensión de extracto de tamarillo (grupo 5), en el cual aunque se observa una diferencia alta entre los promedios, ésta no es significativa.

9 DISCUSIÓN

El tiempo de fraguado es el tiempo necesario para que el sellador consiga sus propiedades definitivas. Depende de los componentes, tamaño de partícula, temperatura ambiente y humedad relativa (36,37). No hay un tiempo estándar establecido para los cementos selladores pero debe ser lo suficientemente largo para permitir su colocación y ajuste como material de relleno dentro del conducto radicular (38). Según el fabricante: el cemento a base de óxido de zinc- eugenol endurece extraoralmente a las 2 horas a 37°C y 100% de humedad, sin embargo el tiempo de fraguado preciso depende de la técnica de manipulación, consistencia, grado de humedad y de temperatura, sequedad de la loseta de vidrio, mezcladora y espátula (39). Según lo encontrado en este estudio, cuando se realizaron todas las muestras, incluyendo el grupo control del óxido de zinc-eugenol, y se comparan los tiempos de trabajo con las muestras con nanopartículas de plata no hubo diferencias significativas en el tiempo de fraguado, por lo cual se considera que no hay un cambio en el tiempo final de la preparación y que esta variable no se ve afectada en el momento de su fabricación pero cuando se comparan los tiempos del estudio con lo que relata la literatura, 2 horas, se observa que hay un aumento en el tiempo de fraguado en el cemento creado, que fue de 4 horas y 35 minutos para la muestra de óxido de zinc-eugenol y nanopartículas en suspensión y 4 horas 25 minutos para la muestra de óxido de zinc- eugenol y nanopartículas sólidas, este cambio puede deberse a la técnica de manipulación, consistencia, grado de humedad y de temperatura, humedad de la loseta de vidrio y espátula, lo cual no es significativo.

Las muestras generadas de cemento de óxido de zinc-eugenol sólo y con nanopartículas de plata, se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido-SEM y espectrometría de infra-rojo. El SEM ha sido recomendado para el análisis de la morfología de los materiales y observar en detalle las estructuras internas y la distribución de las nanopartículas dentro del cemento (27,28). Las morfologías encontradas en nuestro estudio para el cemento de óxido de zinc-eugenol, son similares a las reportadas por Bayne SC y colaboradores quienes en

1985 inspeccionaron a través del SEM este compuesto y determinaron sus características morfológicas (40), estos resultados fueron confirmados por D. Gaspar y colaboradores en 2017 (41) por lo que se puede concluir que el cemento fabricado tiene características morfológicas similares a las del cemento que se utiliza en los reportes de la literatura, por lo que se espera que tenga sus mismas propiedades.

La espectrometría infraroja permite realizar análisis cualitativo/cuantitativo de los grupos funcionales en cada uno de los especímenes, es un método de absorción o emisión de energía radiante originada por la interacción entre la radiación electromagnética y el material de estudio. Se basa en la posibilidad de rotación de las moléculas y su vibración a distinta frecuencia, una molécula puede absorber la energía mientras ocurre un movimiento vibracional lo que se traduce a una banda específica dentro del equipo determinando el tipo de grupo funcional por el que está compuesto, observando así la presencia o ausencia de nanopartículas inmersas en el material (28). En este estudio se utilizó la espectrometría infraroja en la realización de la caracterización del material, únicamente, para analizar si las nanopartículas de plata estaban realmente inmersas en el material creado a partir de un análisis de los grupos funcionales y de sus posiciones. Los resultados exhiben las mismas bandas que las muestra de referencia de óxido de zinc eugenol sólo (bandas 1641 óxido de zinc y 620 eugenol). Se pueden observar estas bandas desplazadas (1638 óxido de zinc y 638 eugenol) lo cual es causado por la presencia de un material diferente dentro del compuesto, en este caso las nanopartículas de plata dentro de la muestra. Se puede concluir que en el material creado hay presencia de nanopartículas de plata tanto las que se encontraban en suspensión como las sólidas. Es importante resaltar que ésta es una primera aproximación a la creación de un material y sus implicaciones clínicas serían objetivos de estudios posteriores.

El *Enterococcus faecalis* fue usado en este estudio debido a que es uno de los microorganismos más resistentes y está asociado en gran porcentaje a los fracasos endodónticos (42). Es un microorganismo capaz de evadir los sistemas

de desinfección convencionales en endodoncia, localizándose en ramificaciones del conducto y en túbulos dentinarios. Una alta fluidez y penetración de un cemento sellador con propiedades antibacterianas, son ideales para eliminar estos microorganismos (43). El óxido de zinc eugenol es ampliamente utilizado como cemento sellador en la obturación endodóntica (44). En este estudio, este cemento mostró inhibición de crecimiento bacteriano, logrando un halo de inhibición en todas las muestras evaluadas (promedio 4313,22 μm); lo cual fue comparable con otro estudio, en el cual mediante la prueba de difusión en agar probaron la actividad antibacteriana de 3 selladores endodónticos contra el *E. Faecalis*, dando como resultado que todos presentaban inhibición de este microorganismo (45).

La plata es conocida como un agente antimicrobiano, que al ser reducida a una escala nanométrica aumenta su potencial bactericida (46). Los halos observados en el presente estudio comprueban la acción antimicrobiana que poseen las nanopartículas de plata, en este caso contra el *E. faecalis*. similar a lo encontrado por Wu y colaboradores (47), donde el microorganismo fue eliminado al estar en contacto durante 7 días con el gel de nanopartículas de plata, utilizado como medicación intraconducto. Diferente a lo encontrado cuando se utiliza como agente irrigante donde permanece en contacto con el microorganismo únicamente por 2 minutos. No se generó ningún cambio significativo en el biofilm. Los autores concluyen que para que exista una adecuada eliminación del microorganismo, se requiere de un tiempo mínimo de contacto entre éste y las nanopartículas de plata. Aunque en nuestro estudio no se realizó un seguimiento de tantos días, se observa que a las 24 horas de contacto entre el microorganismo y las nanopartículas de plata en suspensión existe un halo de mayor tamaño; pero diferente cuando se utiliza el extracto de guayaba (promedio de 7552,94 μm) y el de tamarillo (promedio 4972,63 μm), diferencias que fueron estadísticamente significativas en la prueba 2, pero no significativas en la prueba 3. Lo cual pudo ser ocasionado por variables humanas que se salen de control. Observando las diferencias que presentan los halos de inhibición de estas muestras, se observa que la diferencia de tamaños es de 2580,31 μm , lo cual no es relevante para una

prueba de este tipo ya que sí existe un efecto de inhibición de la bacteria que es realmente el objetivo que se tiene.

Un estudio similar realizado por Hahgoo y colaboradores demostró que no existe diferencia significativa en la capacidad antibacteriana contra el *E. Faecalis*, entre el cemento de óxido de zinc-eugenol mezclado con nanopartículas de plata en diferentes concentraciones (0.5, 2 y 5%) y el cemento original (44). En nuestro estudio, se observa que la combinación de nanopartículas de plata con cemento óxido de zinc-eugenol produce inhibición del microorganismo independientemente si las nanopartículas se encuentran en presentación sólida o en suspensión. El halo de inhibición es menor en las muestras que contienen cemento de óxido de zinc-eugenol con nanopartículas en suspensión con respecto a las muestras con cemento de óxido de zinc-eugenol y nanopartículas sólidas, pero sus promedios no son estadísticamente significativos. Las nanopartículas en suspensión tienen mayor grado de difusión en el agar permitiendo que la inhibición sea mayor cuando se encuentran solas, pero al unir las con el cemento de óxido de zinc-eugenol, tienen una trayectoria más amplia que recorrer para su proceso de difusión, por lo que su efecto se observa disminuido y no permite formación de un halo de inhibición más amplio. Las nanopartículas de plata en presentación sólida al ser mezcladas con el óxido de zinc-eugenol, aparentemente logran estar más cerca de la superficie del compuesto permitiendo que su difusión sea mayor y por ende muestren un mayor promedio en los halos de inhibición. Aparentemente la mejor actividad antimicrobiana se da en la unión del óxido de zinc-eugenol y las nanopartículas en estado sólido. La obtención de las nanopartículas sólidas requiere de un proceso adicional de liofilización o secado, que es muy demandante tanto en tiempo como en equipamiento y la cantidad que se obtiene es muy limitada, lo que hace el proceso muy costoso y poco práctico de aplicar.

Las nanopartículas de plata han sido utilizadas como desinfectantes del conducto radicular en forma de suspensión, gel y mezcladas con otros materiales, para lograr una erradicación de los posibles microorganismos que quedan presentes en

el conducto pos tratamiento; sin embargo lo que se buscó con este estudio fue permitir que las nanopartículas de plata al estar inmersas en el cemento de óxido de zinc- eugenol, permanecieran allí mayor cantidad de tiempo, logrando evitar que el conducto radicular y el periápice fueran re infectados por algún microorganismo o que algún microorganismo sobreviviera postratamiento (42,47).

10 CONCLUSIONES

El cemento de óxido de zinc-eugenol unido a nanopartículas de plata sólidas y en suspensión (extracto de guayaba y tamarillo) presenta propiedades antimicrobianas contra el *E. Faecalis* pero no son estadísticamente significativas con respecto a la actividad antimicrobiana del cemento óxido de zinc- eugenol original.

Las nanopartículas de plata en suspensión de extracto de guayaba presentan diferencia estadísticamente significativa en cuanto a su actividad bactericida con respecto a las otras muestras analizadas, por lo cual es un punto de partida para mejorar las características del compuesto óxido de zinc-eugenol para buscar mayor inhibición contra el *E. Faecalis*.

Las nanopartículas de plata se integraron al cemento de óxido de zinc- eugenol satisfactoriamente; lo cual se evidenció mediante FTIR y SEM, pero las nanopartículas en suspensión se distribuyen de manera más homogénea sobre el material.

11 RECOMENDACIONES

Como sugerencia para futuras investigaciones, se podría aumentar la concentración de nanopartículas de plata en suspensión, para lograr que el compuesto óxido de zinc- eugenol posea una mayor cantidad de éstas, y evaluar si así se logra una mayor actividad antibacteriana.

Se propone realizar en un estudio posterior con una cepa de células humanas apropiada para establecer el efecto sobre ellas, tanto citotóxico como genotóxico para establecer la dosis letal sobre una población de células.

Realización de estudios posteriores acerca de las implicaciones clínicas que posee el nuevo cemento creado.

12 BIBLIOGRAFÍA

1. Fonzar F, Fonzar A, Buttolo P, Worthington HV, Esposito M. The prognosis of root canal therapy: a 10-year retrospective cohort study on 411 patients with 1175 endodontically treated teeth. *Eur J Oral Implantol* 2009;2:201-8.
2. Ricucci D, Siqueira JF, Lopes WSP, Vieira AR, Rôças IN. Extraradicular infection as the cause of persistent symptoms: a case series. *J Endod* 2015;41:265-73.
3. Roza H, Motahareh A, Mohammad N, Mojtaba J. Antimicrobial efficacy of mixtures of nanosilver and zinc oxide eugenol against *Enterococcus faecalis*. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2017;18(3):177-181.
4. Fernández R, Cadavid D, Zapata SM, Alvarez LG, Restrepo FA. Impact of three radiographic methods in the outcome of nonsurgical endodontic treatment: a five-year follow-up. *J Endod* 2013;39:1097-103.
5. Marquis VL, Dao T, Farzaneh M, Abitbol S, Friedman S. Treatment outcome in endodontics: the Toronto Study. Phase III: initial treatment. *J Endod*. 2006;32(4):299-306.
6. Siqueira JF Jr. *Treatment of Endodontic Infections*. Vol 1. 1st ed. Germany: Quintessence Publishing Co.Ltd; 2011.
7. Ávalos A, Haza AI, Morales P. Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Rev Complut Cienc Vet*. 2013;7(2):1-23.
8. Tirali RE, Bodur H, Sipahi B, Sungurtekin E. Evaluation of the antimicrobial activities of chlorhexidine gluconate, sodium hypochlorite and octenidine hydrochloride in vitro. *Aust Endod J*. 2013;39(1):15-8.
9. Whitworth, John. *Methods of Filling Root Canals: Principles and Practices*. *Endod Top*. 2005;12:2-24.
10. Imura N, Pinheiro ET, Gomes BPF, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. The outcome of endodontic treatment: a retrospective study of 2000 cases performed by a specialist. *J Endod*. 2007;33(11):1278-82.

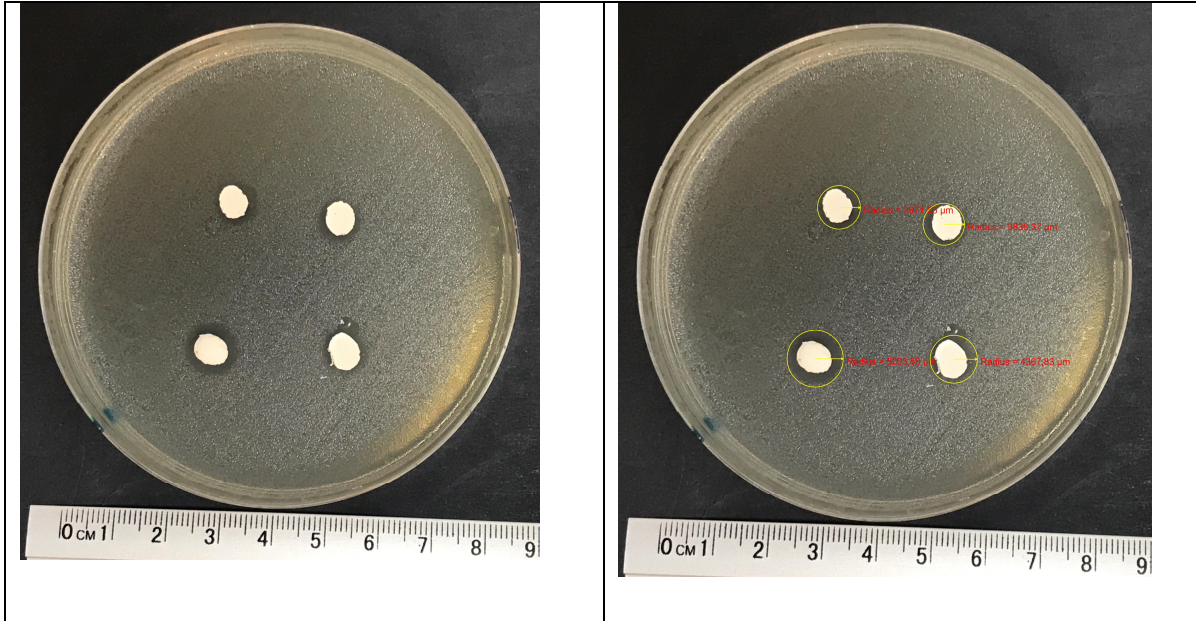
11. Ricucci D, Russo J, Rutberg M, Burleson JA, Spångberg LSW. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(6):825-42.
12. Endo MS, Ferraz CCR, Zaia AA, Almeida JFA, Gomes BPF. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *Eur J Dent.* 2013;7:302-9.
13. Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and persistent intraradicular infection compared with primary intraradicular Infection: A Systematic Review. *J Endod.* 2015;41:1207-13.
14. Torabinejad M, Walton R. *Endodoncia principios y práctica.* Vol 205. 4th ed. España: Elsevier Saunders; 2010.
15. Tobón Calle D. *Manual básico de endodoncia.* 1ª ed. Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2003.
16. Leonardo MR, Leal JM. *Endodoncia Tratamiento de los Conductos Radiculares, Principios técnicos y biológicos.* Vol 1. 2ª ed. Brasil: Editora Artes Médicas; 2005.
17. Gómez P. Cementos selladores en endodoncia. *Ustasalud odontología.* 2004;3:100-107.
18. Subramani K, Ahmed W. Nanotechnology and the future of dentistry. En: Subramani K, Ahmed W, editores. *Emerging nanotechnologies in dentistry.* 1st ed. USA: Elsevier; 2012. p.1-14.
19. Jain S, Jain AP, Jain S, Gupta ON, Vaidya A. Nanotechnology: An emerging area in the field of dentistry. *J Dent Sci.* 2013;10:1-9
20. Beyth N, Yudovin-Farber I, Weiss EI, Domb AJ. Antimicrobial Nanoparticles in Restorative Composites. En: Subramani K, Ahmed W, editores. *Emerging Nanotechnologies in Dentistry.* 1st ed. USA: Elsevier; 2012. p.35-47.
21. Allaker RP, Memarzadeh K. Nanoparticles and the control of oral infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43:95-104.

22. Correa JM, Mori M, Sanches HL, da Cruz AD, Poiate E, Poiate IAVP. Silver nanoparticles in dental biomaterials. *Int J Biomater*. 2015; 2015:1-9.
23. Melo MAS, Guedes SFF, Xu HHK, Rodrigues LKA. Nanotechnology-based restorative materials for dental caries management. *Trends Biotechnol*. 2013;31:459-67.
24. Kasraei S, Sami L, Hendi S, Alikhani M-Y, Rezaei-Soufi L, Khamverdi Z. Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. *Restor Dent Endod*. 2014;39:109-14.
25. García-Contreras R, Argueta-Figueroa L, Mejía-Rubalcava C, Jiménez-Martínez R, Cuevas-Guajardo S, Sánchez-Reyna PA, et al. Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *Int Dent J*. 2011;61:297-301.
26. Bahador A, Pourakbari B, Bolhari B, Hashemi FB. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of nanosilver-mineral trioxide aggregate against frequent anaerobic oral pathogens by a membrane-enclosed immersion test. *Biomed J*. 2015;38:77-83.
27. Sorrivias De Lozano V, Morales A, Yañez MJ. Principios y prácticas de la microscopía electrónica. Vol1. 1ª ed. Argentina: Conicet UAT; 2014.
28. Piqué TM, Vázquez A. Uso de Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR) en el estudio de la hidratación del cemento. *Concreto Cem Investig Desarro*. 2012;3:62-71.
29. R MB, Guzmán M. El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *J Biomédica*. 1984;4(3-4):112-21.
30. Salud M de. Resolución 8430 de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Ministerio de Salud Bogotá; 1993.
31. Kreibig U, Vollmer M. Optical properties of metal clusters. Vol 25. Alemania: Springer Science & Business Media; 2013.
32. Tang B, Wang J, Xu S, Afrin T, Tao J, Xu W, et al. Function improvement of wool fabric based on surface assembly of silica and silver nanoparticles. *Chem Eng J* 2012;185:366-73.

33. Mazinis E, Eliades G, Lambrianides T. An FTIR study of the setting reaction of various endodontic sealers. *J Endod.* 2007;33(5):616-20.
34. Dhayagude AC, Nikam SV, Kapoor S, Joshi SS. Effect of electrolytic media on the photophysical properties and photocatalytic activity of zinc oxide nanoparticles synthesized by simple electrochemical method. *J Mol Liq.* 2017;232:290-303.
35. Solórzano S, Lorenzo S. Laboratorio de microbiología. 1ª ed. Ecuador: Utmach; 2015.
36. Ørstavik DAG. Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. *Endod Top* 2005;12:25-38.
37. Ørstavik D. Physical properties of root canal sealers: measurement of flow, working time, and compressive strength. *Int Endod J.* 1983;16:99-107.
38. Whitworth J. Methods of Filling Root Canals: Principles and Practices. *Endod Top.* 2005;12:2-24.
39. Versiani MA, Abi Rached-Junior FJ, Kishen A, Pécora JD, Silva-Sousa YT, de Sousa-Neto MD. Zinc Oxide nanoparticles enhance physicochemical characteristics of Grossman Sealer. *J Endod* 2016;42:1804-10.
40. Bayne SC, Greener EH, Lautenschlager EP, Marshall SJ, Marshall GW. Zinc eugenolate crystals: SEM detection and characterization. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater* 1986;2:1-5.
41. Gaspar D, Pereira L, Gehrke K, Galler B, Fortunato E, Martins R. High mobility hydrogenated zinc oxide thin films. *Sol Energy Mater Sol Cells* 2017;163:255-62.
42. Afkhami F, Akbari S, Chiniforush N. *Enterococcus faecalis* Elimination in root canals using silver nanoparticles, Photodynamic therapy, Diode Laser, or Laser-activated nanoparticles: An In Vitro Study. *J Endod.* 2017;43:279-82.
43. Gjorgievska ES, Nicholson JW, Coleman NJ, Booth S, Dimkov A, Hurt A. Component release and mechanical properties of endodontic sealers following incorporation of antimicrobial agents. *BioMed Res Int.* 2017;2017:2129807.

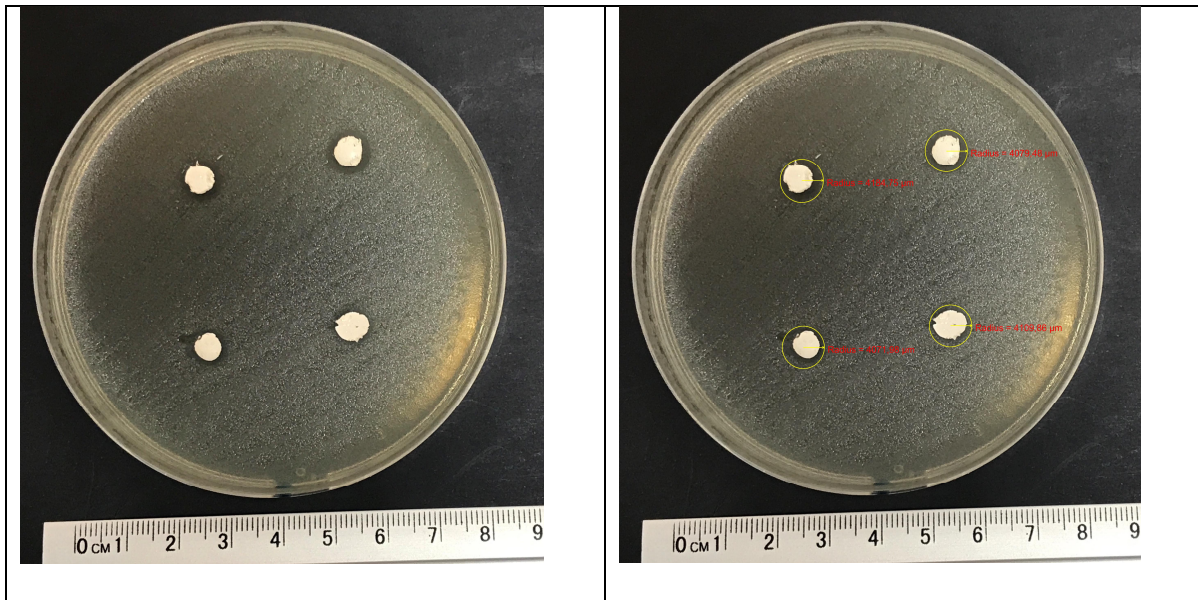
44. Haghgoo R, Ahmadvand M, Nyakan M, Jafari M. Antimicrobial efficacy of mixtures of nanosilver and zinc oxide eugenol against *Enterococcus faecalis*. *J Contemp Dent Pract*. 2017;18(3):177-81.
45. Wainstein M, Morgental RD, Waltrick SBG, Oliveira SD, Vier-Pelisser FV, Figueiredo JAP, et al. In vitro antibacterial activity of a silicone-based endodontic sealer and two conventional sealers. *Braz Oral Res*. 2016;30(1).
46. Freire PLL, Albuquerque AJR, Farias IAP, da Silva TG, Aguiar JS, Galembeck A, et al. Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of colloidal chitosan - silver nanoparticles - fluoride nanocomposites. *Int J Biol Macromol* 2016;93(Pt A):896-903.
47. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2014;40:285-90.

ANEXOS



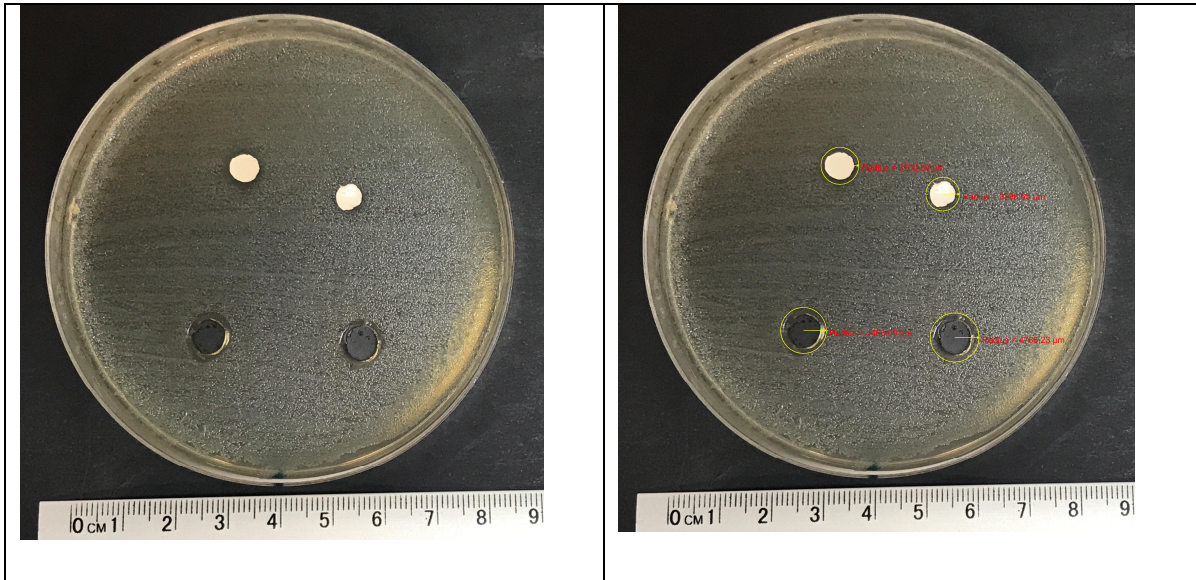
Anexo 1. Prueba Kirby Bauer T1

Se evidencia la formación de halo de inhibición en cada una de las muestras.



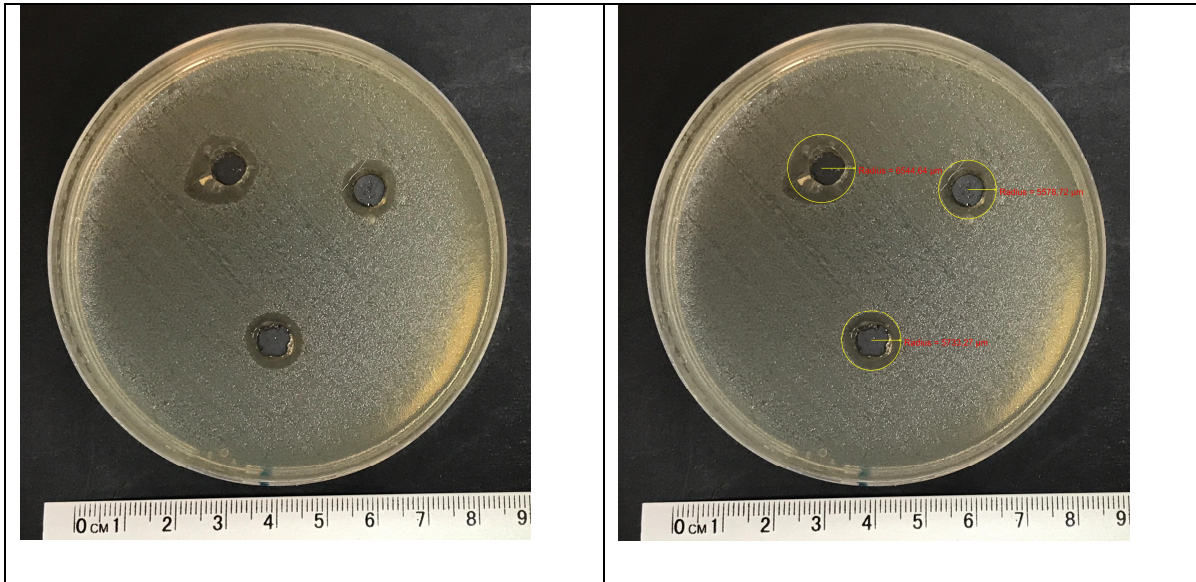
Anexo 2. Prueba Kirby Bauer T1 (superior izquierda) y T2 (superior derecha e inferiores)

Se evidencia la formación de un halo similar en las muestras T1 y T2.



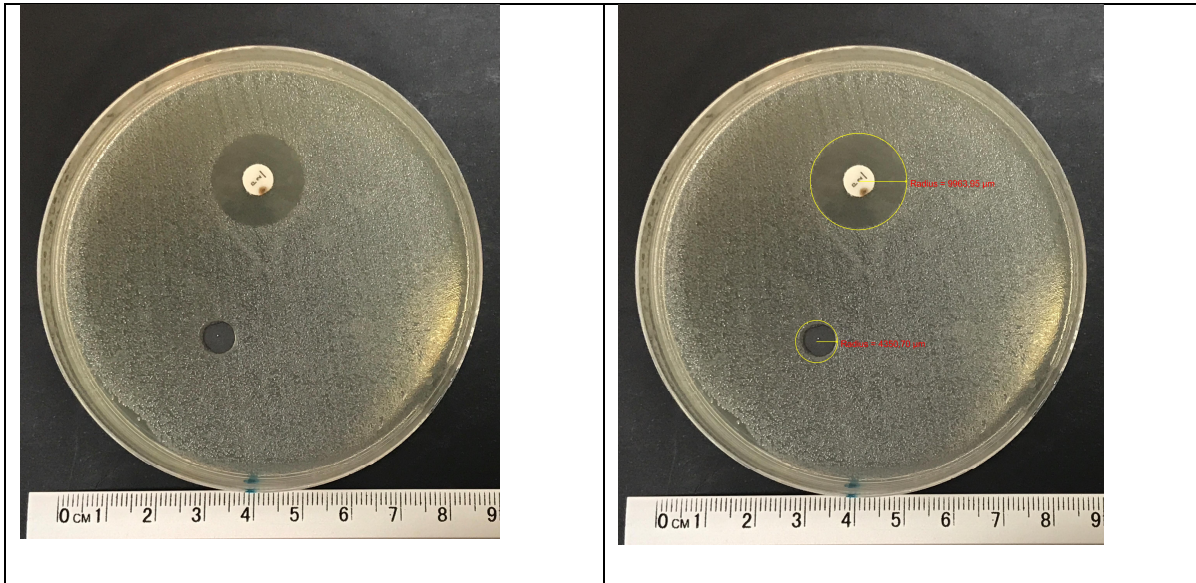
Anexo 3. Prueba Kirby Bauer T2 (superiores) y T3 (inferiores)

Se observa un halo de inhibición tanto para las muestras T2 como para las NP.



Anexo 4. Prueba Kirby Bauer T3

Presentaron halo de inhibición.



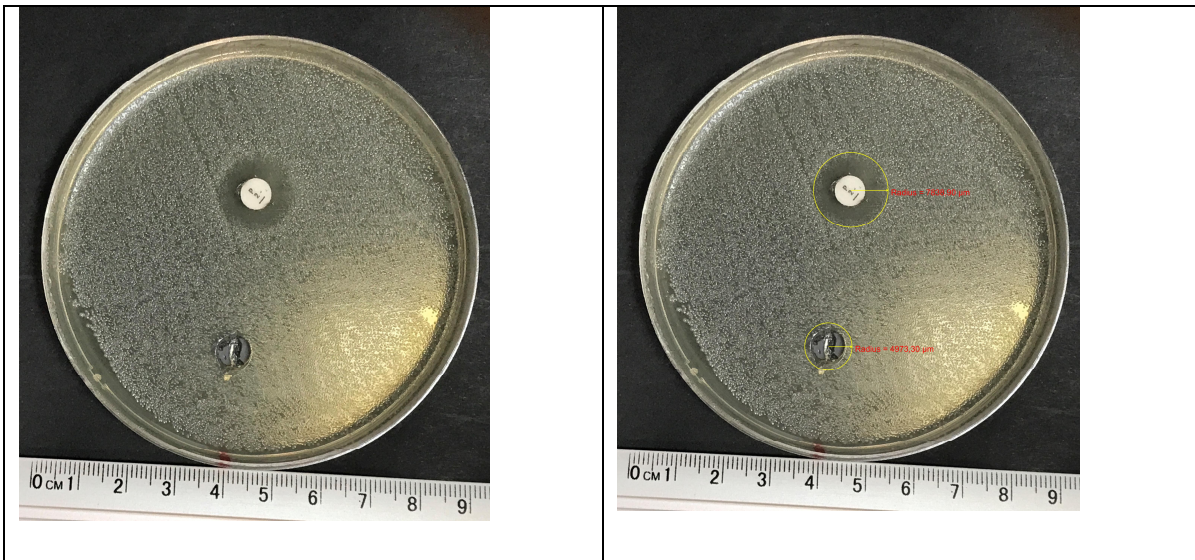
Anexo 5. Prueba Kirby Bauer CP (superior) y CN (inferior)

Se comprueba que el control positivo logro un notorio halo de inhibición y que el control negativo no presenta ningún halo.



Anexo 6. Prueba Kirby Bauer OZE

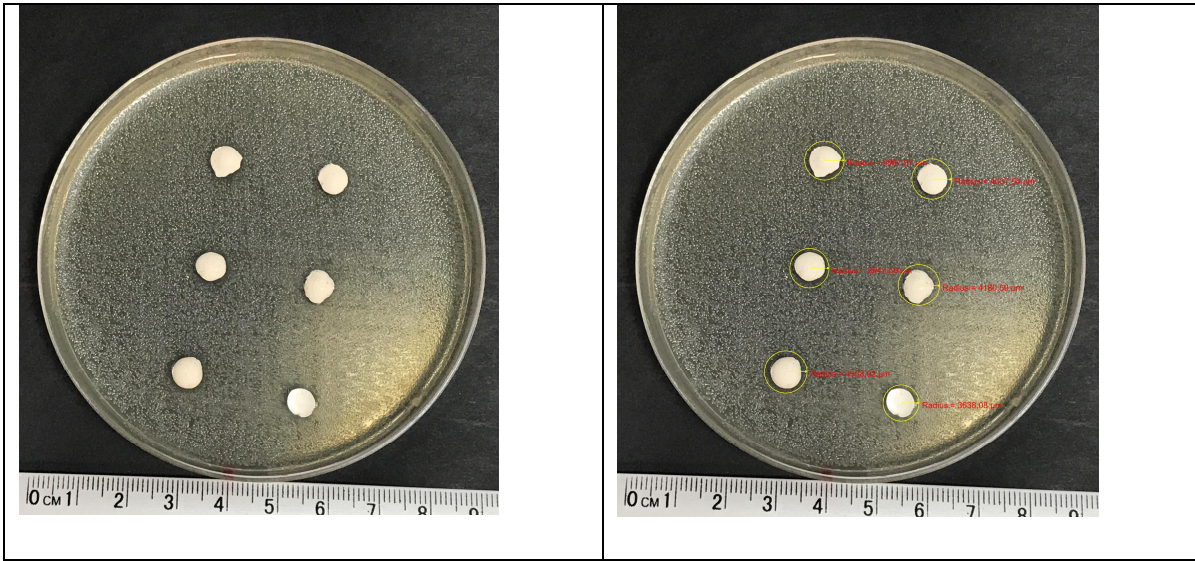
Se observa un leve halo de inhibición.



Anexo 7. Prueba Kirby Bauer CP (superior) CN (inferior)

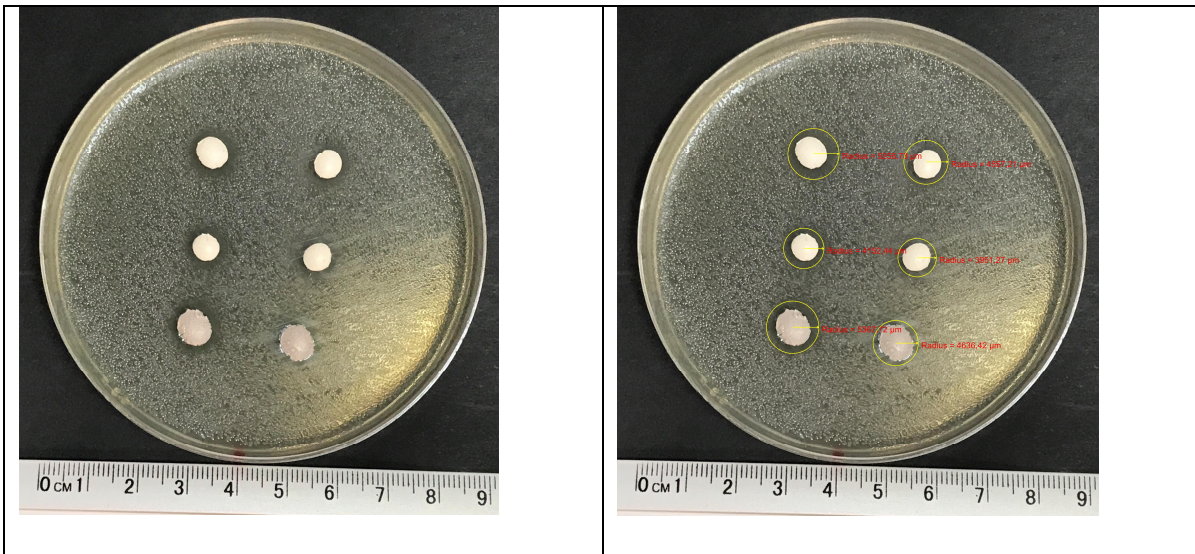
Se observa que el control positivo logro un notorio halo de inhibición y que el control negativo no presenta ningún halo.

Repeticion 1



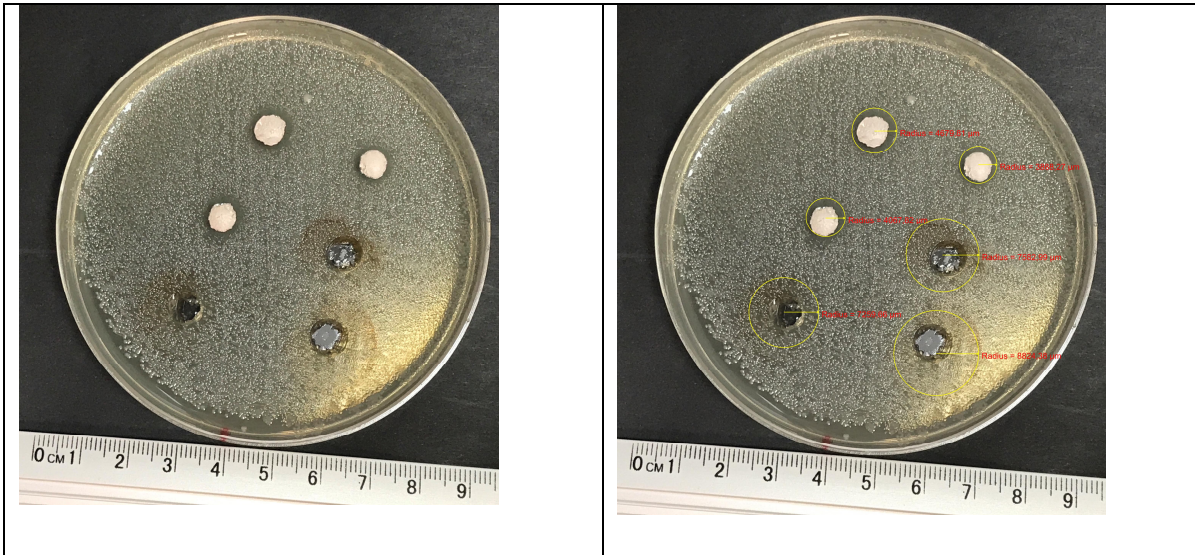
Anexo 8. Prueba Kirby Bauer ONT (superior, medio, inferior izquierdo) y ONG (inferior derecho)

Se encuentra un halo de inhibición, el cual no difiere mucho del encontrado en el óxido de zinc eugenol.



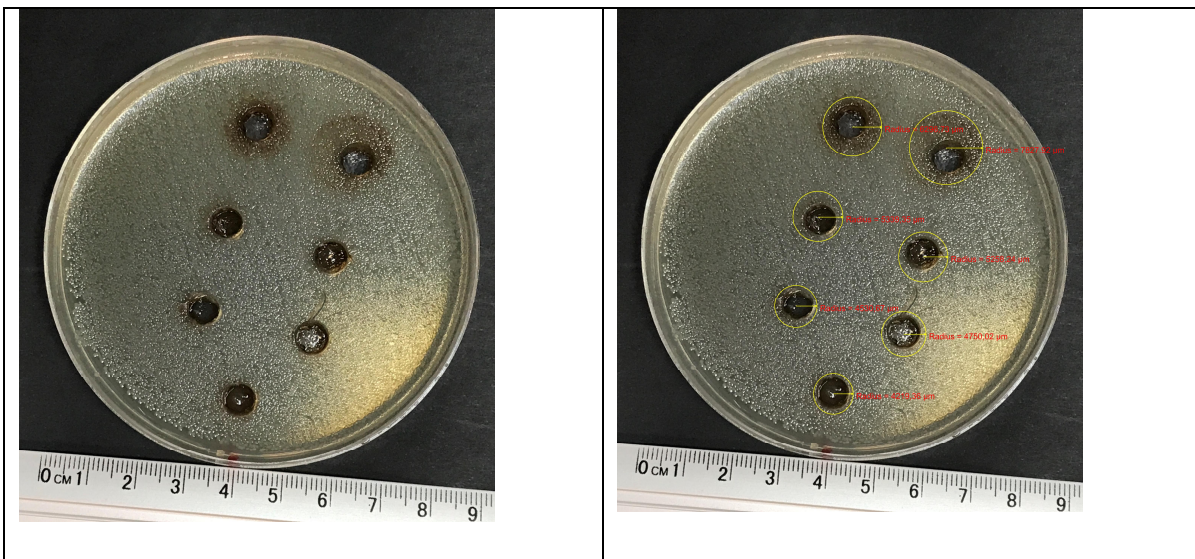
Anexo 9. Prueba Kirby Bauer ONG (superior y medio) ONS (inferior)

Se encuentra un halo de inhibición, el cual se observa, aparentemente, un poco mayor en la mezcla con nanopartículas sólidas.



Anexo 10. Prueba Kirby Bauer ONS (superior y medio izquierdo) y NLG (medio derecho e inferior)

Se observa un halo extenso en las nanopartículas en suspensión, posiblemente porque durante la manipulación en la incubadora se produjo un vaciado parcial del receptáculo donde estaban la solución de nanopartículas de extracto de guayaba.

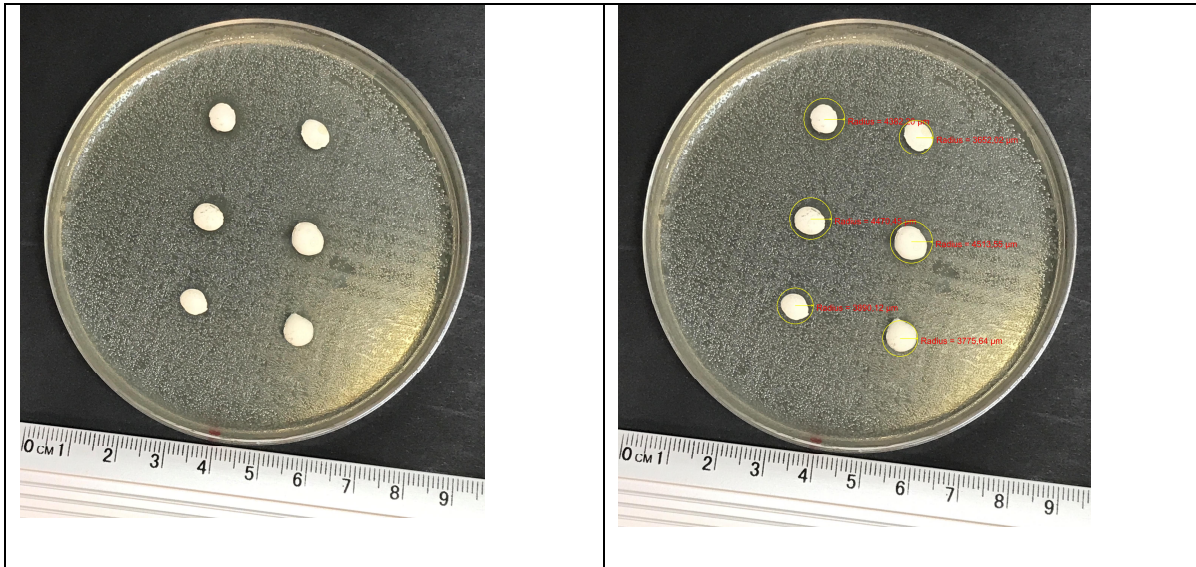


Anexo 11. Prueba Kirby Bauer NLG (superior) y NLT (medio e inferiores)

Se observa un halo extenso en las nanopartículas en suspensión, posiblemente porque durante la manipulación en la incubadora se produjo un vaciado parcial del receptáculo donde estaban la solución de nanopartículas de extracto de guayaba, sin embargo se observa que éste no se

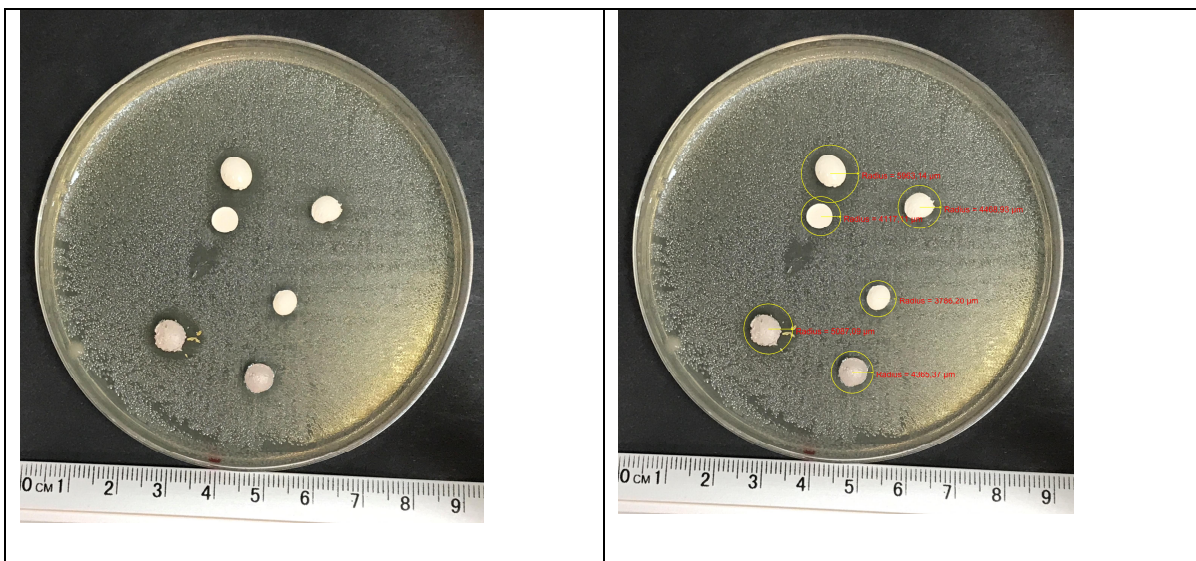
produce en las nanopartículas en suspensión de extracto de tamarillo, las cuales permanecen de una mejor manera en el receptáculo.

Repetición 2



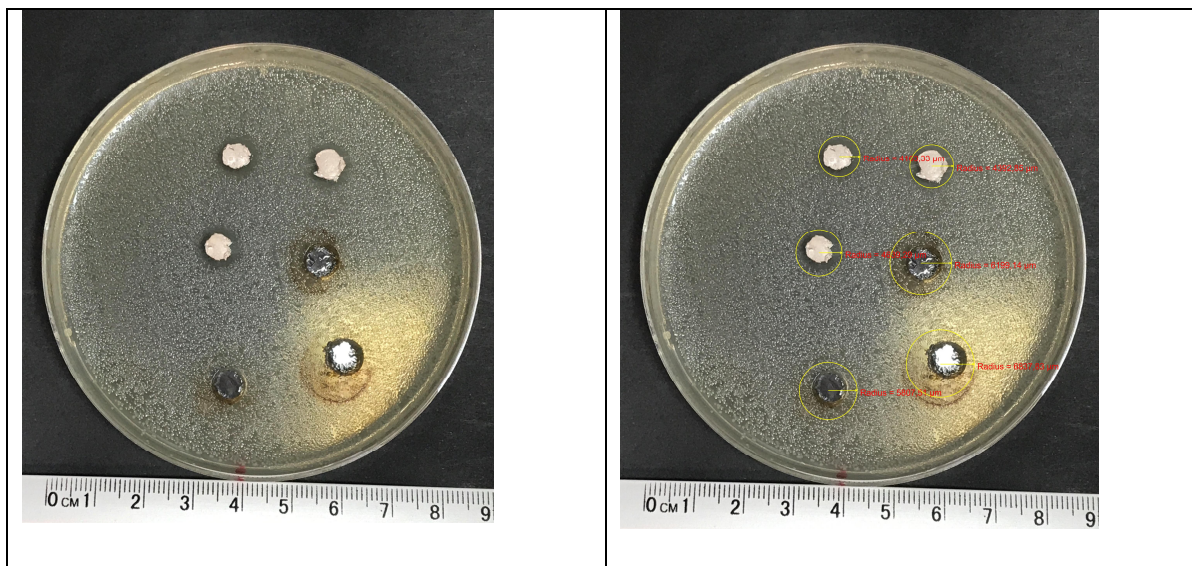
Anexo 12. Prueba Kirby Bauer ONT (superior, medio, inferior izquierdo) y ONG (inferior derecho)

Se encuentra un halo de inhibición, el cual no difiere mucho del encontrado en el óxido de zinc eugenol.



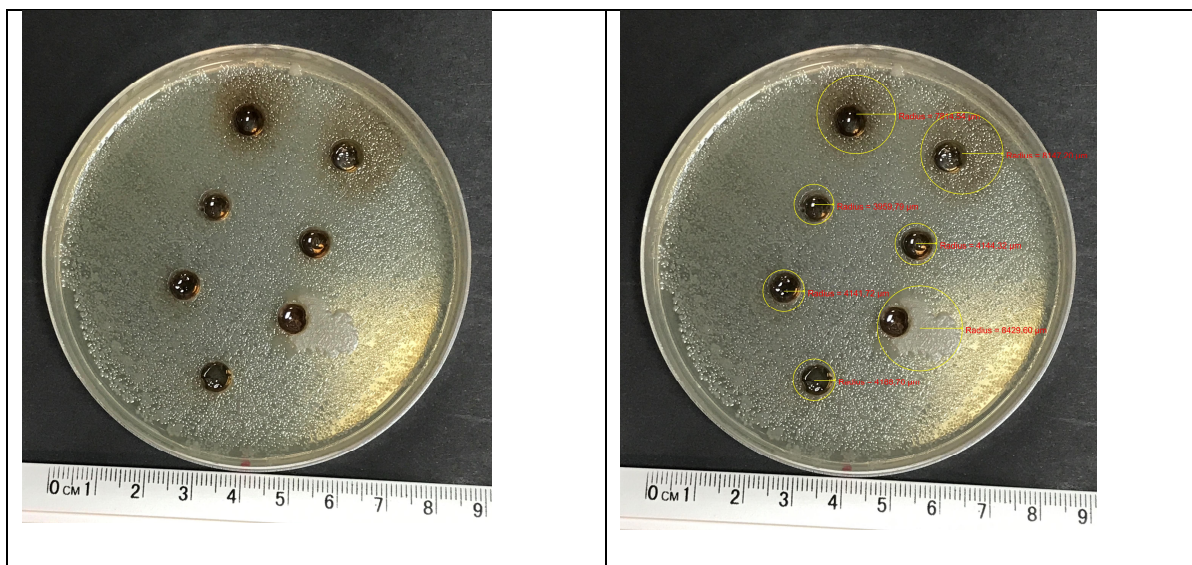
Anexo 13. Prueba Kirby Bauer ONG (superior y medio) ONS (inferior)

Se observa un halo de inhibición mayor en las muestras de óxido de zinc con nanopartículas sólidas, además se observa una aparente migración de la muestra 4 del óxido de zinc con nanopartículas en suspensión en extracto de guayaba.



Anexo 14. Prueba Kirby Bauer ONS (superior y medio izquierdo) y NLG (medio derecho e inferior)

Se observa un halo extenso en las nanopartículas en suspensión, posiblemente porque durante la manipulación en la incubadora se produjo un vaciado parcial del receptáculo donde estaban la solución de nanopartículas de extracto de guayaba.



Anexo 15. Prueba Kirby Bauer NLG (superior) y NLT (medio e inferiores)

Se observa un halo extenso en las nanopartículas en suspensión, posiblemente porque durante la manipulación en la incubadora se produjo un vaciado parcial del receptáculo donde estaban la solución de nanopartículas de extracto guayaba, sin embargo vemos que esto no se produce en las nanopartículas en suspensión en extracto de tamarillo, las cuales permanecen de una mejor manera en el receptáculo.

Anexo 16 .

Tabla 6.

NUMERO	PRUEBA	MUESTRA	TAM_HALO_24H (PROM_HALO_24H(
1	1	T1-1	3971.55	4313.22
2	1	T1-2	3838.37	
3	1	T1-3	5203.59	
4	1	T1-4	4367.83	
5	1	T1-5	4184.75	
6	1	T2-1	4079.48	3850.15
7	1	T2-2	4071.98	
8	1	T2-3	4109.86	
9	1	T2-4	3700.8	
10	1	T2-5	3288.65	
11	1	T3-1	4463.09	5416.99
12	1	T3-2	4765.23	
13	1	T3-3	6544.64	
14	1	T3-4	5578.72	
15	1	T3-5	5733.27	
16	1	CP	9963.95	

17	1	CN	0.00	
18	2	CP	7838.9	
19	2	CN	4973.9	
20	2	T1-1		
21	2	T1-2		
22	2	T1-3		
23	2	T1-4		
24	2	T1-5		
25	2	ONT-1	3997.97	4094.52
26	2	ONT-2	4037.54	
27	2	ONT-3	3947.59	
28	2	ONT-4	4180.59	
29	2	ONT-5	4308.92	
30	2	ONG-1	3638.08	4310.96
31	2	ONG-2	5255.78	
32	2	ONG-3	4557.21	
33	2	ONG-4	4152.44	
34	2	ONG-5	3951.27	
35	2	ONS-1	5367.72	4528.01
36	2	ONS-2	4636.42	
37	2	ONS-3	4679.81	
38	2	ONS-4	3888.27	
39	2	ONS-5	4067.82	

40	2	NLG-1	7582.99	
41	2	NLG-2	7259.66	
42	2	NLG-3	8824.38	
43	2	NLG-4	6269.73	
44	2	NLG-5	7827.92	7552.94
45	2	NLT-1	5339.35	
46	2	NLT-2	5258.24	
47	2	NLT-3	4530.67	
48	2	NLT-4	4750.02	
49	2	NLT-5	4219.36	4819.53
50	3	ONT-1	4382.2	
51	3	ONT-2	3652.02	
52	3	ONT-3	4470.45	
53	3	ONT-4	4513.55	
54	3	ONT-5	3890.12	4181.67
55	3	ONG-1	3775.64	
56	3	ONG-2	5963.14	
57	3	ONG-3	4468.93	
58	3	ONG-4	4117.11	
59	3	ONG-5	3786.2	4422.20
60	3	ONS-1	5087.09	
61	3	ONS-2	4365.37	
62	3	ONS-3	4163.33	4529.59

63	3	ONS-4	4392.85	
64	3	ONS-5	4639.29	
65	3	NLG-1	6199.14	6961.24
66	3	NLG-2	5807.51	
67	3	NLG-3	6837.83	
68	3	NLG-4	7814.54	
69	3	NLG-5	8147.2	
70	3	NLT-1	3959.79	4972.63
71	3	NLT-2	4144.32	
72	3	NLT-3	4141.72	
73	3	NLT-4	8429.6	
74	3	NLT-5	4187.7	