



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de los Altos
ESPECIALIDAD EN ODONTOPEDIATRÍA

**ESTUDIO ANTIBACTERIANO DEL NANOCOMPOSITO ZnO-CaO EN
BACTERIAS E. FEACALIS Y E. COLI.**

Como requisito para
Obtener el grado de **ODONTOPEDIATRÍA**

Por:
JUAN LUIS GONZALEZ HERNANDEZ

Director de tesis: Dra. María Fernanda Yáñez Acosta

Codirector de tesis: Dr. Alejandro Pérez Larios

Tepatitlán de Morelos, Jalisco

Enero 2020

ÍNDICE

Agradecimientos	5
Capítulo I	6
Introducción	6
Objetivos específicos.	10
Capítulo II	11
Antecedentes	11
Pruebas antimicrobianas	16
Difusión en disco	16
Concentración Mínima inhibitoria (MIC) y bactericida (MBC)	17
Prueba de contacto directo	17
Materiales antimicrobianos	18
Capítulo III	20
Metodología	20
Materiales y Métodos	20
Reactivos	20
Síntesis de Materiales	20
Caracterización de materiales	21
Microscopía Electrónica de Barrido	21
Difracción de Rayos X	22
Espectroscopia de UV-Vis con DRS	23
Espectroscopia de Infrarrojo con reflectancia difusa	23
Actividad antimicrobiana	24
Capítulo IV	26
Resultados y Discusión	26
Microscopía Electrónica de Barrido	26
Difracción de Rayos X	27
Espectroscopia de UV-Vis con DRS	28
Actividad antimicrobiana	29
Capítulo V	32
Conclusiones	32
Referencias	33

Índice de Figuras

Figura 1.....	8
Figura 2.....	15
Figura 3.....	16
Figura 4.....	17
Figura 5.....	18
Figura 6.....	19
Figura 7.....	20
Figura 8.....	21
Figura 9.....	22
Figura 10.....	23
Figura 11.....	24
Figura 12.....	24

Índice de Tablas.

Tabla 1.....	25
Tabla 2.....	25
Tabla 3.....	26
Tabla 4.....	26
Tabla 5.....	26

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora y codirector de tesis, la **Dra. María Fernanda Yáñez y el Dr. Alejandro Pérez Larios**, quien con sus conocimientos y apoyo me guiaron a través de cada una de las etapas de este proyecto para alcanzar los resultados que buscaba.

A mi coordinadora de la especialidad la **Dra. Carmen Celina Alonso Sánchez**, así como a todos mis maestros que me guiaron, me enseñaron y compartieron tantos conocimientos conmigo.

También quiero agradecer a **La Universidad de Guadalajara**, especialmente al **Centro Universitario de los Altos**, por brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación.

Así mismo agradecer al brillante equipo de investigadores del **Laboratorio de Investigación de Materiales, Agua y Energía (LIMAE)** Especialmente a **María Isabel Torres Ramos, María Fernanda Muñoz Orozco, Adriana del Carmen Mariscal Barajas, Luis Miguel Anaya Esparza, Isaías Limón Rocha y Noé Rodríguez Barajas** que compartieron sus grandes conocimientos e ideas, que no hubiese podido arribar a estos resultados de no haber sido por su incondicional ayuda.

Por último, quiero agradecer a mis **compañeros Cinthia Sánchez, Paola Rodríguez, Fernanda Reséndiz, Sonia Vázquez, Yuridiana Berumen, Vicente Ibarra y Raúl Salgado**. En especial, quiero hacer mención a mis **padres José Gonzalez y Socorro Hernández**, que siempre estuvieron ahí para darme palabras de apoyo para renovar energías.

Muchas gracias a todos.

Capítulo I

Introducción

La caries dental representa un problema de salud cada vez más grave para el que se ha identificado como las principales causantes de enfermedades bucales [1]. Hoy en día, la atención se centra en el desarrollo de materiales adecuados capaces de matar o inhibir estas bacterias y, por tanto, de controlar la condición patológica.

Aunque se ha informado que los compuestos antimicrobianos disminuyen la aparición de enfermedades dentales, el uso de antibióticos y bactericidas químicos puede tener un impacto negativo en la flora bacteriana de la cavidad oral y el tracto intestinal [2,3]. Dado que los patógenos pueden adquirir resistencia frente a diferentes antibióticos, los agentes que se caracterizan por una notable actividad antibacteriana y que no desarrollan resistencia son ahora muy solicitados [4].

En base en esto, la nanotecnología se considera una herramienta poderosa. Durante los últimos años, una atención cada vez mayor se centró en las nanopartículas metálicas (es decir, plata y zinc) debido a sus notables propiedades antimicrobianas [5]. El alto efecto antibacteriano de estos agentes nanoestructurados se atribuye a la alta relación superficie/volumen, lo que permite una mayor presencia de átomos en la superficie y, por lo tanto, proporciona el máximo contacto con el medio ambiente. Debido a su capacidad para penetrar fácilmente las membranas celulares, varios procesos intracelulares se interrumpen, lo que resulta en una alta reactividad y actividad antibacteriana [6].

En este contexto, las nanopartículas de ZnO, pueden representar una valiosa herramienta en el campo biológico/médico, también debido al hecho de que su proceso de producción es muy fácil, económico y escalable [7]. Las propiedades antimicrobianas de los ZnO como nanocomposito frente a bacterias gramnegativas (*Pseudomonas aeruginosa*) y grampositivas (*S. mutans*) se han investigado en estudios previos [8,9], y también se ha demostrado su muy baja citotoxicidad a través del sistema in vivo (*Caenorhabditis elegans*) [10]. Sin embargo, una de las principales limitaciones para una amplia explotación de los nanocompositos como agente antimicrobiano en la aplicación dental, está representada la capacidad de agregación cuando se dispersa en una suspensión coloidal.

La eficacia antibacteriana de los metales depende directamente de su área de superficie de contacto total. Las dimensiones a nanoescala de las nanopartículas permiten una gama más amplia de interacciones con microorganismos aumentando su capacidad antibacteriana.

Streptococcus mutans, *E. Feacalis* y *E. Coli* son una de las especies principales de bacterias responsable de la caries dental [23]. Varias investigaciones argumentaron que, entre los agentes metálicos, las nanopartículas de plata son las más eficaces para inhibir el crecimiento de *S. mutans* [24]. Sin embargo, el principal inconveniente de la plata en la restauración dental son los cambios cosméticos de los materiales del color de los dientes [24]. Por lo tanto, un metal insoluble, del color de los dientes o polvos incoloros de óxido como sílice, zirconio, alúmina y óxido de zinc (ZnO) puede ser más interesante en compositos dentales. A pesar de que la incorporación de ZnO en los compositos dentales, se puede tener actividad antibacteriana [5], la opacidad de las partículas contra la luz visible puede afectar negativamente a la fotopolimerización y, en consecuencia, a las propiedades mecánicas de los nanomateriales.

El óxido de zinc (ZnO), un semiconductor de banda ancha amplia, ha atraído un interés creciente debido a sus propiedades ópticas, luminiscentes, electrónicas, optoelectrónicas y biocompatibles únicas [11,12]. Se han desarrollado varios métodos para sintetizar materiales de ZnO como nanoestructuras unidimensionales (1D) con diferentes morfologías, incluidos nanocables, nanobarras y nanoagujas [13]. Se ha demostrado baja citotoxicidad de ZnO [14], junto con su gran potencial como material antibacteriano actuando contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

El propósito de este estudio es evaluar las propiedades antibacterianas del ZnO-CaO en cepas bacterianas de *E. Feacalis* y *E. Coli*.

JUSTIFICACIÓN.

La caries dental es una de las enfermedades de salud bucal más comunes en la actualidad. El tratamiento inadecuado puede provocar infecciones secundarias y enfermedades sistémicas, como artritis, enfermedades cardíacas y nefritis crónica, por lo tanto, los materiales de restauración versátiles y confiables para el tratamiento de caries son muy necesarios. Debido a la estética superior y la biocompatibilidad sobre las aleaciones de amalgama, los compuestos de resina dental se han utilizado ampliamente para restaurar la caries dental y otros defectos desde 1960. Estos compuestos están hechos de rellenos inorgánicos modificados y están dispersos en la superficie de una matriz de resina fotopolimerizable, que puede formar de una red de polímeros compuestos reticulados bajo una irradiación de luz azul. Muchos esfuerzos de investigación se han centrado en la optimización de las formulaciones de relleno, incluida la morfología del relleno, carga y tamaño, para mejorar el rendimiento físico-mecánico de los compuestos dentales. Este problema no resuelve los problemas bacterianos y fúngicos, por lo que es importante utilizar y/o desarrollar materiales con resistencia bacteriana y fúngica, incluida la inhibición de *S. Mutans*. Por otro lado, los materiales mesoporosos llegan a ser una parte fundamental y de mucho interés en los compuestos dentales, debido a sus estructuras mesoporosas ordenadas, su gran área superficial y su buena compatibilidad. Mientras que su principal inconveniente en los compuestos dentales son los cambios cosméticos de los materiales, afectando del color del diente. Por lo tanto, los polvos de óxido metálicos insolubles, de color similar al de los dientes o incoloros, como el ZnO, son materiales atractivos para estas aplicaciones, además de que el ZnO puede liberar Zn^{2+} a través de la estructura para proporcionar compuestos finales con actividad antibacteriana.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Como profesionales, tenemos el deber particular de proporcionar una amplia gama de atención dental a las personas que se presentan con diversos problemas médicos sistémicos, discapacidades físicas y de aprendizaje, deficiencias cognitivas, así como a pacientes jóvenes con enfermedades congénitas, TDAH o espectro autista, entre otros trastornos. Además, como resultado de los cambios demográficos actuales, nuestros pacientes reciben terapias farmacológicas más complejas que pueden interferir con ciertos procedimientos dentales. Diariamente, los odontólogos se enfrentan a un número cada vez mayor de pacientes que se someten a quimioterapia y radioterapia, lo que afecta la salud oral y causa síntomas agudos que afectan la calidad de vida de los pacientes. Como resultado, debemos abordar planes de tratamiento complejos, incluida la atención restaurativa proporcionada a grupos de pacientes de edad avanzada con problemas médicos subyacentes para los que están tomando múltiples medicamentos. La evaluación de la capacidad mental, el consentimiento válido informado, las consultas de especialistas y la "reunión de interés superior" con otras personas involucradas en el cuidado de un paciente se están convirtiendo en una parte esencial de la práctica dental de rutina, lo que refleja la complejidad real de la planificación del tratamiento individual. La creciente demanda de atención dental especializada como resultado de problemas de salud bucal más complejos ha estimulado el establecimiento de nuevos currículos de capacitación académica, y esta tendencia ha aparecido en todo el mundo. Sin lugar a dudas, los estudiantes de odontología deben adquirir enfoques más integrados y factibles durante la educación para ayudarlos a estar bien preparados cuando se trata de casos clínicos desafiantes. En las últimas décadas, los odontólogos generales han notado un cambio significativo en la reducción de la exodoncia a favor de enfoques más conservadores, debido al envejecimiento de la población y el cambio demográfico. Finalmente, vale la pena mencionar que la tendencia de reemplazar la anestesia general dental con servicios de sedación consciente también podría ser aplicable cuando se trata a pacientes con fobia dental o discapacidades de aprendizaje.

HIPÓTESIS

La síntesis de un óxido mixto a base de ZnO ayudarán a mejorar las propiedades antimicrobianas y antifúngicas, en el área dental.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar y estudiar el efecto biológico de las nanopartículas de ZnO-CaO.

Objetivos específicos.

- Sintetizar nanomateriales ZnO-CaO.
- Caracterizar los nanomateriales ZnO-CaO.
- Evaluar el potencial antibacteriano.
- Evaluar el potencial antifúngico.

Capítulo II

Antecedentes

La nanotecnología es la aplicación del conocimiento científico de manipular y controlar la materia predominantemente en el nanoescala para hacer uso de propiedades y fenómenos dependientes del tamaño y la estructura, distintos de los asociados con átomos o moléculas individuales, o extrapolación de más grandes tamaños del mismo material [26,27]. La nanomedicina es el uso controlado de nanotecnologías en el cuidado de la salud que conduce a nuevas vías de diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas [28].

Las nanopartículas están presentes en la naturaleza y se utilizan para una gran extensión en nuestra vida diaria; p.ej. en productos cosméticos, por ejemplo, partículas de TiO_2 o ZnO utilizadas como filtro UV o en pastas bucales, en este caso principalmente dióxido de titanio o silicatos. Así mismo, las nanopartículas también están presentes en la alimentación diaria, suplementos dietéticos y aerosoles utilizados para revestimiento, limpieza e impregnación [29–33]. Ellos son capaces de mejorar la estabilidad de los alimentos, su sabor y consistencia. El dióxido de silicio, óxido de magnesio o dióxido de titanio son aditivos alimentarios probados y autorizados en algunos países [34].

En odontología, las nanopartículas juegan un papel cada vez más importante ya que están incorporadas intencionalmente en productos, para mejorar propiedades del material de los compuestos a base de resina, como la capacidad de pulido y la estabilidad del brillo [35], pero también como soportes [36]. Los materiales dentales, que liberan intencionalmente nanopartículas, son bastante raros, como el escaneo, la aplicación de aerosoles para CAD/CAM [37] o láminas indicadoras de oclusión.

El uso de la nanotecnología tiene un gran potencial para la vida diaria y los grupos de investigación de todo el mundo y las agencias nacionales e internacionales están poniendo mucho esfuerzo en esta nueva y prometedora tecnología [38-42]. Más recientemente, las nanopartículas también se han convertido en un asunto de interés público y científico y las agencias nacionales e internacionales se ocupan de los nanomateriales y sus aspectos de seguridad; por ejemplo, OMS, ISO [38], o FDA [39].

Tanto los materiales dentales como los compositos, a base de resina, los cementos o los materiales de impresión contienen nanomateriales, se estima que las nanopartículas están presentes en cerca de 3500 materiales dentales (Verband der Deutschen Dental Industrie (VDDI) —Comunicación personal, junio de 2017).

Por otro lado, los crecientes requisitos de materiales para aplicaciones médicas y biomédicas han llevado al desarrollo de nuevos materiales (como materiales nanocompuestos) con propiedades superficiales específicas. Actualmente, se hace hincapié en la naturaleza antibacteriana inmediata; biocompatibilidad y bioactividad, incluida la célula (figura 1) y la hemocompatibilidad de los nanomateriales; una energía superficial baja; y una alta hidrofobicidad, que conduce a una mala humectabilidad y una mala adherencia [42,43].

Especialmente, las propiedades de la superficie se modifican mediante diversas técnicas de tratamiento, como la polimerización con plasma [45], la polimerización inducida por UV [46] o el tratamiento con ozono [43,46,48]. Sin embargo, en el caso de materiales nanocompuestos, las propiedades de la superficie también pueden verse influidas por la composición química, la humectabilidad y/o la topografía superficial cambiante del material nanocompuesto. Además, la elección adecuada de los tipos de nanorelleno y su distribución homogénea en la matriz del nanomaterial permite influir en las propiedades estructurales y antibacterianas.

Con este fin, los nanomateriales a base de metales, al igual que los agentes antibacterianos relacionados con las nanopartículas, pueden frenar el crecimiento antimicrobiano [46,47]. La gran extensión de superficie y volumen, al igual que las extraordinarias propiedades superficiales de las nanopartículas metálicas, las convierte en un agente terapéutico antimicrobiano robusto, adaptable y convincente [48,49].

Entre los diferentes óxidos metálicos se encuentra el óxido de zinc (ZnO), este nanomaterial ha recibido el título de seguro, generalmente reconocido por la Administración de Alimentos y Medicamentos (F.D.A.) y se ha activado el estado de agentes bactericidas fiables [50,51,52]. Se percibe como una de las nanopartículas metálicas más activas, ya que se difunden bruscamente en la membrana y dañan las células del microorganismo.

Las nanopartículas de ZnO se han utilizado como una potente sustancia antibacteriana contra patógenos específicos in vitro e in vivo contra agentes patógenos. Se ha establecido que la mayoría de las nanopartículas, incluidas las nanopartículas de ZnO, provocan lesiones en la pared celular y las membranas de los microorganismos [53,54]. Más importante aún, el nano-ZnO exhibe toxicidad selectiva para las bacterias, lo que hace que su gran potencial para aplicaciones antibacterianas en muchos campos, como la desinfección del agua, la conservación de alimentos, los vendajes médicos para heridas y aplicaciones dentales [53-56].

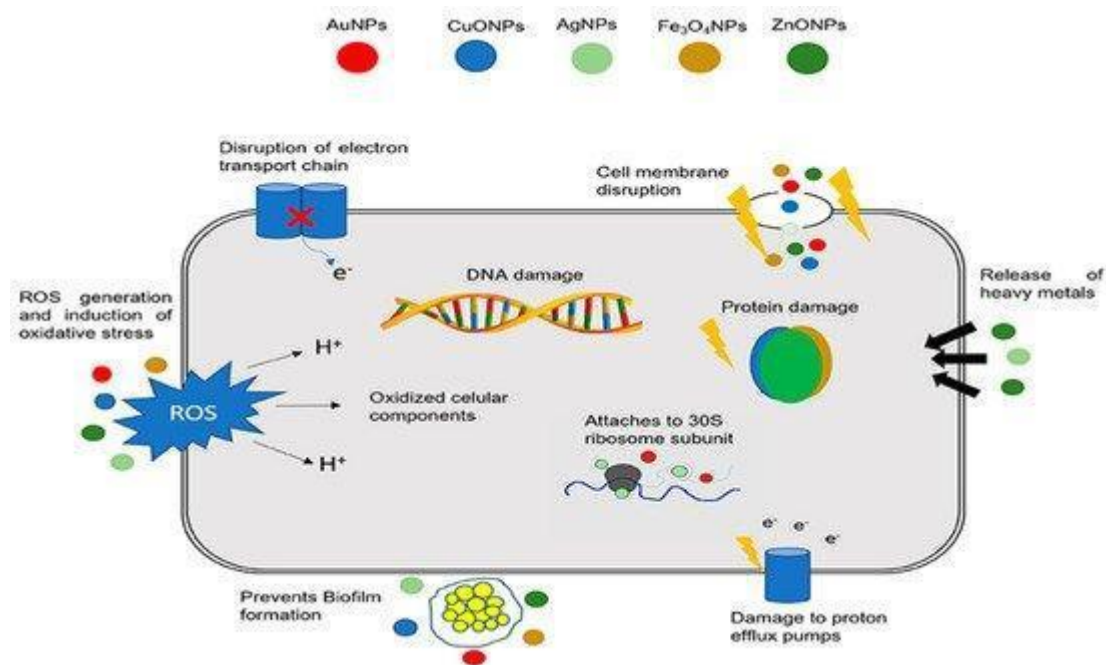


Figura 1. Mecanismo antibacteriano de diferentes nanopartículas

La cavidad bucal alberga varios tipos de microorganismos que provocan trastornos como caries, cálculos, gingivitis o periodontitis. Los procedimientos invasivos en la cavidad oral que utilizan materiales dentales, como la restauración de dientes cariados con composites o la colocación de implantes, se ven particularmente afectados por la acción microbiana. Por tanto, es lógico equipar materiales dentales con propiedades antimicrobianas.

Es probable que la acción antimicrobiana de la plata se conozca desde los primeros registros históricos [58]. En la actualidad, la plata es uno de los agentes antimicrobianos más

reportados en la literatura científica. La acción antimicrobiana de la plata y algunos otros metales se basa en los efectos dañinos de los cationes metálicos en las células vivas. La plata conduce al daño de la pared celular y la membrana celular y a la reacción con biomacromoléculas dentro de las células. Los antimicrobianos a base de plata son demostrativamente eficaces contra microorganismos como bacterias, virus y hongos [59].

La alta relación superficie / volumen de las nanopartículas de plata promete una mayor eficacia de la dosis de plata contra los microorganismos. Combinado con el advenimiento de métodos para producir nanopartículas de plata con distribuciones de tamaño estrechas y homogeneidad [60] y las vastas áreas de aplicación en odontología, el número de publicaciones que abordan este tema ha aumentado en los últimos diez años.

Las nanopartículas de plata se han aplicado en nanocompositos, recubrimientos de implantes; formulaciones anti-caries; en el tratamiento del cáncer oral y muchos más [59]. Los resultados in vitro revelan la excelente actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata cuando se asocian con resinas acrílicas, co-monómeros de resina, adhesivos, medicación intracanal y recubrimientos de implantes para combatir infecciones microbianas, especialmente caries [59]. Sin embargo, el número de estudios que confirman estos resultados in vitro positivos en situaciones clínicas es muy bajo.

La alta relación superficie / volumen de las nanopartículas de plata promete una mayor eficacia de la dosis de plata contra los microorganismos. Combinado con el advenimiento de métodos para producir nanopartículas de plata con distribuciones de tamaño estrechas y homogeneidad [60] y las vastas áreas de aplicación en odontología, el número de publicaciones que abordan este tema ha aumentado en los últimos diez años.

No todos los tamaños de nanopartículas de plata parecen tener la misma eficacia antimicrobiana. Ginjupalli y col. [61] mostró que las nanopartículas de plata en un rango de tamaño de 80 a 100 nm son superiores en impartir actividad antimicrobiana a hidrocoloides irreversibles en comparación con rangos de tamaño de partículas más pequeños.

A pesar de los efectos antimicrobianos probados de la plata y algunos de sus compuestos, este material tiene varias desventajas, tóxico para todas las células del cuerpo, no solo para los microbios. Este problema se ve agravado por las dificultades para controlar la dosis de

plata. Las nanopartículas de plata pueden ser útiles para abordar este problema de dosis [62]. Además, la plata puede provocar la decoloración de materiales o tejidos [63]. Si los materiales dentales basados en nanopartículas de plata pueden ser efectivos en situaciones clínicas con respecto a su efecto antimicrobiano, la biocompatibilidad y la estética aún están por dilucidarse.

Las nanopartículas de plata también muestran propiedades antivirales. Mohsen y colaboradores [64] estudiaron el efecto inhibitor de las nanopartículas de plata (tamaño de partícula inferior a 20 nm), los nanoalambres de plata y la infección in vitro de la célula huésped inducida por el virus corona de coloides de plata. Descubrieron que los nanomateriales de plata son eficaces en la prevención de la infección celular mediada por coronavirus como agente virucida o como inhibidor de la entrada viral. Estos hallazgos pueden proporcionar nuevos conocimientos sobre la terapia antiviral de las infecciones por coronavirus.

Hojati et al. demostró que los compuestos de resina que contienen nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) tienen un efecto antimicrobiano [48]. Una prueba de contacto directo mostró que, al aumentar el contenido de nanopartículas, el crecimiento microbiano de *Streptococcus mutans* disminuyó significativamente. Sin embargo, la adición de nanopartículas de ZnO redujo significativamente la profundidad de curado del material compuesto, mientras que algunas propiedades mecánicas permanecieron sin cambios y otras aumentaron [23].

También se sabe desde hace mucho tiempo que el cobre tiene efectos antimicrobianos. Gutiérrez et al. investigó nanopartículas de cobre añadidas en diferentes concentraciones [66]. Encontraron que la adición de nanopartículas de cobre no afectó varias propiedades mecánicas probadas y concentraciones más altas las cuales produjeron interfaces adhesivo-dentina que son más resistentes a las microfiltraciones. Las nanopartículas de cobre aumentaron significativamente la actividad antimicrobiana.

Las nanopartículas de cobre son efectivas contra virus como lo demuestran, por ejemplo, Fujimori et al. [58]. Observaron la inactivación de la cepa de influenza A H1N1 pandémica 2009 por nanopartículas de yoduro de Cu (I). Esto involucró radicales hidroxilo y resultó en la degradación de la hemaglutinina y proteínas virales. También se ha demostrado que el cobre es eficaz contra el coronavirus humano en las superficies de los materiales [59]. Para

evitar los problemas de los materiales dentales antimicrobianos que liberan iones metálicos, se investigan intensamente alternativas. Estos incluyen nanoportadores o nanocápsulas, nanocompuestos dentales que contienen una combinación de monómeros antimicrobianos y fosfatos de calcio y otros.

Pruebas antimicrobianas

Para evaluar la actividad antibacteriana de los nanomateriales en el área dental, se han empleado muchos estudios como pruebas de difusión en disco [85], prueba de contacto directo [79,86], concentración mínima inhibitoria (MIC) y/o concentración mínima bactericida (MBC) [87].

Difusión en disco

En difusión en disco de agar, las muestras (generalmente como tableta) se colocan en la superficie de placas de agar inoculadas. Este método se utiliza en la mayoría de los estudios actualizados sobre agentes solubles capaces de difundirse en gel de agar, pero no es aplicable a agentes insolubles con propiedades de inhibición de superficies. Si algún componente antibacteriano soluble se filtra de las muestras, la actividad antimicrobiana se evaluará midiendo el diámetro de la zona de inhibición (mm) en la superficie de las placas. Sin embargo, en la mayoría de los estudios, se encontró que los composites curados no liberaban ningún componente antibacteriano; así, no se ha demostrado la zona de inhibición porque no hubo lixiviación de cantidades adecuadas de componentes antibacterianos. de composites curados para inhibir el crecimiento bacteriano [88].

La actividad antifúngica y antibacteriana de estos curados las resinas provienen de los antimicrobianos filtrados. Por ejemplo, en el estudio reportado por Yap et al., algunos curados comerciales se probaron en compuestos que liberan fluoruro y solo algunos mostraron poca inhibición contra *S. mutans*. La razón radica en el hecho de que la cantidad de fluoruro liberada de los composites fluorados curados son demasiado pequeños para revelar efectos antibacterianos [89]. Como resultado, la prueba de difusión en disco de agar puede ser realizada para compuestos no polimerizados y esta técnica no muestra actividad microbicida.

Concentración Mínima inhibitoria (MIC) y bactericida (MBC)

Los métodos MIC y MBC generalmente se usan para materiales no polimerizados antes de curar para revelar la actividad de monómeros antimicrobianos o partículas inorgánicas como ZnO nanopartículas [90,91]. El monómero antibacteriano no polimerizado actúa como un bactericida libre similar a los antimicrobianos convencionales. Por ejemplo, Imazato et al. [92,93] sintetizó un nuevo monómero bromuro de 12-metacrililoiloxidodecilmiridinio (MDPB) y realizó una CIM en este monómero antes de polimerización para evaluar su actividad antimicrobiana. En estos métodos, una amplia gama de concentraciones del antibacteriano compuestos, tales como monómeros antibacterianos o nanopartículas, se colocan en viales y se inoculan con una determinada concentración de cultivo bacteriano y fúngico ajustado. El valor de MIC se determina a partir de exámenes visuales y / o por espectrometría como la concentración más baja de un agente antimicrobiano que es necesaria para inhibir completamente las bacterias crecimiento. MBC es la concentración más baja del antimicrobiano agente que mató al 99,9% de las bacterias que no produjeron colonias en el plato [94,95].

Prueba de contacto directo

La prueba de difusión en disco de agar demuestra la inhibición del crecimiento de los microorganismos evaluados mientras que la prueba de contacto directo muestra actividad bactericida y microbicida. Beyth y col. sintetizó los polimeros antibacterianos que se formaron como nanopartículas reticuladas. Sus resultados de la disolución comportamiento y la difusión del disco de agar indicaron que la bioactividad de los compuestos no se debe a la liberación de compuestos al medio y que la actividad está asociada con contacto superficial [96].

La prueba de contacto directo es más nueva que la prueba de difusión en disco de agar, y las imágenes de biopelículas microbianas cultivadas en discos de resina son observado por microscopía confocal de barrido láser (CSLM), microscopía de fluorescencia y / o microscopía electrónica de barrido (SEM). Para las imágenes de fluorescencia de CSLM, la resina curada los discos se añaden a los vasos. Los recipientes se llenan con la respectiva suspensión de microorganismos a una concentración predeterminada. Después de 1 o 3 días (depende de la prueba), las biopelículas en los discos se lavan tres veces con fosfato tamponado solución salina (PBS) para eliminar las bacterias sueltas y luego se tiñen

utilizando una tinción comercial de viabilidad bacteriana Live / Dead BacLight equipo. Finalmente, el crecimiento de las biopelículas en los discos de resina curada. (discos marcados con fluorescencia) se evalúa mediante escaneo confocal para obtener imágenes.

Cuando se conjuga con CLSM, Live / Dead BacLight puede emplearse para ilustrar la integridad de la membrana de las bacterias en los discos curados, facilitando así la investigación sobre la acción antimicrobiana de los agentes catiónicos inmovilizados que se cree que interrumpen la membrana citoplasmática [88,89]. La cual se escanea la capa bacteriana adherida a cada superficie de los discos. tanto en el canal verde (como excitación de 488 nm, verde emisión) para bacterias con membranas integrales y canal rojo (como excitación de 543 nm, emisión roja) para bacterias con membranas dañadas. Células de microorganismos vivos con las membranas intactas se tiñen de verde y las células muertas con las membranas dañadas se tiñen de rojo. Entonces, los resultados son analizados y calculados para cuantificar cada imagen en términos de la superficie total cubierta por bacterias vivas y muertas.

Materiales antimicrobianos

Hay muchos tipos de materiales, como QAC, Ag y ZnO, que pueden aportar actividad antibacteriana a los materiales dentales. Sevinc y Hanley [90] han demostrado que la combinación de las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP) al 10% en peso en compuestos dentales muestran actividad antibacteriana y reducen el crecimiento de biopelículas bacterianas contra *Streptococcus sobrinus* en aproximadamente un 80% para un modelo de biopelícula dental de una sola especie.

Las nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂) también son eficaces para inhibir el crecimiento. Por ejemplo, nanopartículas de TiO₂ incorporadas en un material de restauración de ionómero de vidrio convencional. Los materiales mostraron actividad antibacteriana contra *S. mutans* [100]. La mayoría de los ejemplos conocidos del relleno antimicrobiano inorgánico son nanopartículas de Ag.

En los últimos años, los compuestos de plata [101,102] y nanopartículas [103-105] se han estudiado por su actividad antimicrobiana como sustituto de los antibióticos [106]. Por

ejemplo, nano-Ag ha mostrado actividad antibacteriana en sistemas de resina acrílica autopolimerizables [107]. Jia y col. [108] utilizó nano-SiO₂ como portador para preparar materiales antibacterianos inorgánicos mediante el método de adsorción. Ponen Ag y Nanopartículas de Zn en las superficies porosas del nano-SiO₂.

Estos materiales demostraron la actividad contra *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. Sin embargo, el mayor inconveniente de estas partículas, del tamaño de nano o micro, es que no tienen enlaces químicos a la matriz que puedan lixiviar con el tiempo junto con otros materiales que pueden conducir a riesgos para la salud [61]. Por ejemplo, el elemento plata puede ser ionizado en presencia de agua, exudados tisulares o fluidos corporales y puede interactuar fácilmente con residuos de aminoácidos, proteínas, especialmente aquellos con grupos tiol, aniones libres y receptores en membranas celulares de mamíferos y eucariotas [108].

|

Capítulo III

Metodología

Materiales y Métodos

Reactivos

El óxido de Zinc se obtuvo a partir de Acetato de Zinc Dihidratado ($C_4H_6O_4Zn \cdot 2H_2O$, Sigma Aldrich), etanol (CH_3CH_2OH , CTR, USA.), hidróxido de amonio (NH_4OH , Sigma Aldrich, USA) y el óxido de zinc/óxido de calcio ($ZnO-CaO$) se obtuvo utilizando el precursor mencionado anteriormente y la sal de nitrato de calcio.

Síntesis de Materiales

La síntesis del material se obtuvo por el método Sol-gel. En un matraz de tres bocas se agregaron 14 g del precursor acetato de ~~zinc~~ zinc y 140 mL de etanol, la solución se ajustó a un pH neutro y se calentó a 120 °C durante 2 h, después se llevó a 0 °C durante 6 h. Finalmente la muestra se secó a 100 °C y se calcinó a 500 °C con una rampa de calentamiento de 2 °C/min, como se muestra en la figura 2.

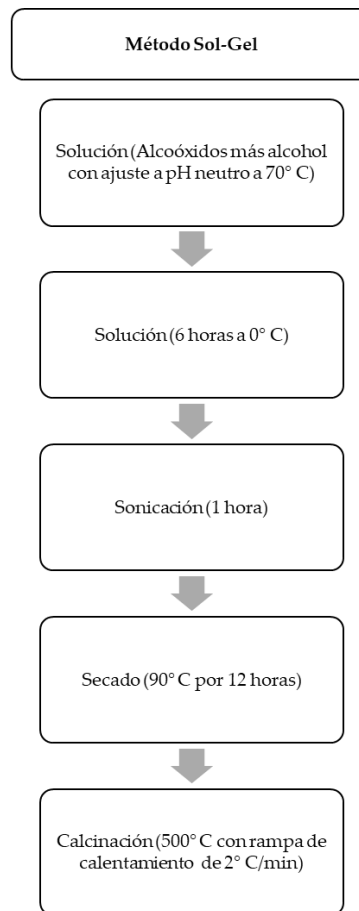


Figura 2. Diagrama de flujo del método sol-gel.

Caracterización de materiales

Microscopía Electrónica de Barrido

La morfología de las nanomateriales se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Tescan, MIRA 3LMU, Reino Unido) a 20 kV (figura 2).



Figura 3. Microscopio electrónico de barrido

Difracción de Rayos X

Los patrones de difracción de rayos X, se obtuvieron utilizando un difractómetro de la marca Panalytical modelo Empyrean, (Almelo, Netherland) equipado con radiación Cu K α ($\lambda = 0.154$ nm). La intensidad de difracción en función del ángulo (2θ) se midió entre 10° to 90° , usando un paso de 0.02° y un tiempo de conteo de 0.2 s por paso. Además, el tamaño promedio del cristal se determinó usando la ecuación de Scherrer (2), usando el pico más intenso para cada muestra (figura 3).

$$D = \frac{k}{\beta \cos \theta} \quad (2)$$

Donde D es el tamaño de cristal, k que equivale a la constante del coeficiente del factor de forma con un valor de 0.89, λ la longitud de onda de rayos X (0.154 nm), β es la mitad como máximo de la altura del pico de difracción del óxido metálico utilizado y θ es el ángulo de Bragg.

El espacio interplanar (d) se puede calcular a partir de la ley de Bragg (3):

$$2 d \sin \theta = n \cdot \lambda \quad (3)$$



Figura 4. Difractómetro de rayos X

Espectroscopia de UV-Vis con DRS

Los espectros de absorción UV-Vis DRS se obtuvieron con un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV-2600, Tokio, Japón) junto con una esfera de integración para estudios de reflectancia difusa. La absorción se midió en una longitud de onda de 190 a 900 nm (figura 4). A partir de la gráfica, se calculó la energía de banda prohibida utilizando la ecuación de Plank (1).

$$E_g = hc \quad (1)$$

Dónde, Energía (E_g) = Banda prohibida, constante de Planks (h) = $6,626 \times 10^{-34}$ Joules*s, Velocidad de la luz (C) = $2,99 \times 10^8$ m/s, y Longitud de onda (λ) = Valor del pico de absorción. El Factor de conversión se considera como: $1\text{eV} = 1,6 \times 10^{-19}$ Joules.



Figura 5. Espectrometro Uv-visible, shimadzu, uv-2600

Espectroscopia de Infrarrojo con reflectancia difusa

Los espectros de FT-IR de los materiales se llevaron a cabo en un espectrómetro ThermoFisher Scientific modelo Nicolet iS5, (Tokio, Japón) utilizando la Reflexión Total Atenuada (ATR). El espectro se realizó considerando los siguientes parámetros, 24 escaneos por paso y 4 cm^{-1} de resolución con una longitud de onda de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} (figura 5).



Figura 6. Espectrómetro de Infrarrojo, Thermo Scientific, Nicolet iS50

Actividad antimicrobiana

Se realizó un antibiograma por el método Kirby Bauer. Se inocularon los microorganismos en placas con agar específico para el crecimiento de cada tipo de bacteria. En las placas se colocaron discos impregnados con los tratamientos a concentraciones conocidas, así como los controles positivo y negativo. Las placas se incubaron según las condiciones de crecimiento de los microorganismos (37° C, 24 h).

Durante la incubación los tratamientos se difunden radialmente del disco al agar, esta difusión puede o no generar un diámetro de inhibición microbiano, que debe medirse para ser clasificado en las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por organismos encargados del control microbiológico, como el Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos (NCBI).

Finalmente, la zona de inhibición que se formó alrededor de los discos (diámetro) y se midió en milímetros (mm) para ser registrada, Figura 7. El procedimiento descrito anteriormente se repitió para cada tratamiento ZnO, ZnO-CaO al 1%, ZnO-CaO al 3% y ZnO-CaO al 5%.

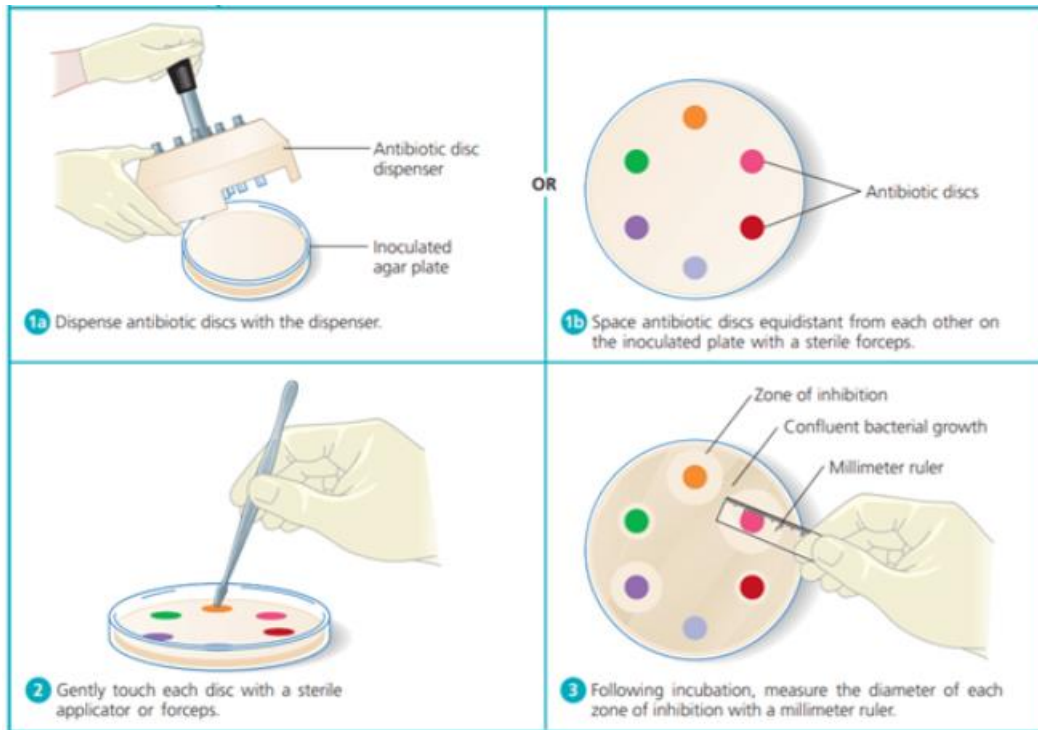


Figura 7. Método de difusión en disco.

Capítulo IV

Resultados y Discusión

En el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos, así como la discusión de los mismos.

Microscopía Electrónica de Barrido

En la figura 7 se presentan los resultados de las micrografías obtenidas del nanocomposito sintetizado, donde se puede apreciar en la figura 7a, las nanopartículas de ZnO con morfología esférica en su mayoría y otras en forma tipo cónicas y en forma hexagonal características de este nanomaterial, en la figura 7b, se aprecian las morfologías del nanocomposito de ZnO-CaO al 1% con estructuras en formas de barras y en los extremos la forma hexagonal característico del ZnO, en la figura 7c y 7d, ZnO-CaO al 3% y 5% respectivamente, se aprecian morfologías de forma hexagonal piramidal y esféricas, lo que nos sugiere que el CaO se encuentra disperso en la superficie del ZnO.

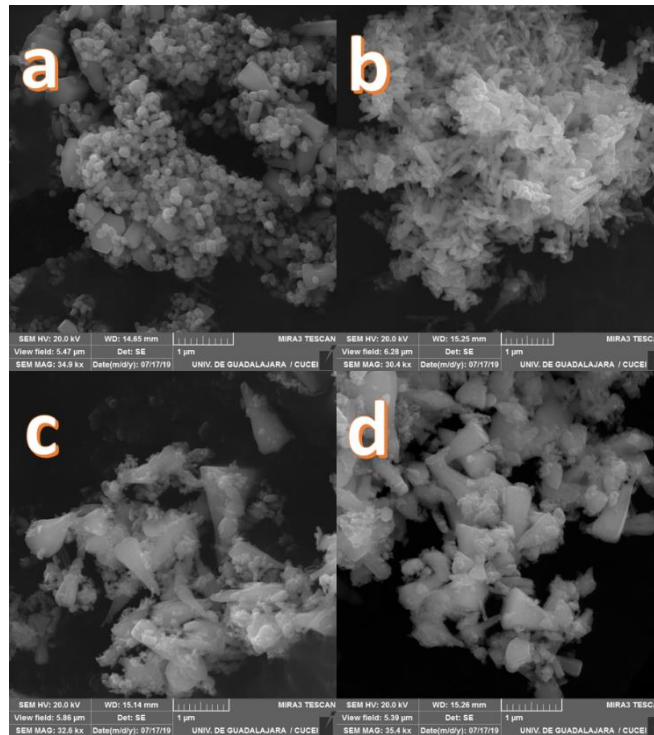


Figura 8. Microscopias de los nanomateriales ZnO-CaO, donde: a) ZnO, b) ZnO-CaO al 1%, c) ZnO-CaO al 3%, d) ZnO-CaO al 5%.

Difracción de Rayos X

En la Figura 8 se presentan los difractogramas del nanocomposito del ZnO-CaO, Los difractogramas presentan la fase hexagonal tipo wurtzita del ZnO (tarjeta JCPDS No. 89-1397) y los índices de Miller (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004) y (202), lo que nos sugiere que el CaO se encuentra disperso en la superficie del ZnO. Los patrones de difracción sugieren una alta cristalinidad de las nanopartículas ZnO-CaO.

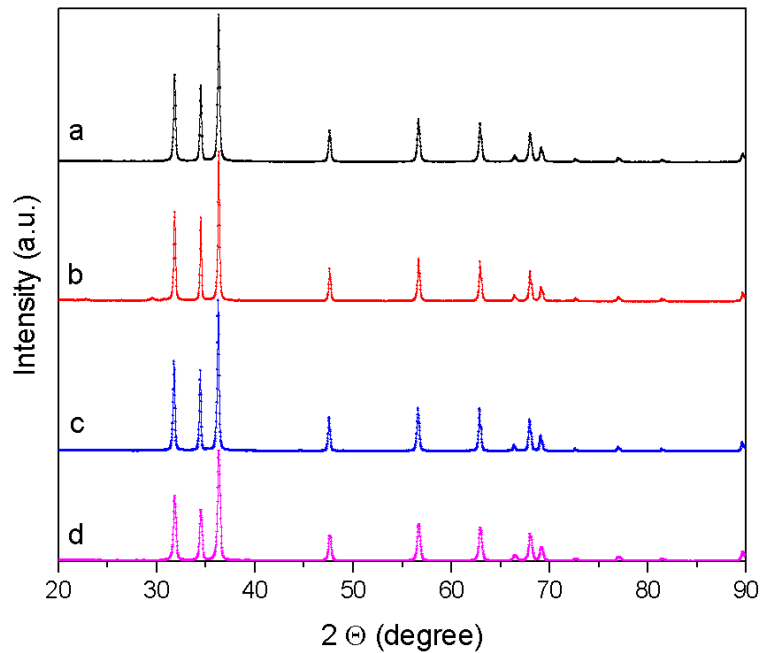


Figura 9. Difractogramas de los nanomateriales ZnO-CaO, donde: a) ZnO, b) ZnO-CaO al 1%, c) ZnO-CaO al 3%, d) ZnO-CaO al 5%.

Espectroscopia de UV-Vis con DRS

En la figura 9, se muestran los análisis por espectroscopia por UV-Vis utilizando reflectancia difusa. Se puede apreciar que todos los nanocompositos presentan y el nanocomposito al 3% presenta un desplazamiento a los 415 nm lo que nos sugiere una incorporación en la red del ZnO y una dispersión en la superficie del mismo, y con una E_g de 3.2 característico de este material.

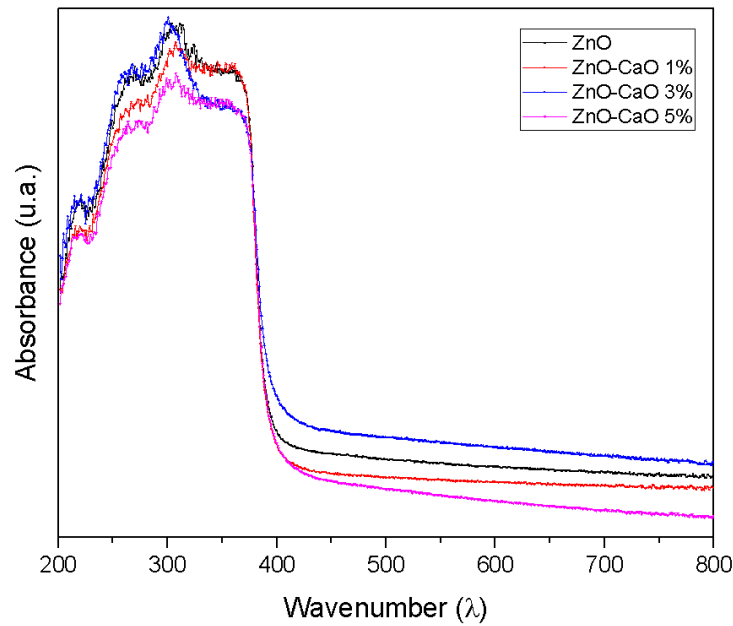


Figura 10. Espectros de UV-Vis de los nanomateriales ZnO-CaO, donde: a) ZnO, b) ZnO-CaO al 1%, c) ZnO-CaO al 3%, d) ZnO-CaO al 5%.

Actividad antimicrobiana

En lo referente a los resultados de la actividad inhibitoria de los materiales mediante el método Kirby Bauer, se obtuvieron las imágenes de la Figura 11 y 12. Se evaluó la actividad antimicrobiana de ZnO y ZnO-CaO, ambos a concentraciones de 100, 200, 300, 400, y 500 mg.

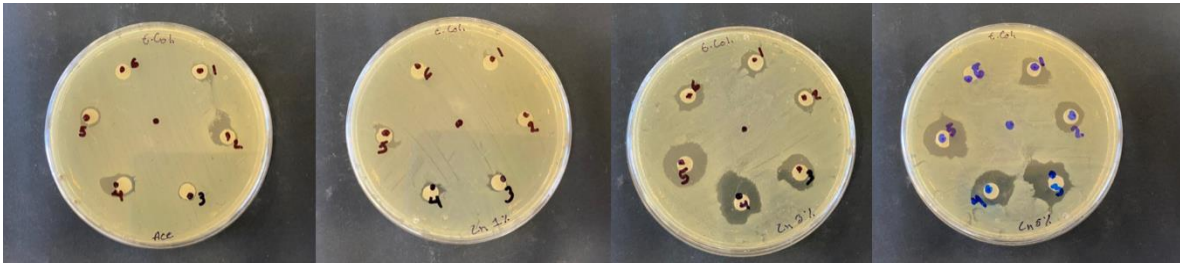


Figura 11. Antibiogramas de ZnO-CaO, *E. Coli*

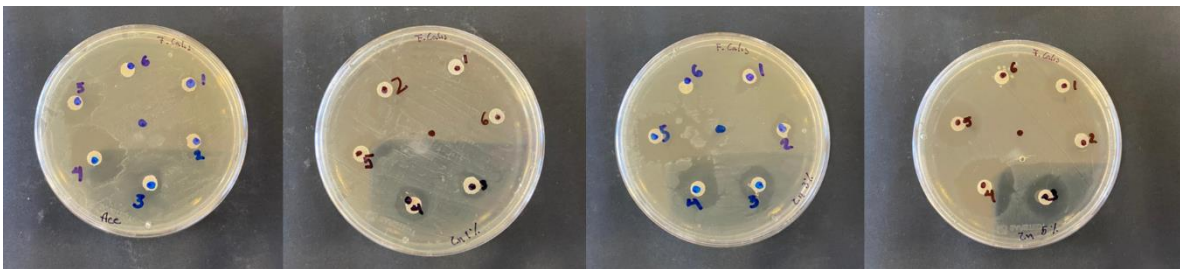


Figura 12. Antibiogramas de ZnO-CaO, *E. Faecalis*

De acuerdo a lo reportado en la Tabla 1, 2, 3, 4 y 5, en el material ZnO la concentración de 400 mg fue la que mejor actividad presentó para *E. Faecalis*. Mientras que para *E. Coli*, las concentraciones de 300 y 500 mg presentaron los mejores halos de inhibición. Para ambas bacterias el material de 100 mg de concentración presentó la actividad antimicrobiana más baja.

Estos resultados concuerdan con Kim y Cols [56], que en 2019 evaluaron la actividad antimicrobiana de películas que contenían ZnO y determinaron que, al aumentar la concentración, la actividad antimicrobiana de la película se volvía muy alta.

Para el material ZnO-CaO al 1% y 3% la concentración de 500 mg fue la mejor inhibiendo ambas bacterias (*E. Coli* y *E. Faecalis*) así como la concentración de 100 mg fue el tratamiento que menor actividad presentó.

Mientras que en el material ZnO-CaO al 5% la concentración con más actividad inhibitoria fue la de 400 mg para *E. Faecalis* y 300 mg para *E. Coli*. Nuevamente la concentración de 100 mg fue la que produjo menor actividad antimicrobiana.

Las propiedades antibacterianas del ZnO se atribuyen a las especies reactivas de oxígeno (ROS), que inhiben el crecimiento bacteriano, ya que las NP de ZnO descargan iones Zn^{2+} que atraviesan la pared celular y reaccionan con el contenido citoplasmático, además se sabe que las NP de ZnO producen H_2O_2 , que es un oxidante fuerte y es capaz de causar grandes daños en la membrana celular de las bacterias (56).

Tabla 1.

Material	<i>E. Faecalis</i>		<i>E. Coli</i>	
	100 mg			
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
ZnO	8.33	1.53	6.33	0.58
ZnO-CaO 1%	6.33	0	6.63	0.58
ZnO-CaO 3%	11	2.65	8.33	0.58
ZnO-CaO 5%	11.33	4.04	10	1

Tabla 2.

Material	<i>E. Faecalis</i>		<i>E. Coli</i>	
	200 mg			
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
ZnO	10.67	1.53	7.33	0.58
ZnO-CaO 1%	9	1	6.67	1.15
ZnO-CaO 3%	13.67	5.03	8.67	1.53
ZnO-CaO 5%	14	3.61	10	1.73

Tabla 3.

Material	<i>E. Faecalis</i>		<i>E. Coli</i>	
	300 mg			
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
ZnO	10	1	7.67	1.53
ZnO-CaO 1%	9	0.58	7.33	1.15
ZnO-CaO 3%	12.33	2.08	11.33	1.15
ZnO-CaO 5%	16.33	3.79	14.67	1.53

Tabla 4.

Material	<i>E. Feacalis</i>		<i>E. Coli</i>	
	400 mg			
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
ZnO	15.33	2.52	7.33	1.15
ZnO-CaO 1%	9.33	0.58	6.67	0.58
ZnO-CaO 3%	16.33	2.31	12	1.73
ZnO-CaO 5%	17.67	4.62	13	2

Tabla 5.

Material	<i>E. Feacalis</i>		<i>E. Coli</i>	
	500 mg			
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
ZnO	14.33	4.04	7.67	1.53
ZnO-CaO 1%	10.67	0.58	7.33	0.58
ZnO-CaO 3%	18.67	1.53	13.67	3.51
ZnO-CaO 5%	15.67	2.08	13.33	1.53

Capítulo V

Conclusiones

La síntesis de sol-gel proporciono una morfología esférica la cual fue benéfica en la actividad antimicrobiana.

Los valores de Eg mostraron un desplazamiento cuando se utiliza el CaO al 3%.

Para el material ZnO-CaO al 1% y 3% la concentración de 500 mg fue la mejor inhibiendo ambas bacterias (E. Coli y E. Faecalis). Mientras que en el material ZnO-CaO al 5% la concentración con más actividad inhibitoria fue la de 400 mg para E. Faecalis y 300 mg para E. Coli.

Referencias

- [1] Krzyściak, W.; Jurczak, A.; Kościelniak, D.; Bystrowska, B.; Skalniak, A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *33*, 499–515.
- [2] Jarvinen, H.; Tenovuo, J.; Huovinen, P. In vitro susceptibility of *Streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 1158–1159.
- [3] Daglia, M.; Papetti, A.; Grisoli, P.; Aceti, C.; Dacarro, C.; Gazzani, G. Antibacterial activity of red and white wine against oral streptococci. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5038–5042.
- [4] Walsh, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* **2000**, *406*, 775–781.
- [5] Khan, S.T.; Musarrat, J.; Al-Khedhairi, A.A. Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: Current status. *Colloids Surf. B* **2016**, *146*, 70–83.
- [6] Park, H.J.; Soomin, P.; Jinkyu, R.; Sujin, K.; Kyunghee, C.; Jongheop, Y.; Younghun, K.; Jeyong, Y. Biofilm-inactivating activity of silver nanoparticles: A comparison with silver ions. *J. Ind. Eng. Chem.* **2013**, *19*, 614–619.
- [7] Olivi, M.; Zanni, E.; De Bellis, G.; Talora, C.; Sarto, M.S.; Palleschi, C.; Flahaut, E.; Monthieux, M.; Rapino, S.; Uccelletti, D.; et al. Inhibition of microbial growth by carbon nanotube networks. *Nanoscale* **2013**, *5*, 9023–9029.
- [8] Akhavan, O.; Ghaderi, E. Photocatalytic Reduction of Graphene Oxide Nanosheets on TiO₂ Thin Film for Photoinactivation of Bacteria in Solar Light Irradiation. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 20214–20220.
- [9] Liu, J.; Liu, L.; Bai, H.; Wang, Y.; Sun, D.D. Gram-scale production of graphene oxide-TiO₂ nanorod composites: Towards high-activity photocatalytic materials. *Appl. Catal. B. Environ.* **2011**, *106*, 76–82.
- [10] Stankovich, S.; Dikin, D.A.; Dommett, G.H.; Kohlhaas, K.M.; Zimney, E.J.; Stach, E.A.; Piner, R.D.; Nguyen, S.T.; Ruoff, R.S. Graphene-based composite materials. *Nature* **2006**, *442*, 282–286.
- [11] Geim, A.K. Graphene: Status and Prospects. *Science* **2009**, *324*, 1530–1534.

De Bellis, G.; Tamburrano, A.; Dinescu, A.; Santarelli, M.L.; Sarto, M.S. Electromagnetic properties of composites containing graphite nanoplatelets at radio frequency. *Carbon* **2011**, *49*, 4291–4300.

[13] Zhu, Y.; Murali, S.; Cai, W.; Li, X.; Suk, J.W.; Potts, J.R.; Ruoff, R.S. Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 3906–3924.

[14] Huang, X.; Yin, Z.; Wu, S.; Qi, X.; He, Q.; Zhang, Q.; Yan, Q.; Boey, F.; Zhang, H. Graphene-Based Materials: Synthesis, Characterization, Properties, and Applications. *Small* **2011**, *7*, 1876–1902.

[15] Jiang, H.J. Chemical Preparation of Graphene-Based Nanomaterials and Their Applications in Chemical and Biological Sensors. *Small* **2011**, *7*, 2413–2427.

[16] Guo, S.J.; Dong, S.J. Graphene nanosheet: Synthesis, molecular engineering, thin film, hybrids, and energy and analytical applications. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2644–2672.

[17] Sun, X.; Liu, Z.; Welsher, K.; Robinson, J.T.; Goodwin, A.; Zaric, S.; Dai, H. Nanographene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano Res.* **2008**, *1*, 203–212.

[18] Hu, W.; Peng, C.; Luo, W.; Lv, M.; Li, X.; Li, D.; Huang, Q.; Fan, C. Graphene-Based Antibacterial Paper. *ACS Nano* **2010**, *4*, 4317–4323.

[19] Yang, K.; Zhang, S.; Zhang, G.; Sun, X.; Lee, S.T.; Liu, Z. Graphene in Mice: Ultrahigh In Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3318–3323.

[20] Zanni, E.; De Bellis, G.; Bracciale, M.P.; Broggi, A.; Santarelli, M.L.; Sarto, M.S.; Palleschi, C.; Uccelletti, D. Graphite Nanoplatelets and *Caenorhabditis elegans*: Insights from an in Vivo Model. *Nanoletters* **2012**, *12*, 2740–2744.

[21] Rago, I.; Bregnocchi, A.; Zanni, E.; D'Aloia, A.G.; de Angelis, F.; Bossu, M.; De Bellis, G.; Polimeni, A.; Uccelletti, D.; Sarto, M.S. Antimicrobial activity of graphene nanoplatelets against *Streptococcus mutans*. *Proc. IEEE NANO* **2015**.

[22] Wellings, J.S.; Chaure, N.B.; Heavens, S.N.; Dharmadasa, I.M. Growth and characterisation of electrodeposited ZnO thin films. *Thin Solid Films* **2008**, *516*, 3893–3898.

[23] Ma, M.G.; Zhu, Y.J.; Cheng, G.F.; Huang, Y.H. Microwave synthesis and characterization of ZnO with various morphologies. *Mater. Lett.* **2008**, *62*, 507–510.

[24] Burne R. Oral streptococci products of their environment. *Journal of Dental Research* **1998**; *77*:445–52.

- [25] Hernandez-Sierra JF, Ruiz F, Pena DC, Martinez-Gutierrez F, Martinez AE, Guillen Ade J, et al. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine* 2008;4:237–40.
- [26] ISO/TR 10993-22. Biological evaluation of medical devices—part 22: guidance on nanomaterials. International Organization for Standardization; 2016.
- [27] ISO/TS 80004-1. Nanotechnologies – vocabulary – part 1: core terms. International Organization for Standardization; 2010.
- [28] ETPN Association. Nanomedicine—European Nanotechnology Platform; 2017.
- [29] Lomer MC, Hutchinson C, Volkert S, Greenfield SM, Catterall A, Thompson RP, et al. Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn’s disease. *Br J Nutr* 2004;92:947–55.
- [30] Bouwmeester H, Dekkers S, Noordam M, Hagens W, Bulder A, de Heer C, et al. Health impact of nanotechnologies in food production. Institute of Food Safety Wageningen University and Research Centre (RIKILT) and National Institute for Public Health & the Environment (RIVM); 2007.
- [31] Chaudhry Q, Scotter M, Blackburn J, Ross B, Boxall A, Castle L, et al. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Addit Contam A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2008;25:241–58.
- [32] Greßler S, Gaszó A, Simkó M, Nentwich M, Fiedeler U. Nanopartikel und nanostrukturierte Materialien in der Lebensmittelindustrie. *NanoTrust Dossiers* 2008;004.
- [33] Hoffbauer J. Verwendung von Nanopartikeln in Lebensmitteln und Kosmetika—Statusbericht. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2008;3:290–3.
- [34] Kohlhuber M, Winterhalter R, Dietrich S, Schenten J, Franz R, Kemmer D, et al. Nanomaterialien in Lebensmitteln und Verbraucherprodukten Anwendungsbereiche, Analytik, rechtliche Rahmenbedingungen. Band 24 der Schriftenreihe Gesundheit und Umwelt. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL); 2012.

- [35] Besinis A, De Peralta T, Tredwin CJ, Handy RD. Review of nanomaterials in dentistry: interactions with the oral microenvironment, clinical applications, hazards, and benefits. *ACS Nano* 2015;9:2255–89.
- [36] Galler KM, D’Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res* 2011;23:333–9.
- [37] Rupf S, Berger H, Buchter A, Harth V, Ong MF, Hannig M. Exposure of patient and dental staff to fine and ultrafine particles from scanning spray. *Clin Oral Investig* 2015;19:823–30.
- [38] World Health Organisation (WHO). WHO Guidelines on nanomaterials and workers’ health; 2017.
- [39] U.S. Food and Drug Administration (FDA). Nanotechnology programs at FDA; 2017.
- [40] Daszak, P.; Cunningham, A.A.; Hyatt, A.D. Emerging infectious diseases of wildlife—Threats to biodiversity and human health. *Science* **2000**, 287, 443.
- [41] Oaks, S.C., Jr.; Shope, R.E.; Lederberg, J. *Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States*; National Academies Press: Cambridge, MA, USA, 1992.
- [42] Pantosti, A.; Sanchini, A.; Monaco, M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* **2007**, 2, 323–334.
- [43] Kumar, A.; Schweizer, H.P. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57, 1486–1513.
- [44] Huh, A.J.; Kwon, Y.J. Nanoantibiotics: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J. Control. Release* **2011**, 156, 128–145.
- [45] Pelgrift, R.Y.; Friedman, A.J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 65, 1803–1815.
- [46] Nel, A.E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E.M.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat. Mater.* **2009**, 8, 543–557.
- [47] Qin, L.; Zeng, G.; Lai, C.; Huang, D.; Xu, P.; Zhang, C.; Cheng, M.; Liu, X.; Liu, S.; Li, B.; et al. “Gold rush” in modern science: Fabrication strategies and typical advanced applications of gold nanoparticles in sensing. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, 359, 1–31.

- [48] Sirelkhatim, A.; Mahmud, S.; Seeni, A.; Kaus, N.H.M.; Ann, L.C.; Bakhori, S.K.M.; Hasan, H.; Mohamad, D. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Lett.* **2015**, *7*, 219–242.
- [49] Raghupathi, K.R.; Koodali, R.T.; Manna, A.C. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir* **2011**, *27*, 4020–4028.
- [50] Oves, M.; Aslam, M.; Rauf, M.A.; Qayyum, S.; Qari, H.A.; Khan, M.S.; Alam, M.Z.; Tabrez, S.; Pugazhendhi, A.; Ismail, I.M. Anti-microbial and anticancer activities of silver nanoparticles synthesized from the root hair extract of *Phoenix dactylifera*. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *89*, 429–443.
- [51] Pati, R.; Mehta, R.K.; Mohanty, S.; Padhi, A.; Sengupta, M.; Vaseeharan, B.; Goswami, C.; Sonawane, A. Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2014**, *10*, 1195–1208.
- [52] Hajipour, M.J.; Fromm, K.M.; Ashkarran, A.A.; de Aberasturi, D.J.; de Larramendi, I.R.; Rojo, T.; Serpooshan, V.; Parak, W.J.; Mahmoudi, M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 499–511.
- [53] Ghamsari, M.S.; Alamdari, S.; Han, W.; Park, H.H. Impact of nanostructured thin ZnO film in ultraviolet protection. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *12*, 207–216.
- [54] Zhang, G.; Xiao, Y.; Yan, J.; Xie, N.; Liu, R.; Zhang, Y. Ultraviolet light-degradation behavior and antibacterial activity of polypropylene/ZnO nanoparticles fibers. *Polymers* **2019**, *11*, 1841.
- [55] Fouda, A.; Hassan, S.E.D.; Salem, S.S.; Shaheen, T.I. In-vitro cytotoxicity, antibacterial, and UV protection properties of the biosynthesized Zinc oxide nanoparticles for medical textile applications. *Microb. Pathog.* **2018**, *125*, 252–261.
- [56] Kim, I.; Viswanathan, K.; Kasi, G.; Sadeghi, K.; Thanakkasaranee, S.; Seo, J. Poly(lactic Acid)/ZnO bionanocomposite films with positively charged ZnO as potential antimicrobial food packaging materials. *Polymers* **2019**, *11*, 1427.

- [57] Abbas, M.; Buntinx, M.; Deferme, W.; Peeters, R. (Bio)polymer/ZnO nanocomposites for packaging applications: A review of gas barrier and mechanical properties. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1494.
- [58] Tian M, Gao Y, Liu Y, Liao Y, Hedin NE, Fong H. Fabrication and evaluation of Bis-GMA/TEGDMA dental resins/composites containing nano fibrillar silicate. *Dent Mater* 2008;24:235–43.
- [59] Hosseinalipour M, Javadpour J, Rezaie H, Dadras T, Hayati AN. Investigation of mechanical properties of experimental bis-GMA/TEGDMA dental composite resins containing various mass fractions of silica nanoparticles. *J Prosthodont* 2010;19:112–7.
- [60] Chen M-H. Update on dental nanocomposites. *J Dent Res* 2010;89:549–60.
- [61] Durner J, Stojanovic M, Urcan E, Hickel R, Reichl F-X. Influence of silver nanoparticles on monomer elution from light-cured composites. *Dent Mater* 2011;27:631–6.
- [62] Karabela MM, Sideridou ID. Effect of the structure of silane coupling agent on sorption characteristics of solvents by dental resin-nanocomposites. *Dent Mater* 2008;24:1631–9.
- [63] SK B. Mechanics of fracture in filled thermosetting resins. *Br Polym J* 1980;24—30.
- [64] Mohsen N, Craig R. Effect of silanation of fillers on their dispersability by monomer systems. *J Oral Rehabil* 1995;22:183–9.
- [65] Calais J, Soderholm K-J. Influence of filler type and water exposure on flexural strength of experimental composite resins. *J Dent Res* 1988;67:836–40.
- [66] Söderholm K-J. Degradation of glass filler in experimental composites. *J Dent Res* 1981;60:1867–75.
- [67] Matinlinna JP, Lassila LV, Özcan M, Yli-Urpo A, Vallittu PK. An introduction to silanes and their clinical applications in dentistry. *Int J Prosthodont* 2004:17.
- [68] Moszner N, Völkel T, von Clausbruch CS, Geiter E, Batliner N, Rheinberger V. Synthesis and hydrolytic condensation of new cross-linking alkoxy silane methacrylates and light-curing composites based upon the condensates. *Macromol Mat Eng* 2002;287:339–47.
- [69] Rebholz-Zaribaf N, Özcan M. Adhesion to zirconia as a function of primers/silane coupling agents, luting cement types, aging and test methods. *J Adhes Sci Technol* 2017;31:1408–21.
- [70] Mateo J, Bosch P, Lozano A. Reactivity of radicals derived from dimethylanilines in acrylic photopolymerization. *Macromolecules* 1994;27:7794–9.

- [71] Jakubiak J, Allonas X, Fouassier J, Sionkowska A, Andrzejewska E, Linden L, et al. Camphorquinone–amines photoinitiating systems for the initiation of free radical polymerization. *Polymer* 2003;44:5219–26.
- [72] Moszner N, Klapdohr S. Nanotechnology for dental composites. *Int J Nanotechnol* 2004;1:130–56.
- [73] Jakubiak J, Nie J, Lindén LÅ, Rabek J. Crosslinking photocopolymerization of acrylic acid (and N-vinylpyrrolidone) with triethyleneglycol dimethacrylate initiated by camphorquinone/ethyl-4-dimethylaminobenzoate. *J Polym Sci A Polym Chem* 2000;38:876–86.
- [74] Jakubiak J, Sionkowska A, Lindén L-Å, Rabek J. Isothermal photo differential scanning calorimetry. Crosslinking polymerization of multifunctional monomers in presence of visible light photoinitiators. *J Therm Anal Calorim* 2001;65:435.
- [75] Liu F, Jiang X, Bao S, Wang R, Sun B, Zhu M. Effect of hydroxyapatite whisker surface graft polymerization on water sorption, solubility and bioactivity of the dental resin composite. *Mat Sci Engin* 2015;53:150–5.
- [76] Shin D-H, Rawls HR. Degree of conversion and color stability of the light curing resin with new photoinitiator systems. *Dent Mater* 2009;25:1030–8.
- [77] Neumann MG, Schmitt CC, Ferreira GC, Corrêa IC. The initiating radical yields and the efficiency of polymerization for various dental photoinitiators excited by different light curing units. *Dent Mater* 2006;22:576–84.
- [78] Elguezabal N, Maza J, Ponton J. Inhibition of adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to a resin composite restorative dental material by salivary secretory IgA and monoclonal antibodies. *Oral Dis* 2004;10:81–6.
- [79] Gong S-q, Niu L-n, Kemp LK, Yiu CK, Ryou H, Qi Y-p, et al. Quaternary ammonium silane-functionalized, methacrylate resin composition with antimicrobial activities and self-repair potential. *Acta Biomater* 2012;8:3270–82.
- [80] Mo S-s, Bao W, Lai G-y, Wang J, Li M-y. The microfloral analysis of secondary caries biofilm around Class I and Class II composite and amalgam fillings. *BMC Infect Dis* 2010;10:241.
- [81] Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol* 2011;49:171.

- [82] Nagashima S, Yoshida A, Ansai T, Watari H, Notomi T, Maki K, et al. Rapid detection of the cariogenic pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* using loop-mediated isothermal amplification. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:361–8.
- [83] Oda Y, Hayashi F, Wakita A, Nagatani Y, Okada M. Five-year longitudinal study of dental caries risk associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in individuals with intellectual disabilities. *J Oral Sci* 2017;59:39–46.
- [84] Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process ecological perspectives. *J Dent Res* 2011;90:294–303.
- [85] Makvandi P, Ghaemy M, Mohseni M. Synthesis and characterization of photo-curable bis-quaternary ammonium dimethacrylate with antimicrobial activity for dental restoration materials. *Eur Polym J* 2016;74:81–90.
- [86] Li F, Weir MD, Fouad AF, Xu HH. Effect of salivary pellicle on antibacterial activity of novel antibacterial dental adhesives using a dental plaque microcosm biofilm model. *Dent Mater* 2014;30:182–91.
- [87] Kawahara K, Tsuruda K, Morishita M, Uchida M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent Mater* 2000;16:452–5.
- [88] Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater* 2003;19:449–57.
- [89] Yap A, Khor E, Foo S. Fluoride release and antibacterial properties of new-generation tooth colored restoratives. *Oper Dent* 1999;24:297–305.
- [90] Sevinc, BA, Hanley L. Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;94:22–31
- [91] Imazato S. Bio-active restorative materials with antibacterial effects: new dimension of innovation in restorative dentistry. *Dent Mater J* 2009;28:11–9.
- [92] Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe J, Russell R. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J Dent Res* 1994;73:1437–43.
- [93] Imazato S, Russell R, McCabe J. Antibacterial activity of MDPB polymer incorporated in dental resin. *J Dent* 1995;23:177–81.
- [94] Imazato S, Ebi N, Tarumi H, Russell RR, Kaneko T, Ebisu S. Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. *Biomaterials* 1999;20:899–903.

- [95] Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. *Dent Mater* 2006;22:527–32.
- [96] Beyth N, Yudovin-Farber I, Bahir R, Domb AJ, Weiss EI. Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Biomaterials* 2006;27:3995–4002.
- [97] Filoche SK, Coleman MJ, Angker L, Sissons CH. A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. *J Microbiol Methods* 2007;69:489–96.
- [98] Van der Mei H, White D, Ateman-Smit J, De Belt-Gritter V, Busscher H. A method to study sustained antimicrobial activity of rinse and dentifrice components on biofilm viability in vivo. *J Clin Periodontol* 2006;33:14–20.
- [99] Li F, Chen J, Chai Z, Zhang L, Xiao Y, Fang M, et al. Effects of a dental adhesive incorporating antibacterial monomer on the growth, adherence and membrane integrity of *Streptococcus mutans*. *J Dent* 2009;37:289–96.
- [100] Elsaka SE, Hamouda IM, Swain MV. Titanium dioxide nanoparticles addition to a conventional glass-ionomer restorative: influence on physical and antibacterial properties. *J Dent* 2011;39:589–98.
- [101] Ahmad S, Isab AA, Ali S, Al-Arfaj AR. Perspectives in bioinorganic chemistry of some metal based therapeutic agents. *Polyhedron* 2006;25:1633–45.
- [102] Kasuga NC, Yamamoto R, Hara A, Amano A, Nomiya K. Molecular design, crystal structure, antimicrobial activity and reactivity of light-stable and water-soluble Ag–O bonding silver (I) complexes, dinuclear silver (I) N-acetylglycinate. *Inorg Chim Acta* 2006;359:4412–6.
- [103] Makvandi P, Nikfarjam N, Sanjani N, Qazvini N. Effect of silver nanoparticle on the properties of poly(methyl methacrylate) nanocomposite network made by in situ photoiniferter-mediated photopolymerization. *Bull Mater Sci* 2015;38:1625–31.
- [104] Li W-R, Xie X-B, Shi Q-S, Zeng H-Y, You-Sheng O-Y, Chen Y-B. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;85:1115–22.
- [105] Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci* 2009;145:83–96.

- [106] Slenters TV, Hauser-Gerspach I, Daniels AU, Fromm KM. Silver coordination compounds as light-stable, nano-structured and anti-bacterial coatings for dental implant and restorative materials. *J Mater Chem* 2008;18:5359–62.
- [107] Kassae MZ, Akhavan A, Sheikh N, Sodagar A. Antibacterial effects of a new dental acrylic resin containing silver nanoparticles. *J Appl Polym Sci* 2008;110:1699–703.
- [108] Jia H, Hou W, Wei L, Xu B, Liu X. The structures and antibacterial properties of nano-SiO₂ supported silver/zinc-silver materials. *Dent Mater* 2008;24: 244–9.
- [109] Lansdown A. Silver. 2: toxicity in mammals and how its products aid wound repair. *J Wound Care* 2002;11:173–7.