

Nanopartículas de plata contra bacterias presentes en *biofilm* dental de pacientes pediátricos.

Silver nanoparticles against bacteria present in dental biofilm of pediatric patients.

Mariana Goretti Pérez Sáenz,* Mariana Valenzuela Chacón,‡ Diana Juana García Zamarrón,§ Daniel Alberto Constandse Cortés,§ Salvador Nava Martínez,§ Juan Carlos Cuevas González,¶ Alejandro Donohue Cornejo,¶ Karla Lizette Tovar Carrillo,¶ León Francisco Espinosa Cristóbal¶

RESUMEN

Introducción: el *biofilm* dental microbiano es el precursor de diversas enfermedades orales, una de ellas la caries, ésta representa la enfermedad oral más significativa a nivel mundial, con una incidencia de 1.76 billones de niños afectados. Las nanopartículas de plata (AgNPs) se están usando como alternativa para el control y prevención del *biofilm* dental, ya que poseen propiedades antimicrobianas contra bacterias relacionadas a estas enfermedades. Sin embargo, no hay estudios que evalúen este comportamiento en pacientes pediátricos. **Objetivo:** evaluar la actividad antimicrobiana de las AgNPs en bacterias de aislados clínicos tomados de pacientes pediátricos. **Material y métodos:** se tomó muestra del *biofilm* dental de 22 pacientes pediátricos, el efecto microbiológico se evaluó mediante ensayos microbiológicos estandarizados internacionalmente por triplicado, usando dos diferentes tamaños de AgNPs. **Resultados:** los dos tamaños de AgNPs mostraron inhibición bacteriana, sin embargo, sólo se vio una diferencia estadísticamente significativa entre el género ($p < 0.05$), además, en general, hubo una correlación positiva significativa en relación a la concentración de las AgNPs y la velocidad del crecimiento bacteriano ($p < 0.05$). **Conclusión:** las AgNPs se pueden considerar como una alternativa para la prevención del *biofilm* dental y de esta manera para el control de diferentes enfermedades orales.

Palabras clave: *biofilm* dental, nanopartículas de plata, caries, odontopediatría.

ABSTRACT

Introduction: dental biofilm is the precursor of oral diseases, one of them dental caries, this represents the most significant oral disease worldwide with an incidence of 1.76 billion affected children. Silver nanoparticles (AgNPs) are being used as an alternative for the control and prevention of dental biofilm since they have antimicrobial properties against bacteria related to these diseases. However, there are no studies evaluating this behavior in pediatric patients. **Objective:** to evaluate the antimicrobial activity of AgNPs in bacteria from clinical isolates taken from pediatric patients. **Material and methods:** a sample of dental biofilm was taken from 22 pediatric patients, the microbiological effect was evaluated by international standardized microbiological tests in triplicate, using two different sizes of AgNPs. **Results:** the two sizes of AgNPs showed bacterial inhibition, however, only a statistically significant difference was seen between gender ($p < 0.05$), in addition, in general, there was a significant positive correlation in relation to the concentration of AgNPs and the speed bacterial growth ($p < 0.05$). **Conclusion:** AgNPs can be considered as an alternative for the prevention of dental biofilm and thus for the control of different oral diseases.

Keywords: dental biofilm, silver nanoparticles, caries, pediatric dentist.

* Alumna de maestría en ciencias odontológicas. Facultad de odontología.

‡ Programa de cirujano dentista. Facultad de odontología.

§ Especialidad de endodoncia. Facultad de odontología.

¶ Profesor Investigador del Departamento de Estomatología. Instituto de Ciencias Biomédicas.

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Ciudad Juárez, Chihuahua. México.

Recibido: 09 de febrero de 2022. Aceptado: 21 de julio 2022.

Citar como: Pérez SMG, Valenzuela CM, García ZDJ, Constandse CDA, Nava MS, Cuevas GJC et al. Nanopartículas de plata contra bacterias presentes en *biofilm* dental de pacientes pediátricos. Rev ADM. 2022; 79 (4): 198-203. <https://dx.doi.org/10.35366/106912>



INTRODUCCIÓN

El *biofilm* dental es considerado hoy en día como el precursor de diferentes enfermedades orales como lo son la caries y las enfermedades periodontales.¹ Esta es una microcomunidad compleja de diversas especies bacterianas que se reproducen y se adhieren firmemente a las diferentes superficies de los dientes, formando una estructura bien organizada.² Particularmente, la caries representa una de las enfermedades orales más significativas y frecuentes a nivel mundial con una incidencia de 1.76 billones de niños, principalmente afectando dientes deciduos.³ Estudios han demostrado que una dieta rica en azúcares aumenta considerablemente el riesgo de padecer esta enfermedad.⁴ Se sabe que la cavidad oral está constituida por diversas especies de microorganismos, entre ellos se destaca el *Streptococcus mutans*, la cual es una bacteria Gram positiva anaerobia facultativa asociada con el inicio y desarrollo de la caries.⁵ El principal mecanismo de cariogenicidad de esta bacteria se presenta por la capacidad que tiene de sintetizar grandes cantidades de polímeros extracelulares denominados glucano y secundariamente de fructanos a partir de sacarosa, lo cual ayuda a la colonización permanente de superficies duras y en el desarrollo de la matriz polimérica extracelular insoluble principalmente, además de metabolizar y transportar un amplio número de carbohidratos en ácidos orgánicos (teicoico y lipoteicoico) y adicionalmente sobrevivir en ambientes significativamente bajos.⁵

Hoy en día, existen diferentes tratamientos para controlar la formación y organización del *biofilm* dental. En los últimos años, el uso de terapéuticas a base de fluoruros (agua, sal común, enjuagues bucales, pasta dental, barnices, cementos dentales y otros) han demostrado ser una de las principales terapéuticas más eficientes en la prevención de la caries;^{1,4,6} sin embargo, otros tratamientos preventivos a base de colutorios antimicrobianos, profilaxis realizadas por profesionales, dieta baja en azúcares, selladores de fosetas y fisuras, hábitos y uso adecuado de herramientas durante la higiene bucal, entre otros, también han demostrado un adecuado control en la formación y constitución de la biopelícula dental.⁶ A pesar de la gran disponibilidad de estas medidas de higiene bucal, el control de la biopelícula dental para la prevención de la caries, continúa siendo un reto considerablemente alto, debido a que la prevalencia e incidencia de la caries es considerada todavía un serio problema de salud pública en el mundo, principalmente en pacientes pediátricos.⁷ Por esta razón, es necesario explorar nuevas alternativas que ayuden al control en

la formación de la biopelícula dental como responsable directo del desarrollo de la caries.

La nanotecnología ha ayudado al estudio, síntesis, diseño, manipulación y aplicación de materiales a una escala nanométrica (1-100 nm), potencializando sus características químicas y físicas para el mejoramiento de las terapéuticas dirigidas al área biomédica.⁸⁻¹⁰ Las nanopartículas de plata (AgNPs) representan uno de los principales materiales utilizados para el control de diversas enfermedades, debido a su gran efecto antimicrobiano en distintas especies, incluyendo bacterias orales como el *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Enterococcus faecalis*, entre otros.¹¹ Aunque diversos estudios han demostrado que las AgNPs pueden actuar en la inhibición de crecimiento de diversas biopelículas bacterianas, incluyendo algunos tipos de *biofilm* oral,^{9,11} actualmente no existe información científica disponible que haya determinado el efecto antimicrobiano de las AgNPs en muestras de *biofilm* dentales tomados directamente de pacientes pediátricos con enfermedades relacionadas a la presencia de biopelícula dental, principalmente la caries. El propósito de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de las AgNPs contra muestras de *biofilm* dental aislada de pacientes pediátricos con y sin caries

MATERIAL Y MÉTODOS

Síntesis de nanopartículas de plata

Se prepararon dos tamaños de AgNPs siguiendo un método modificado reportado por Martínez-Castañón.⁹ Todas las preparaciones se realizaron a 0.001 M AgNO₃ en 250 mL de solución salina. Con agitación magnética se añadió a la solución de Ag 10 mL de agua desionizada con ácido gálico. Después de añadir el ácido gálico, el valor del pH de la solución se ajustó inmediatamente, (para las AgNPs pequeñas el pH se elevó a 11 con NaOH 1.0 M y para las AgNPs grandes el pH se elevó a 10 con NHOH).

Caracterización de AgNPs. Las nanopartículas de plata obtenidas se caracterizaron utilizando dispersión dinámica de luz en un Malvern Zetasizer Nano ZS.

Pruebas antimicrobianas

La muestra de la biopelícula dental fue recolectada con la ayuda de un palillo de madera previamente esterilizado, se tomó de 22 pacientes infantiles, de una edad promedio de 7.4 ± 3.5 , algunos pacientes presentaban caries y

otros no. Una vez cultivada la muestra, se estandarizó la concentración de la suspensión a través de espectrometría hasta obtener una concentración de 1.3×10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Las muestras de biopelícula dental fueron cultivadas en caldo Müller-Hinton (MH) 18 horas a 37°C antes de la prueba. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se hizo en placas de microdilución de 96 pocillos, se colocaron 200 μl de AgNPs en la primera columna y se realizó la dilución 1:1 con MH, se inocularon con suspensiones estandarizadas de cada muestra que contenían 1.3×10^6 UFC/mL; finalmente, las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. El último pozo que presentó turbidez se consideró como la concentración mínima inhibitoria (CMI).¹²

RESULTADOS

Caracterización de nanopartículas de plata (DLS)

Se obtuvieron dos tamaños diferentes de AgNPs, pequeñas (10.2 ± 22.71 nm) y grandes (29.3 ± 36.35 nm) de forma esférica. La concentración de AgNPs que se usó fue de 1,070 $\mu\text{g/mL}$, en cuanto al potencial Zeta mostraron tener cargas eléctricas negativas, bien definidas, intensas y estables que ofrecen características para evitar la aglomeración (-48.4 ± 6.96 y -52.6 ± 8.51 mV, respectivamente). Lo anterior confirma la presencia de partículas nanoestructuradas a base de plata con tamaños y forma bien definidos, así como características eléctricas que sugieren una buena estabilidad y distribución de las partículas en el medio acuoso.

Tabla 1: Distribución de la población. N = 22.

VARIABLES	n (%)
Edad*	7.4 \pm 3.5
Sexo	
Hombres	11 (50.0)
Mujeres	11 (50.0)
Caries	14 (63.6)
Hombres	6 (42.9)
Mujeres	8 (57.1)
Sin caries	8 (36.3)
Hombres	5 (62.5)
Mujeres	3 (37.5)

*La edad es expresada en promedio y desviación estándar de acuerdo con los años cumplidos.

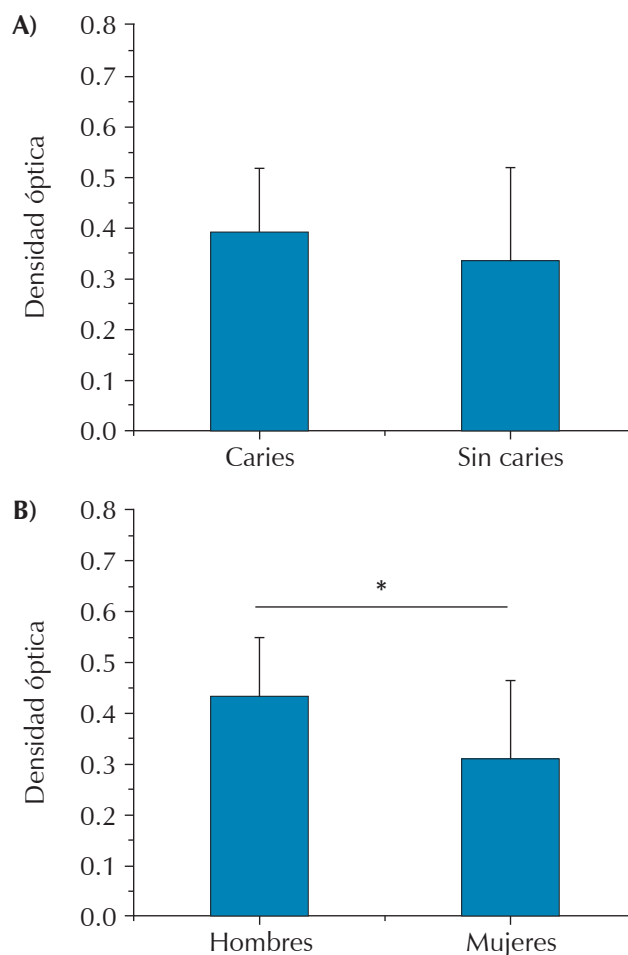


Figura 1: Crecimiento inicial bacteriano.

En la *tabla 1* se muestra la descripción general de la población estudiada que fue de 22 pacientes pediátricos.

El crecimiento inicial bacteriano se evaluó mediante densidad óptica, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que presentaron caries y los que no (*Figura 1A*). Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres, lo cual apunta a una tendencia en la que los hombres presentan mayor resistencia bacteriana comparado con las mujeres (*Figura 1B*).

Se evaluó el crecimiento bacteriano entre los dos tamaños de AgNPs (10.2 nm y 29.3 nm) y a pesar de que las AgNPs grandes (29.3 nm) mostraron mayor resistencia antimicrobiana, no hubo diferencias significativas (*Figura 2A*), a su vez se compararon los dos tamaños de nanopartículas con respecto al sexo, las AgNPs de menor tamaño (10.2 nm) no evidenciaron diferencias estadísticamente

significativas entre los pacientes hombres y mujeres, sin embargo, los microorganismos presentes en las muestras de los pacientes hombres mostraron una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la resistencia a las AgNPs más grandes (29.3 nm) (Figura 2B). Además, se encontró una correlación positiva significativa (0.000, $p < 0.05$) en cuanto a la concentración de tratamiento con la velocidad de crecimiento bacteriano (Figura 3).

DISCUSIÓN

Este estudio determinó que las AgNPs pueden inhibir el crecimiento bacteriano de la biopelícula dental de pacientes pediátricos, en la comparación de niños y niñas, los niños mostraron mayor resistencia a las AgNPs. Ambos tamaños de AgNPs tuvieron propiedades antimicrobianas

en todas las muestras, pero no mostraron diferencias significativas en su tamaño ni en la presencia de caries. Particularmente en las niñas, las partículas más grandes tuvieron mejor actividad que los niños. En general, las AgNPs mostraron una eficiente actividad antibacteriana para todas las muestras de aislados clínicos; sin embargo, el efecto antimicrobiano de las AgNPs podría relacionarse directamente con las características sociodemográficas de los sujetos, propiedades físico-químicas de las partículas y condiciones microbiológicas de las muestras.

Varios estudios han evaluado el efecto antimicrobiano de las AgNPs contra microorganismos relacionados con la cavidad oral,^{8,10-12} Sin embargo, no existen estudios científicos disponibles en los cuales se haya evaluado la actividad antimicrobiana de las AgNPs de biopelícula dental tomada de pacientes pediátricos. Diversos auto-

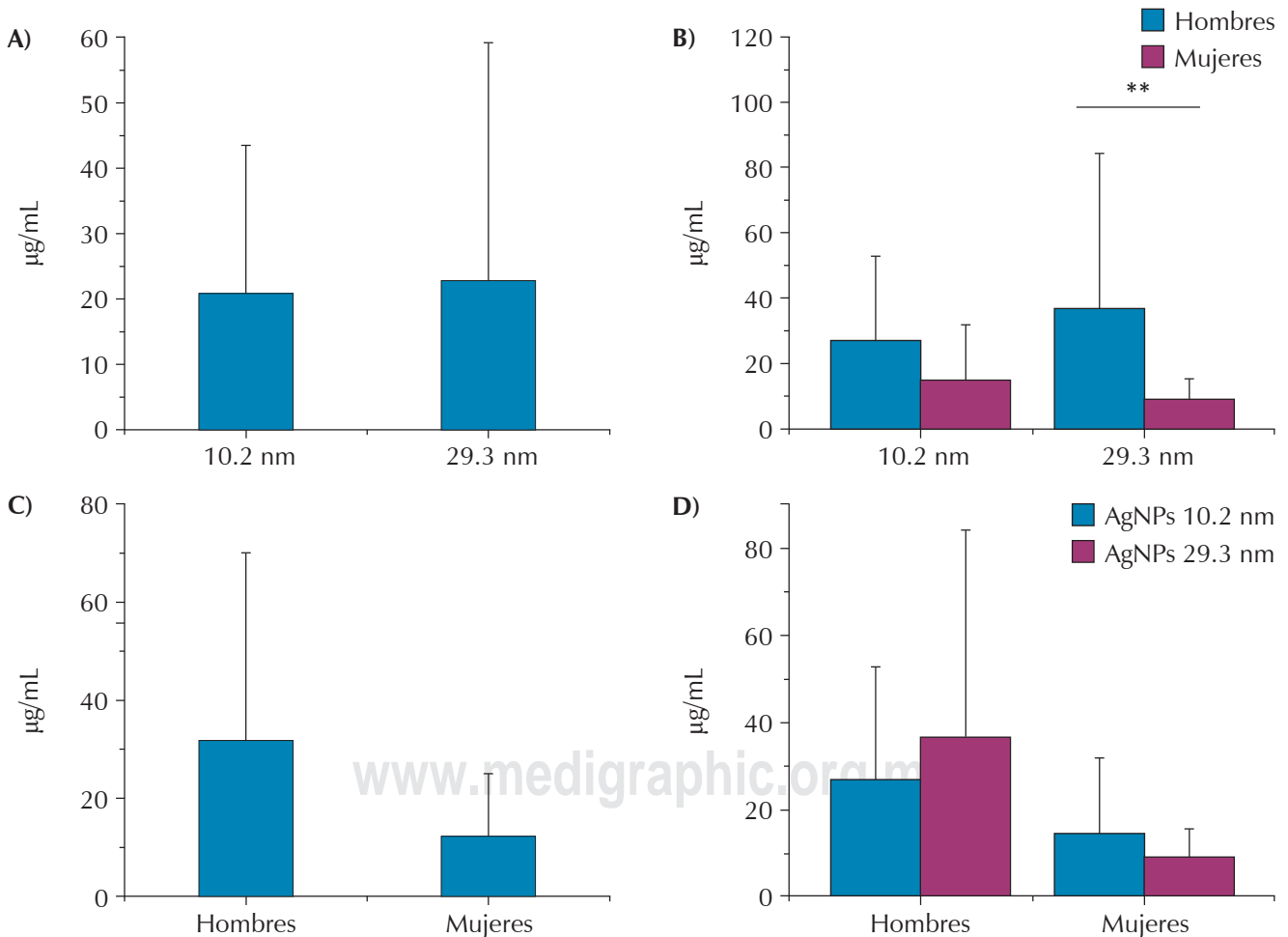


Figura 2: Actividad antimicrobiana.

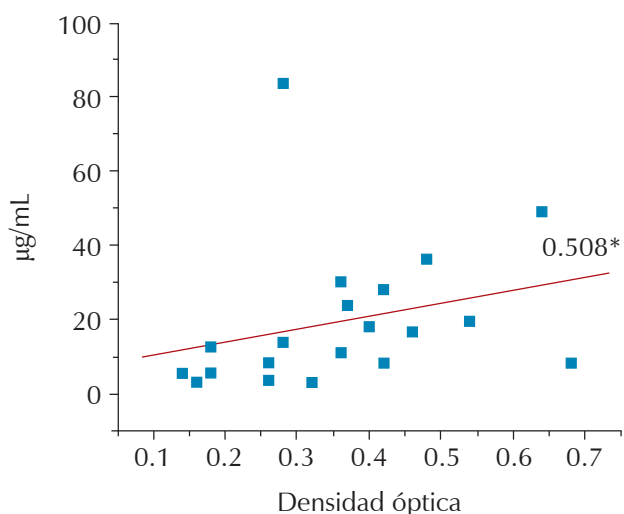


Figura 3: Correlaciones significativas de acuerdo a la concentración mínima inhibitoria. * $p \leq 0.05$.

res han demostrado que las AgNPs tienen un excelente efecto antimicrobiano en microorganismos no orales¹³⁻¹⁵ y orales,^{11,16,17} particularmente en bacterias asociadas con caries dental.^{18,19} La mayoría de estos estudios han utilizado microorganismos provenientes de cepas internacionales estandarizadas (ATCC, CECT, DSMZ y otras); sólo un número limitado de estudios ha definido cercanamente la actividad de las AgNPs en condiciones muy similares al nuestro. Uno de ellos es el publicado en el 2019, en el cual se determinó el efecto antimicrobiano de las AgNPs en aislados microbiológicos orales tomados de pacientes de una edad promedio de 23 años, donde el tamaño de las AgNPs y el potencial Z fue muy parecido al de nuestro estudio, donde la evaluación antimicrobiana se hizo a través de concentración mínima inhibitoria y ensayos de sustentividad, ellos encontraron que las AgNPs de menor tamaño tienen mayor actividad antimicrobiana, los ensayos de sustentividad también demostraron que en pacientes con caries activa y enfermedad periodontal las AgNPs de menor tamaño también tienen mejor actividad antimicrobiana.¹⁰ También en 2019 se publicó un estudio en el cual se evaluó la actividad antimicrobiana de las AgNPs de dos diferentes tamaños de 5 y 12 nm, con forma esférica y buena distribución en muestras de biopelícula dental de pacientes con caries y enfermedad periodontal, en este estudio encontraron que las AgNPs poseen una buena actividad antimicrobiana; no obstante, las de menor tamaño fueron más efectivas.¹² Los resultados de nuestro estudio sugieren que el efecto antimicrobiano de las AgNPs podría estar relacionado con la liberación

de iones de plata que interrumpen la membrana y pared celular de la bacteria, interrupción de la producción de ATP, que afecta a la replicación de ADN, y provoca la muerte celular.¹³ Las bacterias orales en su mayoría son Gram positivas, esto reafirma la efectividad de las AgNPs, ya que estas bacterias tienen una estructura compleja caracterizada por una capa de peptidoglucano gruesa.^{1,2}

Adicionalmente, existe evidencia que ha sugerido variaciones en los efectos antimicrobianos según el género, autores han reportado que los niños tienen conductas y características individuales muy diferentes a las niñas.⁷ La higiene bucal es uno de los factores que hacen énfasis a estas diferencias, debido a que existen variaciones en los niveles de higiene bucal, frecuencia y severidad de caries dental, entre otras anomalías bucodentales asociadas al género.^{1,7} Nuestros resultados indicaron que los niños necesitaron mayor cantidad de AgNPs en comparación de las niñas y, aunque no existieron diferencias significativas, existe una gran tendencia en la resistencia presentada principalmente por los niños y una sensibilidad a las AgNPs mayormente reflejada por las niñas. En otras palabras, el género podría representar un factor interesante con un papel que podría intervenir en el mecanismo antimicrobiano de las AgNPs. Es probable que el comportamiento microbiológico de las especies bacterianas distribuidas en las muestras particularmente en niños se encuentre asociado con la capacidad de reproducción bacteriana aumentada en periodos más cortos en comparación con las niñas (*Figura 1B*), pero también particularidades relacionadas con los hábitos de higiene, genéticas, características sociodemográficas, y por supuesto, las características físico-químicas de las AgNPs podrían también estar involucradas.^{16,19}

Finalmente, se recomienda hacer estudios con un mayor número de sujetos y muestras, la incorporación de un grupo de tratamiento considerado como estándar de oro y el uso de herramientas para la identificación y distribución de organismos específicos.

CONCLUSIONES

Las AgNPs se pueden considerar como una alternativa para el control de la biopelícula dental y de esta manera para la prevención de diferentes enfermedades orales en pacientes pediátricos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez y al departamento de Estomatología por las facilidades en la realización del estudio.

REFERENCIAS

- Davidovich E, Grender J, Zini A. Factors Associated with Dental Plaque, Gingivitis, and Caries in a Pediatric Population: A Records-Based Cross-Sectional Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17 (22): 8595. doi: 10.3390/ijerph17228595.
- Valm AM. The Structure of Dental Plaque Microbial Communities in the Transition from Health to Dental Caries and Periodontal Disease. *J Mol Biol*. 2019; 431 (16): 2957-2969. doi: 10.1016/j.jmb.2019.05.016.
- Kazemina M, Abdi A, Shohaimi S, Jalali R, Vaisi-Raygani A, Salari N, Mohammadi M. Dental caries in primary and permanent teeth in children's worldwide, 1995 to 2019: a systematic review and meta-analysis. *Head Face Med*. 2020; 16 (1): 22.
- Chi DL, Scott JM. Added Sugar and dental caries in children: A Scientific Update and Future Steps. *Dent Clin North Am*. 2019; 63 (1): 17-33. doi: 10.1016/j.cden.2018.08.003.
- Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, Abranches J, Brady LJ. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr*. 2019; 7 (1): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.
- Jepsen S, Blanco J, Buchalla W, Carvalho JC, Dietrich T, Dörfer C et al. Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2017; 44 (Suppl 18): S85-S93. doi: 10.1111/jcpe.12687.
- Aliakbari E, Gray-Burrows KA, Vinall-Collier KA, Edwebi S, Marshman Z, McEachan RRC et al. Home-based toothbrushing interventions for parents of young children to reduce dental caries: A systematic review. *Int J Paediatr Dent*. 2021; 31 (1): 37-79. doi: 10.1111/ipd.12658.
- Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*. 2019; 25 (1): 112. doi: 10.3390/molecules25010112.
- Martínez CGA, Niño MN, Martínez GF, Martínez MJR, Ruiz F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J Nanoparticle Res*. 2008; 10 (8): 1343-1348.
- Espinosa-Cristóbal LF, Holguín-Meráz C, Zaragoza-Contreras EA, Martínez-Martínez RE, Donohue-Cornejo A, Loyola-Rodríguez JP, et al. Antimicrobial and Substantivity Properties of Silver Nanoparticles against Oral Microbiomes Clinically Isolated from Young and Young-Adult Patients. *J Nanomater [Internet]*. 2019; 2019: 1-14. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2019/3205971/>
- Lee SH, Jun BH. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (4): 865. doi: 10.3390/ijms20040865.
- Gutiérrez D, Omar J, López R, Yobanny S, González C, Cornejo D, et al. Evaluación del efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata en placa dentobacteriana aislada de pacientes. 2019; 4 (suppl 2): 15-18
- Tang S, Zheng J. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. *Adv Healthc Mater*. 2018; 7 (13): e1701503. doi: 10.1002/adhm.201701503.
- Liao C, Li Y, Tjong SC. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (2): 449. doi: 10.3390/ijms20020449.
- Bruna T, Maldonado-Bravo F, Jara P, Caro N. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22 (13): 7202. <https://doi.org/10.3390/ijms22137202>
- Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J Nanomedicine*. 2020; 15: 2555-2562. doi: 10.2147/IJN.S246764.
- González-Luna PI, Martínez-Castanon GA, Zavala-Alonso NV, Patiño-Marin N, Niño-Martínez N, Morán-Martínez J, et al. Bactericide Effect of Silver Nanoparticles as a Final Irrigation Agent in Endodontics on *Enterococcus faecalis*: An Ex Vivo Study. *J Nanomater*. 2016; 2016: 1687-4110.
- Al-Ansari MM, Al-Dahmash ND, Ranjitsingh AJA. Synthesis of silver nanoparticles using gum Arabic: Evaluation of its inhibitory action on *Streptococcus mutans* causing dental caries and endocarditis. *J Infect Public Health*. 2021; 14 (3): 324-330. doi: 10.1016/j.jiph.2020.12.016.
- Fakhrudin KS, Egusa H, Ngo HC, Panduwawala C, Pesee S, Samaranyake LP. Clinical efficacy and the antimicrobial potential of silver formulations in arresting dental caries: a systematic review. *BMC Oral Health*. 2020; 20 (1):160. doi: 10.1186/s12903-020-01133-3.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Aspectos éticos: el estudio fue aprobado por el departamento de estomatología de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

Financiamiento: sin financiamiento.

Correspondencia:

León Francisco Espinosa Cristóbal

E-mail: leon.espinosa@uacj.mx