

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE UN  
NANOCOMPÓSITO A BASE DE PLATA/CARBOXIMETILCELULOSA Y EL  
HIPOCLORITO DE SODIO EN UN MODELO DE BIOFILM HETEROGÉNEO *IN*  
*VITRO* Y EN DISCOS DE DENTINA HUMANA

Por

ELIZABETH MADLA CRUZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2020

ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE UN  
NANOCOMPÓSITO A BASE DE PLATA/CARBOXIMETILCELULOSA Y EL  
HIPOCLORITO DE SODIO EN UN MODELO DE BIOFILM HETEROGÉNEO *IN*  
*VITRO* Y EN DISCOS DE DENTINA HUMANA

**COMITÉ DE TESIS**

---

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores

Presidente

---

Dra. Patricia Taméz Guerra

Secretario

---

Dr. Edgar Mendoza Gamboa

Vocal

---

Dr. Moisés A. Franco Molina

Vocal

---

Dr. Pablo Zapata Benavides

Vocal

ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE UN  
NANOCOMPÓSITO A BASE DE PLATA/CARBOXIMETILCELULOSA Y EL  
HIPOCLORITO DE SODIO EN UN MODELO DE BIOFILM HETEROGÉNEO *IN*  
*VITRO* Y EN DISCOS DE DENTINA HUMANA

**Dirección de Tesis**

---

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores

Director

---

Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos

Director externo

---

Dr. César Iván Romo Sáenz

Co-Director externo

## **AGRADECIMIENTOS**

Un agradecimiento especial a mi director de tesis el Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores por la oportunidad que me otorgo para continuar con mi preparación académica; siempre me sentiré muy agradecida y afortunada por todo el tiempo dedicado, las asesorías y las clases en las que fue mi maestro, sin duda una persona sumamente valiosa en la UANL y una excelente persona, MUCHAS GRACIAS.

Agradezco infinitamente a la Dra. Myriam Angelica de la Garza Ramos ya que fue mi fuente de inspiración, la cual siempre estuvo dispuesta a brindar su apoyo y accesibilidad durante todo este tiempo, LA QUIERO MUCHO.

Gracias al Dr. César Iván Romo Sáenz por su disponibilidad y ayuda para la culminación de este brillante proyecto, al cual respeto mucho su experiencia y su iniciativa para otorgar su valiosa colaboración y que sin él no hubiera sido posible, MUCHAS GRACIAS.

Al Dr. Marco Antonio Garza Navarro por colaborar en el presente proyecto en el cual siempre estuvo dispuesto a brindar sus valiosos conocimientos, otorgar acceso a su laboratorio y facilitarnos el equipo y material; un agradecimiento a Ángeles Martínez en la cual trabajamos hombro con hombro en el difícil pero bello arte de la ciencia, me enseñó el mundo de las nanopartículas y a Víctor Urrutia Baca que apoyó en parte de los experimentos, gracias por su tiempo y la colaboración desinteresada.

Al CONACYT, al Laboratorio de Inmunología y Virología, al CIDICS, al PIIT y finalmente gracias a cada persona que estuvo en mi camino para poder lograr este reto.

## DEDICATORIAS

Este trabajo se convirtió en uno de los más grandes retos mi vida, ya que el mezclar el trabajo, la docencia y el estudio requirieron un gran apoyo; detrás de cada labor que emprendía durante mis estudios han estado presentes mis padres **Ricardo Madla de la Garza y Hortensia Cruz Menchaca** y mi abuelita **Josefina de la Garza de Madla** (QEPD) a los cuales les dedico con todo mi corazón este trabajo ya que hubiera sido imposible haber cumplido este sueño sin su apoyo, los cuales estuvieron siempre presentes iluminando mi camino. Finalmente, a mi hermano **Ricardo Madla Cruz** y a mi gran amor **Alfonso Andrade Meléndez**.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE FIG.S.....	iv
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Periodontitis apical.....	4
2.2 Microbiota endodóctica.....	6
2.3 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	8
2.4 <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	8
2.5 <i>Candida albicans</i> .....	9
2.6 Biofilm en conducto radicular.....	9
2.7 Tratamiento de endodoncia.....	11
2.8 Irrigantes en endodoncia.....	12
2.9 Hipoclorito de sodio.....	13
2.10 Nanocompósito de plata.....	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPOTÉISIS.....	18
5. OBJETIVO.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
7. RESULTADOS.....	27
8. DISCUSIÓN.....	33

9. CONCLUSIÓN.....	36
10. PERPECTIVAS.....	37
11. BIBLIOGRAFÍA.....	38
12. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	49
13. ANEXOS.....	50
Artículo publicado.....	50

## ÍNDICE DE FIG.S

Fig. 1	Esquema de la preparación de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa .....	21
Fig. 2	Microplacas de fondo plano de 96 pozos.....	22
Fig. 3	Microscopio óptico.....	24
Fig. 4	Cortes de los discos de dentina.....	25
Fig. 5	Formación de biofilm heterogéneo sobre discos de dentina.....	26
Fig. 6	Procesado de imágenes para el análisis de partículas.....	27
Fig. 7	Caracterización de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa.....	28
Fig. 8	Efecto de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa sobre la viabilidad de HGF.....	29
Fig. 9	Actividad antimicrobiana de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa .....	30
Fig. 10	Fig. 10. Actividad anti-biofilm de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa.....	31
Fig. 11	Actividad anti-biofilm de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa sobre discos de dentina.....	32



## ABREVIATURAS

Ag	Plata
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de plata
AgNPs	Nanopartículas de plata
AgNPs/CMC	Nanopartículas de plata en carboximetilcelulosa
Å	Angstrom
ATTC	American Type Culture Collection
BHI	Infusión cerebro corazón
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HGF	Fibroblastos gingivales humanos
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
HSV-1	Virus del Herpes Simple
µL	Microlitro
mL	Mililitro
µg	Microgramo
MTT	Bromuro de (3-4,5 dimetil-2 tiazol)-2,5 difenil- 2H tetrazolio
NaClO	Hipoclorito de sodio
nm	Nanómetro
PBS	Amortiguador fosfato salino
SAED	Sistemas alternativos de elevación y desplazamiento
XEDS	Energy-dispersive X-ray spectroscopy

## RESUMEN

**Antecedentes:** Las infecciones endodónticas han aumentado en las últimas décadas, debido a la limitada eficacia de las soluciones de irrigación y a la formación de biofilm.

**Objetivo:** Evaluar la actividad biocida de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa (AgNPs/CMC) en biofilms heterogéneos *in vitro* y en discos de dentina humana, en comparación con el hipoclorito de sodio (NaClO). Evaluar la actividad antimicrobiana en un modelo de biofilm heterogéneo *in vitro*.

**Métodos:** El nanocompuesto de plata con carboximetilcelulosa se realizó mediante agitación constante a 90 °C, después de lo cual se examinó mediante microscopía electrónica de transmisión y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X. La actividad citotóxica se evaluó sobre células gingivales humanas mediante la técnica colorimétrica de la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. El efecto antimicrobiano de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa se evaluó sobre células planctónicas de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum* a las 24 h, mediante espectrofotometría a 600 nm. La actividad antibiofilm *in vitro* se evaluó en biofilm heterogéneo mediante microscopía óptica y epifluorescencia *in vitro*. Finalmente, se determinó la actividad antibiofilm en discos de dentina humano con un biofilm heterogéneo de estos microorganismos empleando el software Image J.

**Resultados:** Se sintetizaron compuestos de AgNPs/CMC casi esféricos, con un tamaño medio de partículas de 22.3 nm. Sesenta  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs/CMC y NaClO al 5.25% causaron 89% y 100% de citotoxicidad significativa ( $p < 0.05$ ) de fibroblastos gingivales humanos (HGF), respectivamente a concentraciones  $> 15 \mu\text{g/mL}$ . Además, 9.6  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs/CMC (concentración no tóxica para HGF) y 5.25% de NaClO inhibieron de manera significativa ( $p < 0.05$ ) 67% y 90%, 66% y 85%, y 96% y 92% el crecimiento de *C. albicans*, *E. faecalis* y *F. nucleatum* respectivamente. Además, se observó una

reducción significativa ( $p < 0.05$ ) del 58% de la formación de biofilm a 4.8  $\mu\text{g/mL}$  de nanocompósito en discos de dentina humana.

**Conclusión:** El nanocompósito AgNPs/CMC mostró actividad biocida contra la formación del biofilm heterogéneo por *C. albicans*, *E. faecalis* y *F. nucleatum in vitro* y biofilm heterogéneo en discos de dentina humana bajo condiciones aeróbicas, resultando una alternativa potencialmente efectiva para prevenir infecciones después del tratamiento endodóntico.

## ABSTRACT

**Background:** Endodontic infections have been increasing in the last decades, because of the limited efficiency of irrigation solutions.

**Aim:** To evaluate the biocidal activity of silver nanoparticles/carboxymethyl-cellulose (AgNPs/CMC) composites on *in vitro* and dentin disc heterogeneous biofilms, compared with sodium hypochlorite (NaClO).

**Methodology:** AgNPs/CMC composite and NaClO (1.875 to 60  $\mu\text{g/mL}$  and 0.164 to 5.25%, respectively) effects on normal human gingival fibroblast cells (HGF) viability was determined by the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT) colorimetric assay. In addition, antimicrobial effect of AgNPs/CMC composite and NaClO on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and *Fusobacterium nucleatum* growth *in vitro* and heterogeneous biofilms, as well as dentin disc biofilms was evaluated under aerobic conditions.

**Results:** Quasi-spherical AgNPs/CMC composites, with a mean 22.3 nm particle-size were synthesized. Sixty  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs/CMC composite and 5.25% NaClO caused significant ( $p < 0.05$ ) 89% and 100% cytotoxicity against HGF, respectively. In addition, 9.6  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs/CMC composite (non-toxic concentration to HGF) and 5.25% NaClO caused significant ( $p < 0.05$ ) 67% and 90%, 66% and 85%, and 96% and 92% growth inhibition against *C. albicans*, *E. faecalis*, and *F. nucleatum* respectively. It was also demonstrated anti-heterogeneous biofilm effect of 4.8  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs/CMC composite, similar than that produced by NaClO. Moreover, significant ( $p < 0.05$ ) reduction of dentin discs heterogeneous biofilm area by AgNPs/CMC composite (58% reduction) and NaClO (56% reduction) was observed.

**Conclusion** AgNPs/CMC composite showed biocidal activity against *C. albicans*, *E. faecalis*, and *F. nucleatum*-produced biofilm on *in vitro*, heterogeneous biofilms, and dentin disc heterogeneous biofilms under aerobic conditions, resulting a potentially effective alternative to prevent infections after endodontic treatment.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la cavidad oral donde se encuentran los órganos dentarios, se albergan alrededor de 600 especies bacterianas, que se adhieren y crecen sobre el diente en forma de biofilms, conocido como placa dentobacteriana; los órganos dentarios están compuestos por esmalte, dentina, cemento y pulpa, la superficie de los dientes que está expuesta al medio ambiente oral en una persona sana es el esmalte mientras que la pulpa dental está localizada en la parte central del diente y se extiende hasta la raíz; en condiciones normales el esmalte intacto y la dentina protegen a la pulpa, actuando como una barrera física al daño y contaminación bacteriana (Lamont y col., 2006).

Las bacterias están presentes en la saliva y en la cavidad oral de manera normal, cuando el medio ambiente oral proporciona condiciones adecuadas para romper el equilibrio de la ecología bacteriana se desarrollan infecciones dentales como caries y enfermedad periodontal, en condiciones normales, la pulpa dental y la dentina son estériles, aisladas de microorganismos por el esmalte y el cemento que recubren el diente, cuando se pierde la integridad del esmalte o cemento debido a caries, fracturas, tratamientos restauradores o desgaste queda expuesto el complejo dentinopulpar al medio oral y corre riesgo de ser infectado (Lamont y col., 2006).

Los microorganismos que invaden y colonizan el tejido pulpar provocan infecciones endodónticas, la extensión de la caries y la posterior invasión de bacterias a la pulpa es la causa más común de esta patología (Torabinejad y Walton, 2010). La periodontitis apical es una infección endodóntica causada por una proliferación de microorganismos a los tejidos perirradiculares que puede evolucionar a una entidad crónica que trae consigo pérdida de hueso y la posterior formación de un granuloma, absceso o quiste (Lin y col., 2007).

La finalidad del tratamiento de endodoncia es eliminar las bacterias del conducto radicular infectado, así como curar y prevenir la periodontitis apical; dicho objetivo se consigue tras la remoción química y mecánica del tejido orgánico, tejido necrótico, dentina infectada y microorganismos del sistema de conductos radiculares, con la finalidad de conservar los dientes naturales en función y estética (Peters y col., 2004). Estudios clínicos han demostrado que la preparación químico-mecánica es efectiva para la reducción de bacterias en el sistema de conductos, sin embargo la desinfección durante el tratamiento de endodoncia tiene limitación en virtud a la formación de biofilm, bacterias en el sistema de conductos, complejidad anatómica, estructura y composición de la dentina y las limitaciones químicas de los antimicrobianos (Siqueira y Rôças, 2014).

Los conductos radiculares infectados contienen poblaciones heterogéneas de microorganismos aerobios, anaerobios, Gram-positivos, Gram-negativos y hongos suspendidos en biofilms, el conducto radicular infectado posee un microambiente formado de varias especies microbianas, que al fijarse en la superficie dentinaria pueden llegar a formar biofilms, representando una causa común de infecciones persistentes (Nair, 2006).

La eliminación de los microorganismos del conducto radicular con infección es un claro objetivo del tratamiento de endodoncia. Sin embargo, estudios clínicos demuestran que, a pesar de la instrumentación mecánica y la desinfección del sistema de conductos, los microorganismos pueden permanecer y multiplicarse al término del tratamiento o durante las sesiones en que se lleve el procedimiento (Sundqvist y Figdor, 2003). Los desarrollos recientes en nanotecnología han impulsado la generación de nuevos materiales funcionales basados en nanoestructuras (Stathopoulou, 2018). Debido a que el efecto antimicrobiano de la plata es bien reconocido, los compuestos a base de plata se han utilizado ampliamente en muchas aplicaciones biocidas. En este sentido, el potencial bactericida, fungicida y antiviral de las nanopartículas de plata (AgNP) es bien reconocido (Stathopoulou, 2018).

Por lo cual el presente estudio va dirigido a evaluar la actividad antimicrobiana de un nanocompósito de plata/carboximetilcelulosa en un biofilm heterogéneo.

## 2. ANTECEDENTES

La cavidad oral es similar a otros sitios del cuerpo humano, es colonizado por una “microbiota” en una relación simbiótica (Henderson y col., 1998). Las patologías endodónticas (pulpar y perirradicular) son el resultado de los efectos patógenos de los microorganismos y la respuesta del huésped (Baumgartner, 2004).

En la cavidad oral existen alrededor de  $10^{10}$  bacterias que consisten en más de 500 especies diferentes de microorganismos (Sundqvist, 1992). Todas las bacterias tienen las mismas oportunidades de invadir el espacio del conducto radicular, pero solo un grupo restringido de especies se han identificado en los conductos radiculares infectados (Sundqvist, 1994). Los elementos que definen la composición de la microbiota de los conductos radiculares son las condiciones anaerobias que se tienen en el conducto radicular, interacciones bacterianas y la disponibilidad de nutrientes, siendo el tejido pulpar desintegrado y el fluido tisular los que constituyen una fuente esencial de nutrientes para los microorganismos en el conducto (Love, 200; Sundqvist y Figdor, 2003).

La caries dental sigue siendo el origen más común de las infecciones endodónticas; además de la caries, las vías para la entrada de microorganismos a la pulpa son la exposición directa de la pulpa (por ejemplo, la caries, trauma, procedimientos dentales), túbulos dentinarios expuestos y conductos laterales con comunicación al periodonto; una vez que la pulpa se necrosa y los procesos odontoblásticos sufren autólisis, los túbulos dentinarios expuestos están permeables y son atravesados por microorganismos que infectan el sistema de conductos radiculares (Grossman, 1967). Cuando el tejido pulpar se necrosa, pierde el suministro de sangre y el sistema de conductos radiculares se convierte en un reservorio de microorganismos (Baumgartner, 2004).

Los microorganismos que colonizan los conductos radiculares pueden causar infecciones clasificadas como infecciones intrarradiculares primarias, en donde los microorganismos que invaden y colonizan inicialmente el tejido pulpar necrosado provocan la infección; se caracterizan por una microbiota mixta, predominando bacterias anaerobias, aunque también se pueden encontrar facultativas; mientras que en infecciones intrarradiculares secundarias son los microorganismos que no estaban presentes en la infección primaria y que han accedido a los conductos radiculares en algún momento tras la intervención mecánica; por lo anterior las bacterias pueden penetrar entre una sesión de tratamiento y otra o incluso tras la obturación del conducto radicular; finalmente las infecciones intrarradiculares persistentes son las que pueden resistir los tratamientos antimicrobianos intrarradiculares y soportar periodos de privación de nutrientes en un conducto preparado y los microorganismos implicados son restos de una infección primaria o secundaria, donde las especies bacterianas asociadas suelen estar constituidas por un menor número, predominando bacterias Gram-positivas facultativas o anaerobias (Nair, 1997).

En la mayoría de los casos, resulta difícil distinguir clínicamente entre las infecciones persistentes y las secundarias, que pueden causar distintos problemas clínicos como exudado persistente, episodios de infección y fracaso del tratamiento endodóntico con la aparición de una periodontitis apical postratamiento (Nair, 1997).

## **2.1 Periodontitis apical**

La periodontitis apical es considerada una defensa dinámica con invasión de microorganismos a los tejidos perirradiculares, que invaden los tejidos durante la expansión y exacerbación de la enfermedad periapical; los microorganismos están consecuentemente presentes en los tejidos periapicales con signos clínicos de exacerbación, abscesos y tracto sinuoso (Nair, 1997). La periodontitis apical se considera una inflamación crónica que altera los tejidos perirradiculares causados por agentes etiológicos de origen endodóntico; es una inflamación que genera alteración de los tejidos perirradiculares causado por la presencia de infección microbiana dentro del sistema de conductos radiculares que afecta al diente (Kakehashi y col., 1965).



La periodontitis apical persistente, ocurre cuando no es eliminada adecuadamente la infección intrarradicular durante el tratamiento de endodoncia; esta patología puede persistir asintomática, manifestando una radiolucidez en la porción apical del diente problema. Además, existe la infección extrarradicular que interfiere con la cicatrización de la periodontitis apical (Nair, 2006).

La radiolucidez periapical generalmente diagnosticada durante una radiografía de rutina, en la mayoría de las lesiones (> 90%) pueden ser clasificadas como granulomas, quistes radiculares o abscesos (Bhaskar, 1996). Los reportes de incidencia de quistes periapical varía del 6% a 55% (Lin y col., 2007).

Las infecciones extrarradiculares se caracterizan por la invasión y proliferación de microorganismos en tejidos perirradiculares inflamados, siendo regularmente la secuela de una infección intrarradicular; una infección extrarradicular puede depender o no de la infección intrarradicular (Torabinejad y Walton, 2010). La forma más frecuente de infección extrarradicular es el dependiente de la infección intrarradicular que corresponde al absceso apical agudo, éste puede responder adecuadamente a un tratamiento endodóntico; mientras que la infección extrarradicular independiente a la infección intrarradicular es la actinomicosis apical, la cual no responde positivamente al tratamiento convencional y se requiere de cirugía endodóntica (Nair, 2006).

Las infecciones extrarradiculares pueden ocurrir a consecuencia de una exacerbación de lesiones periapicales, actinomicosis periapical, desplazamiento del débril dentinario infectando a los tejidos periapicales durante la instrumentación o por quistes periapicales infectados (Nair, 2006).

La infiltración de microorganismos en tejidos periapicales inicia con un proceso inflamatorio con el fin de eliminar los microorganismos y prevenir su diseminación a los planos faciales; durante esta respuesta, citocinas, leucotrienos y prostaglandinas están en el área; dichos mediadores inflamatorios refuerzan la llegada de leucocitos polimorfonucleares. En la enfermedad periapical la interleucina I juega un rol esencial en la resorción de hueso alveolar (Graves y col., 2011).

La complicada anatomía del sistema de conducto y la organización de los microorganismos en biofilms hacen poco factible el conseguir un sistema de conductos estériles con las herramientas actualmente empleadas para el tratamiento de endodoncia (Nair, 2006). La periodontitis apical persistente es más compleja que el manejo de una periodontitis que afecta a un diente sin tratamiento de endodoncia. El óptimo manejo clínico de la enfermedad es esencial un entendimiento claro de la etiología de la patogénesis de la enfermedad (Friedman, 2004).

Los microorganismos intrarradiculares son los agentes etiológicos esenciales en la periodontitis apical. Evidencia reciente indica que la periodontitis apical es inducida por la formación de biofilms. Investigaciones *in situ* usando el microscopio óptico o microscopio electrónico han permitido observaciones de la colonización de bacterias cubiertas con biofilms sésiles sobre las paredes dentinarias. Así mismo, los biofilms en la superficie radicular (biofilm extrarradicular) has sido reportado y considerado como una posible causa de la periodontitis apical post tratamiento (Ricucci y Siquiera, 2010).

## **2.2 Microbiota Endodóntica**

La identificación de los microorganismos causantes de las infecciones endodónticas representa un punto importante para comprender el proceso de las enfermedades pulpares o perirradiculares así como proporcionar un agente antimicrobiano eficaz para el tratamiento (Baumgartner, 2004). El rápido crecimiento bacteriano es considerado principalmente como el elemento etiológico de las infecciones endodónticas (Chávez de Paz, 2004). Las especies bacterianas que en la actualidad contribuyen a la patología pulpar y periapical son variadas, incluyendo sobre todo los siguientes microorganismos: *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus*, *Prevotella intermedia*, *Lactobacillus*, *Campylobacter*, *Actinomyces*, *Capnocytophaga ochracea*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella bucae*, *Prevotella oralis*, *Prevotella denticola*, *Eubacterium nodatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis*, *Eikenella corrodens* y *Enterobacter agglomerans* (Odell y col., 1999).

La microbiota de los conductos radiculares infectados varía a lo largo del conducto, identificándose principalmente bacterias anaerobias facultativas en la porción coronal, mientras que en la porción apical predominan bacterias anaerobias estrictas (Sundqvist y Figdor, 2003).

Las infecciones endodónticas primarias se caracterizan por una mezcla de 103 a 108 especies por conducto infectado, siendo las infecciones sintomáticas las que presentan mayor número de especies bacterianas (Siqueira y Rôças, 2014). Las especies de mayor prevalencia son microorganismos Gram-negativos pigmentados como *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Tannerella*, entre otros.

Los conductos radiculares infectados están compuestos por una población heterogénea de microorganismos aerobios, anaerobios, Gram-positivos y Gram-negativos en modo de biofilm. La resistencia de las bacterias ante los antimicrobianos es atribuida cuando están en modo de biofilm (Kishen, 2010). Recientemente se ha prestado atención en las bacterias Gram-positivas, especialmente a las que pertenecen al grupo de enterococcus, principalmente *Enterococcus faecalis*, que han sido frecuentemente aisladas en cultivos tomados de conductos obturados (Pinheiro y col., 2003).

Los microorganismos anaerobios predominan en un 97% en la microbiota cultivada en dientes con pulpas que no tienen una comunicación directa con la cavidad oral. Estudios de cultivos han revelado una proporción alta de anaerobios facultativos (Chávez de Paz, 2004).

Solo un número pequeño de especies han sido encontradas en los conductos radiculares en dientes con tratamiento endodóntico previo con periodontitis asintomática crónica. Las bacterias que han sido encontradas son predominantemente Gram-positivas; en técnicas a base de cultivos se han detectado *Actinomyces*, *Enterococcus* y *Propionibacterium*. La presencia de *Enterococcus faecalis* en casos con periodontitis apical persistente es particularmente interesante debido a que raramente se encuentra en infecciones endodónticas primarias (Siqueira y Rôças, 2004).

### **2.3 *Enterococcus faecalis***

*Enterococcus faecalis* es un microorganismo oportunista que ha sido expuesto al sistema de conductos a través de la microbiota oral (Fouad y col., 2005). Es el patógeno de mayor prevalencia en la mayoría de los casos donde no se resuelve las lesiones apicales, siendo resistente a la mayoría de las medicaciones intraconducto y tolerando hasta un pH de 11.5, por lo cual el microorganismo es resistente al tratamiento con hidróxido de calcio; dicha resistencia ocurre probablemente por su habilidad de regular internamente el pH; puede sobrevivir en periodos de escases de nutrientes y crecer como una mono infección en dientes tratados endodónticamente sin sinergismo de otras bacterias. Su presencia como agente etiológico en periodontitis apical persistente no es universal, sin embargo, la prevalencia de *E. faecalis* se ha encontrado del 22% al 77% por técnicas moleculares (Siqueira y Rôças, 2004).

*Enterococcus faecalis* también representa un 90% en las infecciones endodónticas postratamiento, tiene características intrínsecas que le permiten sobrevivir en condiciones que son comúnmente letales para otros microorganismos, así mismo tiene la propiedad de producir biofilms debido a su capacidad para producir un lodillo compuesto por glicocalix amorfo que se pega a la superficie celular y forma una cubierta que ayuda a la adherencia contra las superficies, esto provee una protección contra mecanismos de defensa y en presencia de agentes antibacterianos (Siqueira y Rôças, 2014).

### **2.4 *Fusobacterium nucleatum***

Es una especie Gram-negativo anaerobio obligado, no forma esporas y normalmente se encuentra en la cavidad oral; en estudios epidemiológicos se ha detectado que es una de las especies con altas tasas de prevalencia en infecciones endodónticas primarias (Sundqvist, 1992). *Fusobacterium nucleatum* es uno de los microorganismos más frecuentemente aislado en infecciones endodónticas asociadas a lesiones perirradiculares (Moraes y col., 2002).

Además, ha sido detectado en muestras de conductos radiculares necróticos; puede ser causante o contribuyente a las agudizaciones durante la terapia endodóntica debido a los

componentes estructurales de su membrana celular, tal como los lipopolisacáridos que actúan como endotoxinas provocando una reacción inflamatoria aguda (de Paz Villanueva y col., 2002).

### **2.5 *Candida albicans***

Los hongos son microorganismos quimio-organotróficos eucarióticos que pueden formar parte de las infecciones endodónticas y por lo tanto participar en la etiología de las enfermedades perirradiculares. Poseen atributos de virulencia que incluyen adaptabilidad a una variedad de condiciones ambientales, adhesión a una variedad de superficies, producción de enzimas proteolíticas, transición morfológica, formación de biofilms así como la inmunomodulación de las defensas del huésped (Siqueira y Sen, 2004).

La incidencia de *Candida albicans* en la cavidad oral ha sido reportada entre un 30% a 45% en adultos sanos; es aislada de los conductos radiculares infectados, este hongo ha sido considerado un microorganismo dentinofílico debido a su afinidad invasiva a la dentina, también se ha observado su resistencia a medicamentos intraconducto como el hidróxido de calcio por lo que se atribuye a esto su presencia en infecciones persistentes (Siqueira y Sen, 2004). La adherencia de *Candida albicans* a proteínas de la matriz extracelular como colágeno tipo I y fibronectina depende de la presencia de calcio extracelular que abunda en la dentina, además tiene actividad colagenolítica que puede degradar colágeno de dentina humana y puede activar el sistema de complemento por la vía clásica o alterna (Siqueira y col., 2002).

### **2.6 Biofilm en Conductos Radiculares**

La pulpa infectada y necrótica otorga un hábitat selectivo para los organismos que crecen en biofilms sésiles, agregados, co-agregados y células planctónicas suspendidas en la fase fluida del conducto (Nair, 2006).

El biofilm es una comunidad de microorganismos embebida en una matriz de exopolisacáridos que se adhiere a la superficie dentinaria, mientras que las células planctónicas están en un medio acuoso. Los microorganismos en biofilm son mil veces

más resistentes que en su forma planctónica (Costerton y col., 2003). Debido a la formación de la matriz de exopolisacáridos formada por los microorganismos previenen la penetración de los agentes antimicrobianos dando protección a las células que habitan en el biofilm. Finalmente, hay una resistencia a los diferentes antimicrobianos la cual puede ser transferida de célula a célula ya que la alta densidad del medioambiente de los microorganismos en el biofilm es ideal para el intercambio de información genética (Norrington y col., 2008).

En los conductos radiculares infectados las bacterias viven dentro de todo el conducto como biofilm (biofilm intrarradicular), y bajo ciertas condiciones se puede formar biofilm en lugares más allá del foramen apical (biofilm extrarradicular). El biofilm en pocos casos se extiende a la parte externa de la superficie radicular, generalmente está rodeado por células inflamatorias en los tejidos perirradiculares. Es bien sabido que está relacionado con la presencia de un tracto sinuoso (Ricucci y Siquiera, 2010).

En casos con signos clínicos de exacerbación se presenta como un tracto sinuoso y un absceso, en el cual se encuentran presentes los microorganismos en la zona periapical; recientemente se ha enfatizado la importancia de la actinomicosis periapical. Así como la presencia de biofilm en la superficie externa de la raíz en casos con periodontitis apical refractaria (Donlan y Costerton, 2002).

En estudios *in vitro* se observó que el desarrollo del biofilm evitaba la erradicación de algunos microorganismos al ser expuestos a ampicilina, dicloxaciclina, clindamicina, azitromicina y metronidazol. En todos los especímenes se encontraron áreas de biofilm maduro. Dicho resultado se debe a la presencia de la matriz de exopolisacáridos y proteínas que son secretadas por las bacterias que finalmente proveen protección a las bacterias que conforman el biofilm (Norrington y col., 2008).

La resolución de problemas en la formación de biofilms de endodoncia consiste en el establecimiento de un modelo estándar que compare la eficacia antimicrobiana de materiales de endodoncia bajo varias condiciones. Un modelo de biofilm maduro sobre dentina radicular humana requiere hasta 60 días para desarrollarlo en condiciones bajas

de oxígeno y un medio ambiente rico en nutrientes. Dicho modelo de biofilm propuesto parece ser viable para estudios sobre estrategias de antimicrobianos, permitiendo un tiempo de colonización satisfactorio para las especies bacterianas seleccionadas con virulencia y propiedades de adherencia (Estrela y col., 2009).

Los agentes infecciosos son localizados mayoritariamente en los sitios donde no se llevó a cabo la remoción mecánica del tejido dentinario infectado del conducto principal, istmos y en conductos accesorios, por lo anterior los microorganismos existen en forma de biofilm localizados en los sitios donde no se hizo la remoción mecánica y a la irrigación con NaClO (Nair y col., 2006).

## **2.7 Tratamiento de Endodoncia**

La terapia endodóntica involucra el tratamiento del tejido pulpar vital y necrótico en pacientes para que puedan conservar sus dientes naturales en función y estética (Peters y col., 2004).

El objetivo del tratamiento endodóntico es la limpieza, desinfección y completo sellado del sistema de conductos radiculares. La conformación del conducto es un aspecto crítico debido a que influye en el resultado de las fases subsecuentes del tratamiento como lo es la irrigación y la obturación. Una vez que el conducto es preparado, éste debe tener una conicidad uniforme, incrementar el diámetro desde la porción apical hacia el orificio de entrada. Esta preparación proporciona suficiente espacio para los irrigantes, para la completa limpieza del conducto y una efectiva obturación (Schilder, 1974).

El propósito principal de la instrumentación es el desbridamiento mecánico del sistema de conductos y la creación de un espacio para permitir el paso de las sustancias antimicrobianas (Zehnder, 2006). El proceso de desbridamiento, incluye la instrumentación mecánica en conjunto con la irrigación química, esta técnica combinada con irrigantes eliminará la mayoría de las bacterias en el conducto, así como el tejido necrótico y la remoción de dentina contaminada (Byström y col., 1983).

El tratamiento para la infección endodóntica es reducir significativamente los microorganismos del sistema de conductos y prevenir la reinfección (Nair y col., 2005). La mayoría de los dientes tratados endodónticamente con periodontitis apical asintomática es debido a la persistencia de la infección del sistema de conductos en la porción apical. Se han encontrado microorganismos localizados en la porción apical en los sitios de ramificación del conducto radicular (Nair, 2006).

Con el tratamiento endodóntico no quirúrgico se pretende hacer una remoción químico-mecánica del tejido infectado, pretendiendo dejar estéril el conducto, sin embargo, no siempre se consigue alcanzarlo (Norrington y col., 2008).

## **2.8 Irrigantes en Endodoncia**

La Asociación Americana de Endodoncia define la irrigación como el lavado mediante una corriente de fluido. En endodoncia la irrigación intraconducto facilita la remoción física de materiales del interior de los conductos e introducción de químicos con actividad antimicrobiana, desmineralizante, disolutiva del tejido, blanqueante, desodorante y para el control de la hemorragia. (Glossary: American Association of Endodontics, 1998).

La irrigación en endodoncia consiste en la introducción de una o más soluciones en la cámara pulpar y en los conductos radiculares y su posterior aspiración; además, es un complemento fundamental de la instrumentación, por lo tanto, debe emplearse antes, durante y después de la misma (Basrani y Cañete, 1988).

La solución irrigadora tiene como efecto principal actuar como lubricante y agente de limpieza durante la preparación biomecánica, removiendo microorganismos, productos asociados de degeneración tisular y restos orgánicos e inorgánicos, lo que impide la acumulación de los mismos en el tercio apical, garantizando la eliminación de dentina contaminada y la permeabilidad del conducto desde el orificio coronario hasta el foramen apical (Hülsman y Denden, 1998).

Idealmente, los irrigantes de los conductos radiculares deben disolver tejido orgánico, eliminar microorganismos, destruir sus bioproductos y remover la capa de barrillo



dentinario. Un buen sistema de irrigación debe tener flujo y volumen adecuado del irrigante a la longitud de trabajo, para ser eficaz en el desbridamiento de los conductos radiculares sin forzar la solución en tejidos perirradiculares (Nielsen y Baumgartner, 2007).

La irrigación permite limpiar más allá de lo que hayamos llegado con la instrumentación por si sola. La efectividad química y mecánica del sistema de irrigación depende de su habilidad para llevar el irrigante al tercio apical y a regiones que no han sido instrumentadas del conducto (Abarajithan y col., 2011).

La efectividad química y mecánica del sistema de irrigación depende de su habilidad para llevar el irrigante al tercio apical y a regiones que no han sido instrumentadas del conducto (Abarajithan y col., 2011).

El irrigante ideal ha sido descrito como sistémicamente no citotóxico, no cáustico a los tejidos periodontales, teniendo poco potencial de causar una reacción anafiláctica, que posea un amplio espectro antimicrobiano, capaz de disolver tejido pulpar, la inactivación de endotoxinas o bien la prevención de la formación de una capa de biofilm o disolviendo una vez que se ha formado (Gopikrishna y col., 2013)

## **2.9 Hipoclorito de Sodio (NaClO)**

El hipoclorito de sodio fue inventado en el año 1748 por Berthollet. Inicialmente el hipoclorito era usado como un agente blanqueador, posteriormente en el siglo XIX se empezó a utilizar como desinfectante, pero no fue hasta 1920 que comenzó a usarse como irrigante principal en endodoncia (Zehender, 2006).

El hipoclorito de sodio de 0.5 – 5.25% se considera la solución irrigadora más utilizada en la práctica actual, por ser la que más se acerca a las condiciones ideales por su efectividad para eliminar tejido vital y no vital y además de poseer un amplio efecto antibacteriano, matando rápidamente bacterias, esporas, hongos y virus (incluyendo el HIV, rotavirus, HSV-1 y el virus de la hepatitis A y B) (Siqueira y col., 2000), tiene un

pH alcalino entre 10.7 y 12.2, es excelente lubricante y blanqueador, posee una tensión superficial baja, posee una vida media de almacenamiento prolongada y es poco costoso, reacciona con los restos orgánicos en el sistema de conductos y de esa manera facilita la limpieza sin embargo, ésta reacción lo va inactivando en su capacidad antibacteriana; por lo tanto, la solución debe ser renovada frecuentemente al sistema de conductos (Hülsman y Denden, 1998).

El proceso químico por el cual el NaClO realiza su acción antimicrobiana ocurre cuando entra en contacto con las proteínas tisulares, haciendo que se forme hidrógeno, formaldehído y acetaldehído. Las cadenas peptídicas se rompen para disolver las proteínas; en este proceso el hidrógeno es sustituido por el cloro con formación de cloramina, que interviene directamente como antimicrobiano, ya que interfiere en la acción oxidativa celular con inactivación enzimática irreversible en la degradación de lípidos y ácidos grasos; de este modo se disuelve el tejido necrótico y el NaClO penetra y limpia mejor las áreas infectadas (Drake y col., 1994).

Sin embargo, el hipoclorito de sodio resulta un agente irritante para el tejido periapical (Hülsman and Hahn, 2000), su sabor es inaceptable por los pacientes y por sí solo no remueve la capa de desecho, ya que solo actúa sobre la materia orgánica de la pulpa y predentina. Las concentraciones clínicas varían entre el 0.5% al 6%, la dilución del NaClO disminuye significativamente la propiedad antibacteriana, su propiedad de disolución del tejido y la propiedad de desbridamiento del conducto, así mismo disminuye su toxicidad. La principal desventaja del NaClO es su alta toxicidad, agregando a esto su sabor desagradable e incapacidad de eliminar la capa de debri dentinario (Sundqvist, 1976). El NaClO tiene un olor desagradable, causa daño irreversible en la ropa, y es más tóxico que otras soluciones irrigantes; conforme la concentración aumenta los efectos tóxicos del NaClO en tejidos vitales también; de tal manera, debe realizarse el protocolo de irrigación con mucho cuidado para reducir la posibilidad de causar daño a los tejidos (Safavi y col., 1990).

La complicación más común es la inyección inadvertida del NaClO a los tejidos periapicales. Entre otras complicaciones se encuentran la inyección a los senos maxilares,

perforaciones radiculares laterales y la posibilidad que la solución tenga contacto con los ojos del paciente (Donlan y Costerton, 2002).

La aplicación de presión extrema durante la irrigación o la introducción excesiva de la aguja en el conducto radicular puede resultar en la extrusión del irrigante a los tejidos periapicales. En dichos casos, el paciente experimenta dolor muy agudo, rápida inflamación y sangrado de los tejidos periapicales (Rocas y col., 2008).

## **2.10 Nanopartículas de Plata**

Los desarrollos recientes en nanotecnología han impulsado la generación de nuevos materiales funcionales basados en nanoestructuras (Stathopoulou y col., 2018).

Las nanopartículas juegan un papel importante tanto en la medicina, como en odontología, en donde existen aplicaciones como las nanopartículas de plata que se están utilizando como alternativa en virtud a sus propiedades anti-bacterianas y anti-fúngicas que presentan en su química superficial, por lo que se pueden emplear en el tratamiento de problemas relacionados con el conducto radicular (Hamblin y Hasan, 2004).

Estas nanopartículas incluyen formas esféricas, cúbicas y partículas en forma de agujas en nanoescala (5-100 nm). La eficacia antimicrobiana de las nanopartículas metálicas se ha sugerido que es debido a su tamaño y a su alta relación de superficie a volumen. En teoría, estas características deben permitir que interactúen estrechamente con las membranas microbianas y por lo tanto provocan un efecto antimicrobiano que no es sólo debido a la liberación de iones de metal (Soukos y Goodson, 2011)

Las acciones antimicrobianas de la plata elemental, los iones  $Ag^+$  y compuestos de plata han sido ampliamente investigados; en comparación con otros metales, la plata es relativamente menos tóxica para las células humanas, aunque a concentraciones muy bajas. La plata se ha considerado para una gama de aplicaciones biomédicas, incluyendo el uso en el campo dental, además se ha demostrado que la carga positiva del ion  $Ag^+$  es crítico para la actividad antimicrobiana, lo que permite la atracción electrostática entre la carga negativa de la membrana celular bacteriana y nanopartículas cargadas

positivamente. Con respecto a los mecanismos moleculares de la acción inhibitoria de iones  $\text{Ag}^+$  en microorganismos, se ha demostrado que el ADN pierde su capacidad para replicarse, y la expresión de proteínas ribosomales subunidades y otras proteínas celulares y enzimas necesarias para la producción de ATP se vuelve inactiva. Se han demostrado cambios estructurales y daños a las membranas bacterianas resultantes en la muerte celular (Wu y col., 2014).

Las nanopartículas de Plata (AgNPs) se han aplicado en muchos campos de la salud por sus propiedades bactericidas (Kim y col., 2007), su mecanismo de acción consiste en desestabilizar la membrana celular de las bacterias, aumentando la permeabilidad lo que conduce a la fuga de los componentes celulares (Shrestha y col., 2016). La solución de AgNPs se ha recomendado como una alternativa a la solución de irrigación del conducto radicular, no solo por su fuerte potencial bactericida sino también por su biocompatibilidad, especialmente en concentraciones más bajas (Wu y col., 2014).

Se ha informado que los AgNPs tienen una citotoxicidad que es proporcional a su tamaño, relacionada con la generación de especies reactivas de oxígeno durante su oxidación superficial y la posterior liberación de iones de plata en entornos biológicos (Bapat y col., 2018), respaldados por metodologías de química ecológicas para no utilizar o producir especies tóxicas para su desarrollo y la aplicación de productos químicos con la finalidad de reducir o eliminar el uso de sustancias peligrosas para la salud humana y el medio ambiente (Moulton y col., 2010). Además, la síntesis de AgNPs con biopolímeros como el quitosano, inmovilizadas en carboximetil-celulosa (CMC) como agentes reductores y protectores ha sido reportada previamente (Garza-Navarro y col., 2013).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente los mecanismos de resistencia de los microorganismos van en aumento, por lo cual diferentes estudios se han enfocado en el desarrollo de nuevas estrategias para su control sin afectar células, tejidos, órganos humanos y el medio ambiente. La cavidad oral representa uno de los sitios con mayor variedad de microorganismos en el cuerpo humano, representando un riesgo latente para desarrollar infecciones por mala higiene, lesiones o tratamientos quirúrgicos. Las infecciones endodónticas representan un problema de salud oral muy importante debido a la presencia de microorganismos resistentes a los diferentes tratamientos empleados para su control. Por lo tanto, la irrigación junto con la instrumentación, juegan el rol importante para evitar la colonización de microorganismos durante o después del tratamiento.

El NaClO es la solución irrigadora más utilizada en la práctica endodóntica, dada su efectividad para eliminar tejido orgánico y necrótico, además de poseer un amplio efecto antibacteriano, sin embargo, es una solución antimicrobiana la cual posee alta citotoxicidad. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas soluciones irrigantes que presenten un bajo grado de citotoxicidad en las células humanas y que puedan eliminar los microorganismos patógenos son una prioridad. Actualmente el uso de nano materiales representa una buena alternativa en el control de microorganismos patógenos, dada su estabilidad química y su interacción con fármacos, metabolitos primarios y secundarios de las células.

Por tal motivo, en el presente trabajo se pretende evaluar el efecto de una solución irrigante a base de un nanocompósito de plata/carboximetilcelulosa ante microorganismos oportunistas de infecciones endodónticas en un modelo de biofilm heterogeneo.

## **4. HIPOTESIS**

### **Hipótesis**

Un nanocompósito a base de plata/carboximetilcelulosa presenta actividad biocida en un modelo de biofilm heterogéneo.

## 5. OBJETIVO

### Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana de nanocompósitos a base de plata/carboximetilcelulosa en un modelo de biofilm heterogéneo *in vitro*.

### Objetivos específicos

1. Determinar la actividad citotóxica *in vitro* de nanocompósitos a base de plata/carboximetilcelulosa en células humanas, comparado con el NaClO.
2. Evaluar el efecto biocida de nanocompósitos a base de plata/carboximetilcelulosa en microorganismos patógenos asociados a infecciones endodónticas, comparado con el NaClO.
3. Evaluar el efecto biocida de nanocompósitos a base de plata/carboximetilcelulosa en microorganismos patógenos asociados a infecciones endodónticas en un modelo de biofilm homogéneo y heterogéneo en discos de dentina humana, comparado con el NaClO.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Síntesis y caracterización de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa.

Se utilizó carboximetil-celulosa con grado de sustitución de 1.2 y peso molecular de 120 kDa, y nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) adquiridas por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se usó agua desionizada (sistema Barnstead EASYpure II con resistividad =  $18.2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ ) para la elaboración de todas las soluciones utilizadas en la presente investigación. La síntesis de las AgNPs se realizó con la metodología propuesta por Garza-Navarro y col. en el 2013 (Fig. 1), consiste en la prepararon soluciones acuosas de CMC y  $\text{AgNO}_3$  a concentraciones de 15 mg/mL y 0,94 mg/mL respectivamente, después de lo cual se colocaron 20 mL de CMC en un matraz de tres bocas de fondo redondo (reactor) y se agitaron durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 10 mL de solución de  $\text{AgNO}_3$  al reactor y la temperatura se elevó a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ ; la reacción se mantuvo a esta temperatura durante 24 hrs en condiciones de reflujo, transcurrido dicho tiempo, la dispersión rojiza resultante se vertió en un matraz de fondo redondo previamente enfriado para alcanzar rápidamente la temperatura ambiente. La dispersión se congeló, liofilizó, se pesó y se disolvió en agua desionizada para obtener una dispersión compuesta de AgNPs/CMC. Las características cristalinas y morfológicas de AgNPs/CMC, así como la composición química, se examinaron mediante microscopía electrónica de transmisión en una pistola de emisión de campo, microscopio FEI Titan G2 80-300 operado a 300 kV, utilizando técnicas de microscopía electrónica de campo brillante e imágenes de contraste Z, así como el área seleccionada de difracción de electrones (SAED) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (XEDS)



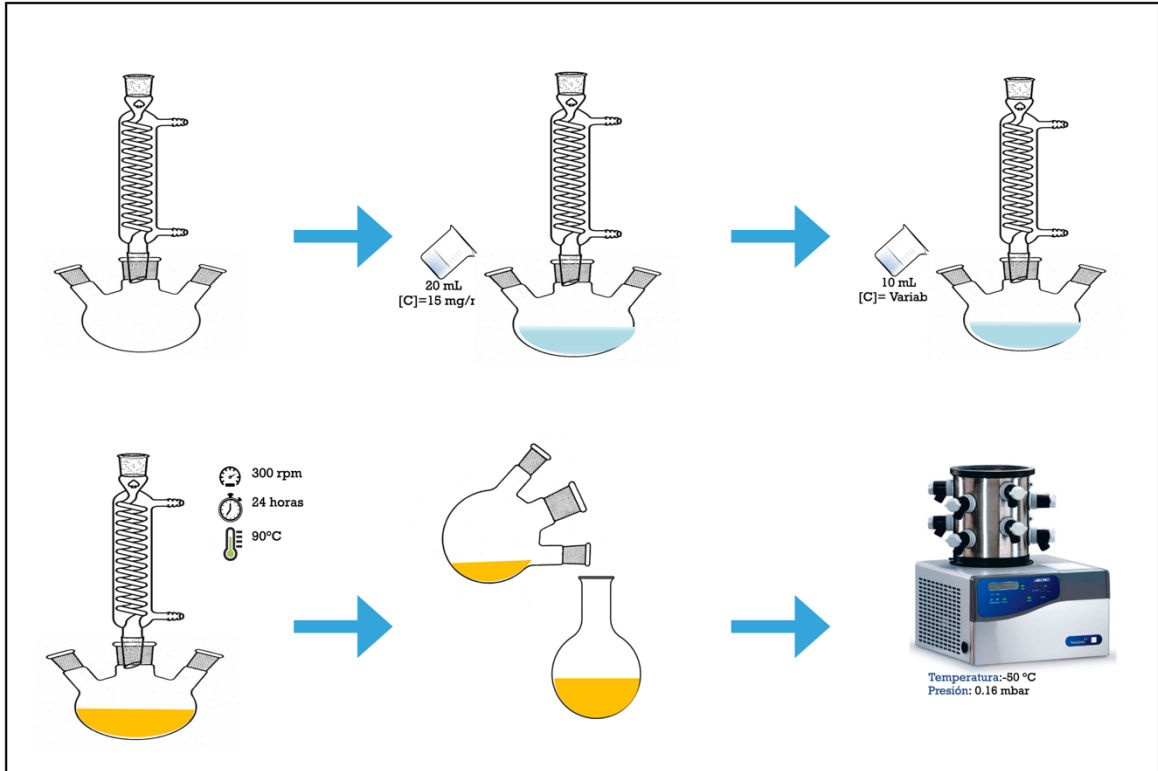


Figura 1. Esquema de la preparación de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa. Se utilizó un matraz de tres bocas de fondo redondo al cual se agregaron 20 mL de CMC y se agito durante 10min, posteriormente 10mL de  $\text{AgNO}_3$  al reactor, se elevó la temperatura a  $90^\circ\text{C}$  durante 24 hrs a 300rpm, posteriormente se congelo y liofilizo.

## 6.2 Evaluación el efecto citotóxico de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa en fibroblastos gingivales humanos (HGF).

El efecto citotóxico de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa en fibroblastos gingivales humanos (HGF) (ATTC® PCS-201-018TM) se evaluó mediante la técnica colorimétrica de reducción del bromuro de (3-4,5 dimetil-2 tiazol)-2,5 difenil-2H tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich), en microplacas de fondo plano de 96 pozos como se muestra en la Fig. 2 (Corning Incorporated, Corning, NY). En la fase inicial se desechó el medio de cultivo celular contenidos en frascos de  $25\text{ cm}^2$  y se realizaron dos lavados con solución de PBS que contenía EDTA al 0.004%, posteriormente se agregaron  $500\ \mu\text{L}$  de tripsina-EDTA al 0.05% (Sigma-Aldrich) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 15 min. El recuento de células en suspensión se determinó mezclando  $20\ \mu\text{L}$  de suspensión celular con  $20\ \mu\text{L}$  de azul de tripano al 0.4% (Gibco, Carlsbad, CA); posteriormente se incubaron  $5 \times 10^3$  células viables en cada pocillo que contenía medio Eagle modificado por Dulbecco

(DMEM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), suplementado con suero fetal bovino al 10% (Sigma-Aldrich), en microplacas de fondo plano de 96 pozos a 37 ° C en 5% de CO<sub>2</sub> hasta confluencia (48 a 72 h), después de lo cual el nanocompósito de AgNPs/CMC (60 µg/mL de suspensión stock) y el hipoclorito de sodio (NaClO; solución stock al 5.25%; control positivo) se añadieron en diluciones en serie 1:2 y se incubaron durante 24 h y 48 h adicionales, usando Triton X-100 y DMEM al 2% como controles positivos y negativos, respectivamente. Posteriormente se desechó el medio de cultivo y las capas celulares se lavaron una vez con solución de PBS que contenía EDTA al 0.004%. A continuación, se agregaron 30 µL de MTT (3 mg/mL) a los pozos y se incubaron durante 1 h, posteriormente se agregaron 200 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán y las densidades ópticas leídas a 570 nm en un espectrofotómetro Smart (Bio-Rad, Hercules, CA). El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera: % de citotoxicidad = (células tratadas con A<sub>570</sub>/células sin tratar A<sub>570</sub>) X 100.

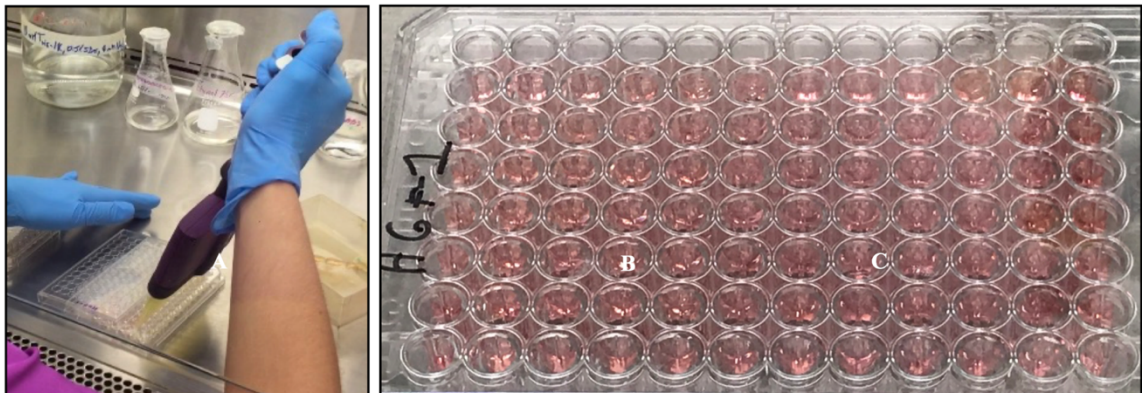


Figura 2. Microplacas de fondo plano de 96 pozos

### **6.3 Análisis del efecto biocida de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa sobre los microorganismos *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.**

El efecto antimicrobiano de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa contra *Candida albicans* (ATCC® 90029TM), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 11420TM) y *Fusobacterium nucleatum* (ATCC® 10953TM) se obtuvieron de la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Se incubaron 100 µL de una suspensión de  $2 \times 10^6$  células/mL en infusión cerebro corazón (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI) en presencia o ausencia de diluciones en serie de 100 µL de suspensión del nanocompuesto, NaClO y medio de cultivo (control negativo) en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning Incorporated) durante 24 horas a 37 °C, posteriormente se evaluó el crecimiento microbiano midiendo la densidad óptica a 600 nm, utilizando un lector de microplacas (espectrofotómetro de microplacas Multiskan™ Go; Thermo Fisher Scientific). El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó de la siguiente manera: % de inhibición del crecimiento = (células tratadas  $A_{600}$ /células no tratadas  $A_{600}$ ) X 100.

### **6.4 Inducción del biofilm heterogéneo con los microorganismos *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.**

Para la elaboración del biofilm heterogéneo, inicialmente se incubaron 2mL de  $1 \times 10^6$  células/mL de cultivos de *C. albicans*, *E. faecalis* y *F. nucleatum* durante 7 días a 37 °C en placas de 26 pozos de fondo plano (Corning Incorporated). Después de la incubación, el biofilm heterogéneo se expuso al tratamiento con el nanocompuesto (4,6 µg/mL), NaClO (5.25%; control positivo) y los controles negativos PBS y medio de cultivo, posteriormente se utilizó la tinción de cristal violeta al 1% y rojo Congo al 1% para finalmente hacer la evaluación bajo microscopía óptica y de epifluorescencia (Axiostar Plus®, Carl Zeiss, Gottinge, Alemania) respectivamente, con un aumento de 40x (Fig. 3). Para el registro de las imágenes se utilizó una cámara digital (Canon®, PowerShot G10, Canon Inc., Tokio, Japón).

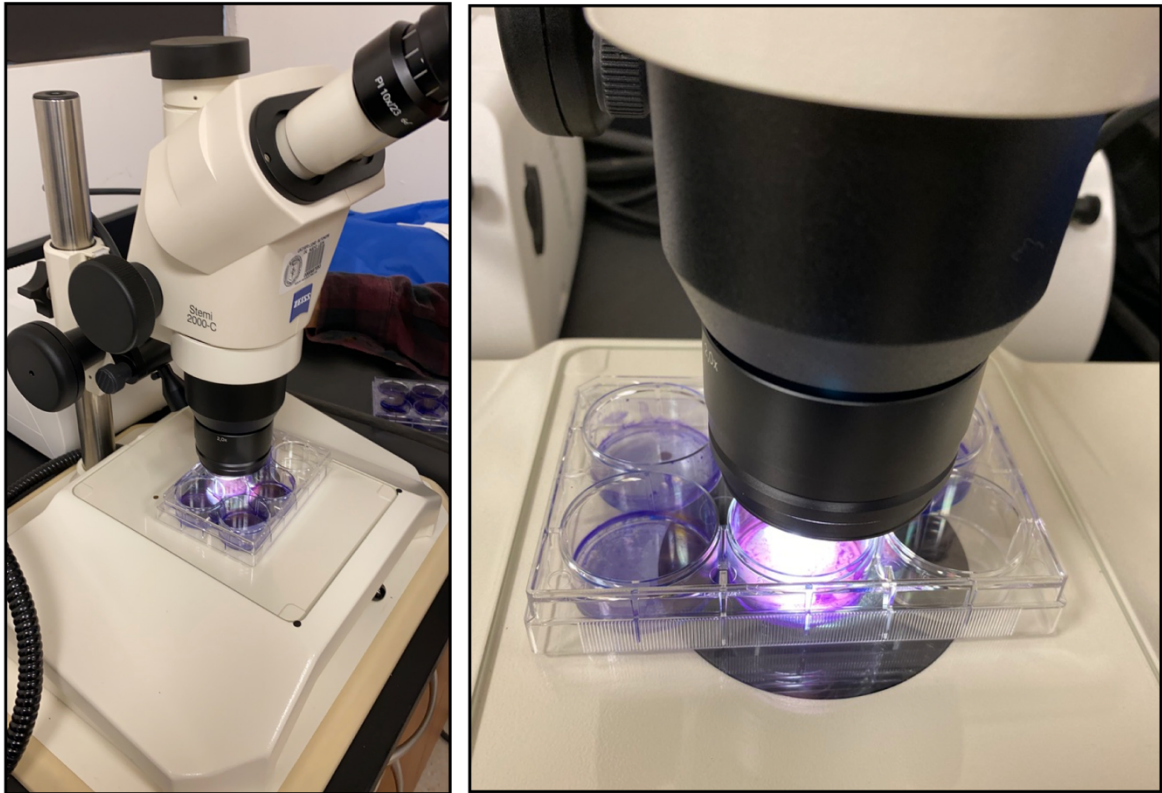


Figura 3. Microscopio óptico (Axiostar Plus®, Carl Zeiss, Gottinge, Alemania)

### **6.5 Inducción del biofilm heterogéneo sobre discos de dentina y el efecto antibiofilm de nanocompósitos a base de plata/carboximetilcelulosa**

Se prepararon discos de dentina a partir de molares recién extraídos del humano los cuales fueron donados por una clínica de atención odontológica privada. Previamente esterilizados se realizaron cortes transversales de 2 mm de espesor con una sierra de precisión (sierra de baja velocidad IsoMet; Buehler, Lake Bluff, IL) y un dispositivo de corte de precisión (cuchillas de obleas de diamante IsoMet; Buehler) (Fig. 4). Los discos se trataron luego con NaClO al 1% durante 15 minutos, después de lo cual se enjuagaron con agua y se esterilizaron nuevamente en autoclave a 121 °C durante 20 min.

Se indujo la formación de biofilm heterogéneo incubando los discos con 2 mL de  $1 \times 10^6$  células/mL de cultivos de *C. albicans*, *E. faecalis* y *F. nucleatum* en fase exponencial, en placas de 6 pozos (Corning Incorporated) a 37 °C durante 7 días, con medio de cultivo BHI (Fig. 5). La formación de biofilm sobre discos de dentina se trató gentilmente con 4.8  $\mu\text{g/mL}$  de nanocompósitos a base de plata/carboximetilcelulosa, NaClO al 5.25% para el

grupo de control positivo, durante 30 segundos y finalmente se tiñeron con safranina (Sigma-Aldrich). La actividad de los antimicrobianos se evaluó utilizando un estereoscopio (Carl Zeiss) con un aumento de 10x, utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD), para determinar el área del biofilm ( $\text{mm}^3$ ) presente en los discos de dentina (Fig. 6).

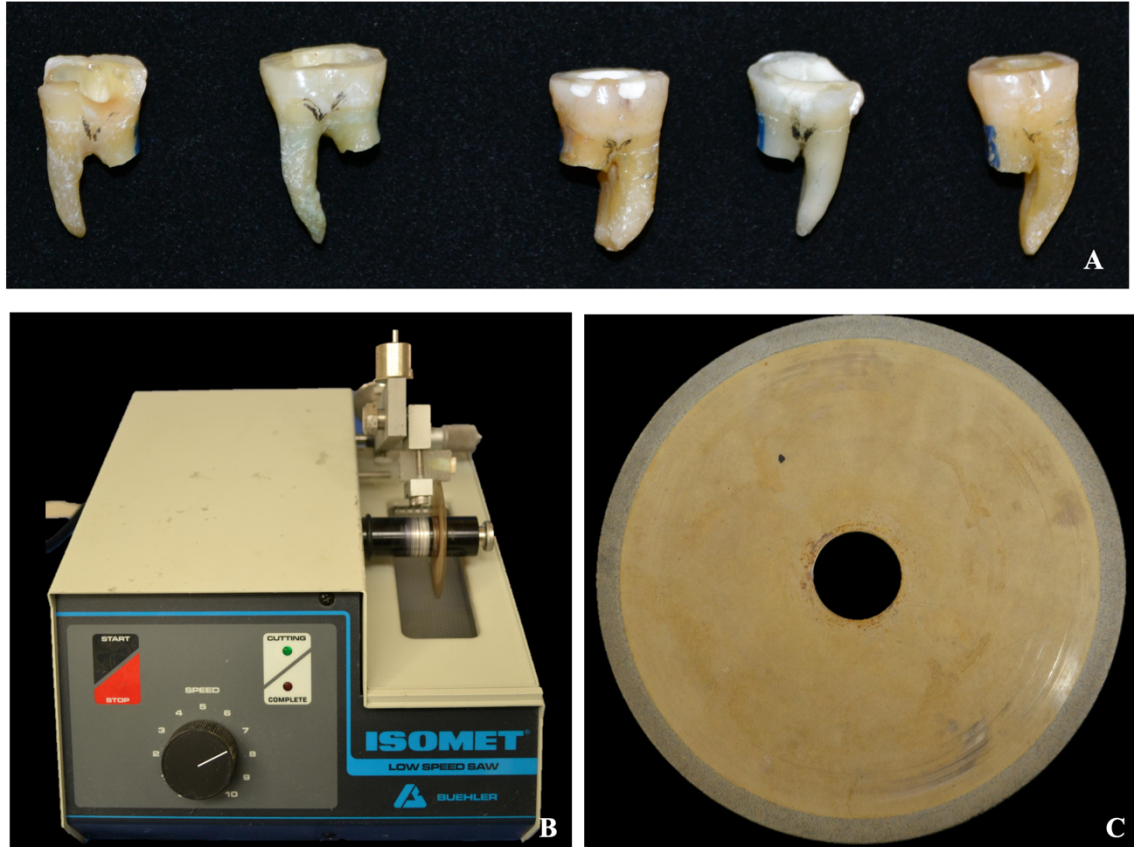


Figura 4. Cortes de discos de dentina. (A) Selección de órganos dentarios. (B) Máquina Isomet de baja velocidad, (C) Disco de diamante para los cortes de los dientes.

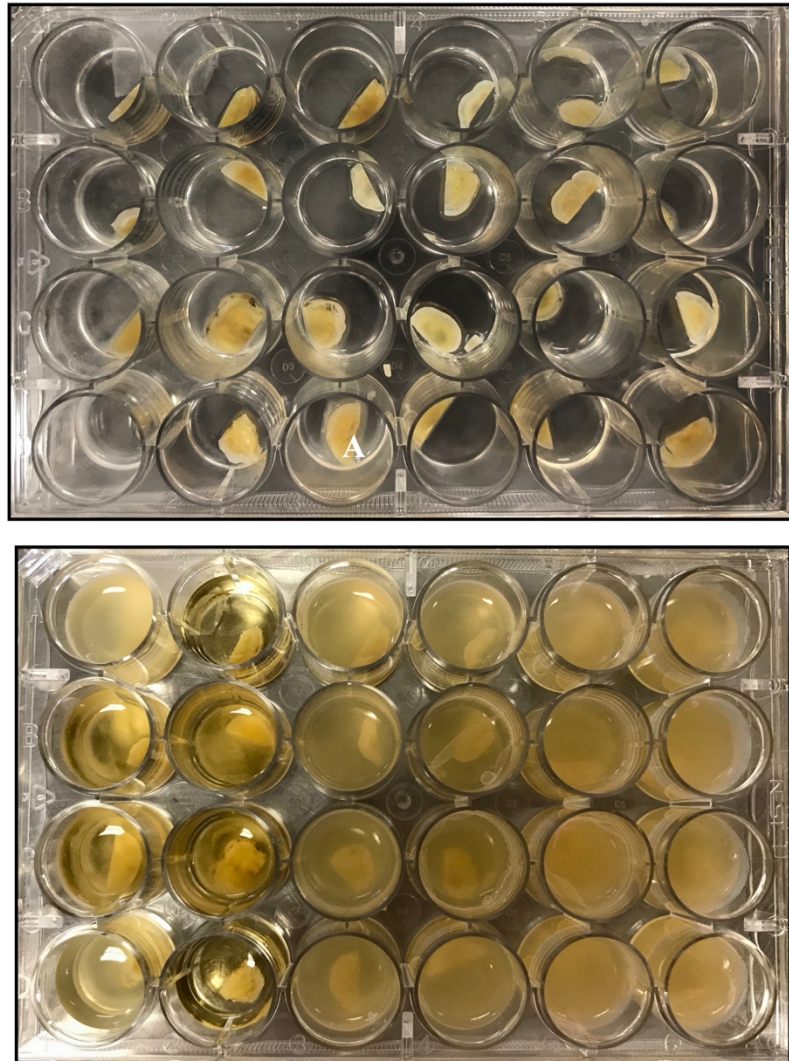


Figura 5. Formación de biofilm heterogéneo sobre discos de dentina. (A) Caja de 26 pozos con discos de dentina embebidos en medio de cultivo y los microorganismos, (B) Formación de biofilm a los 7 días de incubación.

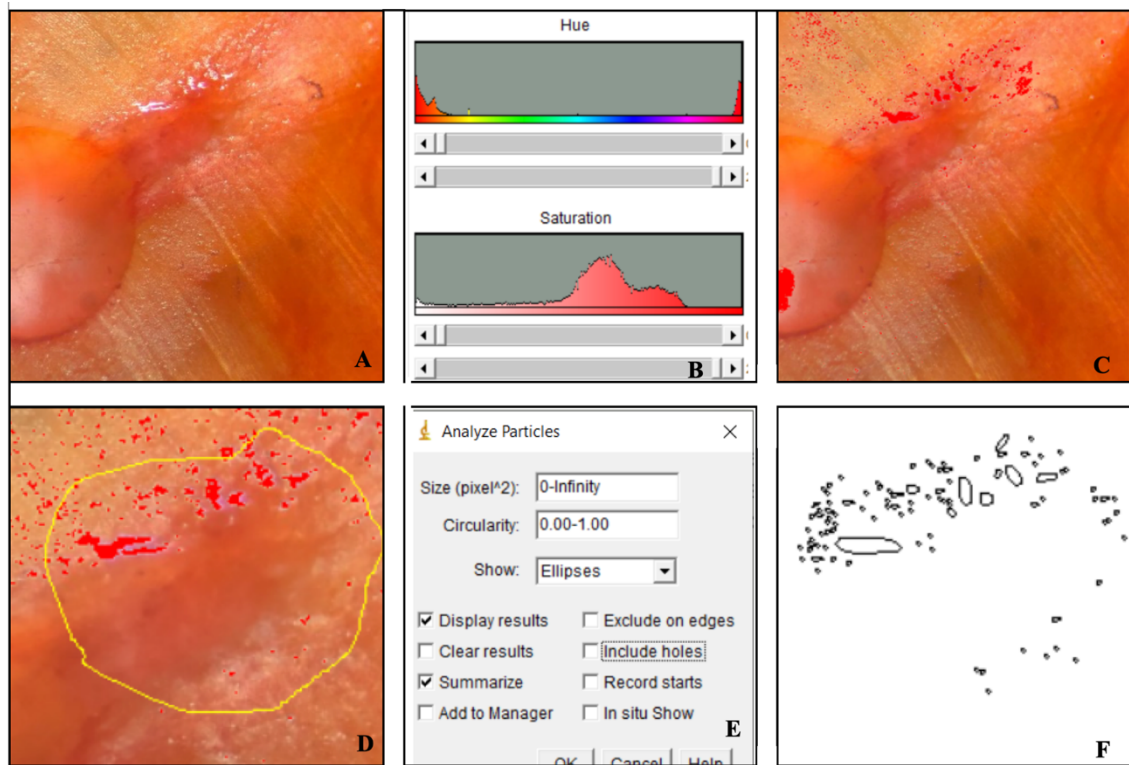


Figura 6. Procesado de imágenes para el análisis de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa. (A) Fotografía inicial, (B) Asignación del umbral de color a la imagen, (C) Discriminación de los objetos que no se querían visualizar, (D) Selección del área seleccionada para su análisis (E) Resultados de la selección de la zona analizada, (F) Gráfica de los resultados.

## 6.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS v.22, los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar de 3 repeticiones por tratamiento de tres experimentos independientes. Para evaluar el nivel de significancia de la diferencia entre la media de los grupos se utilizó la prueba *t* de Student y ANOVA unidireccional.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Caracterización de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa

Como se muestra en la fig. 7a, los nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa muestran una morfología cuasi esférica, que se observa claramente en la fig. 7b. Además, la fig. 7c representa la composición química que fue registrada por XEDS de la zona indicada en la fig. 7b. El análisis elemental obtenido de este espectro concuerda con el esperado para AgNPs / CMC, ya que es posible notar la presencia de C y Ag (ver recuadro en la fig. 7c). En la fig. 7d, se pueden observar datos experimentales ajustados, a partir de la medición de 300 nanocompuestos seleccionados al azar, para el tamaño de compósitos por el modelo estadístico gaussiano, obteniendo una distribución de tamaño medio de 22,3 nm + 11,1 nm.

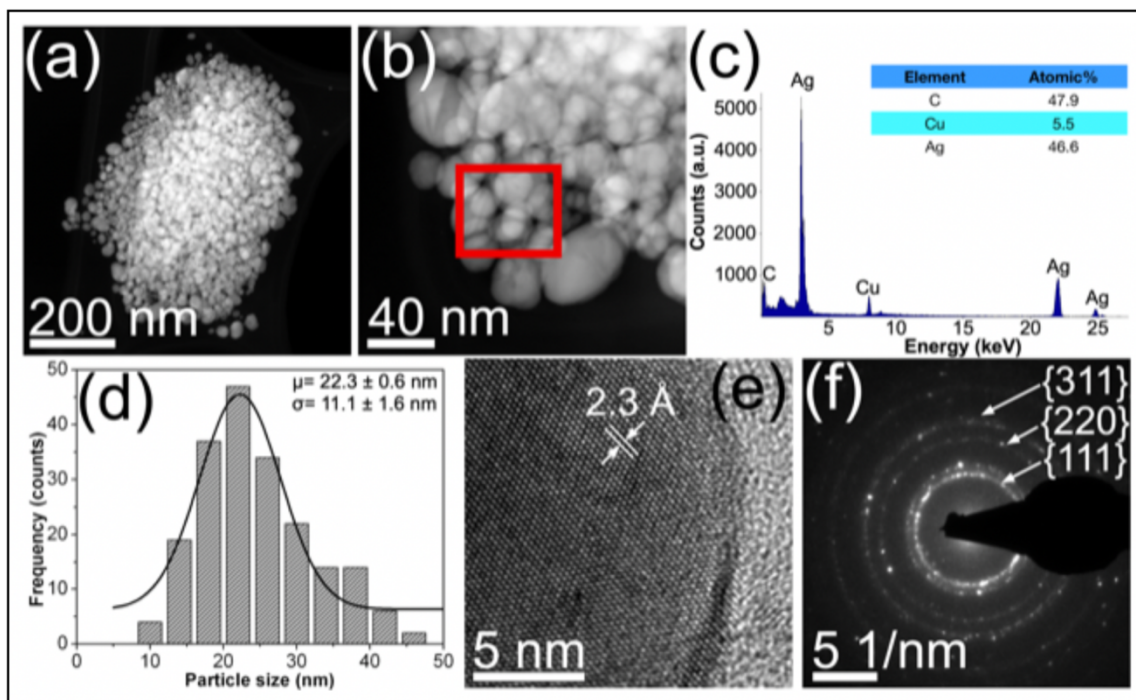


Figura 7. Caracterización de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa (A y B) Morfología cuasi-esférica, (C) Composición química del compuesto, (D) Medición de 300 compósitos seleccionados al azar, para el tamaño de partícula por el modelo estadístico, (E) imagen de gran aumento, (F) anillos de difracción.



Además, la fig. 7e muestra una imagen de gran aumento tomada de un nanocompuesto de la misma muestra; donde es posible observar una disposición atómica regular, que representa franjas de celosía con un espacio interplanar regular de 2.4 Å. Este espacio es congruente con el reportado para los planos familiares {111} de la estructura cristalina de la plata (ver JCPDS: 04-0783). Además, en el patrón SAED informado en la fig. 7f se reconoce los anillos de difracción relacionados con los planos familiares {111}, {220} y {311} informados para el embalaje de plata de la FCC (JCPDS: 04-0783). Estos resultados confirman la formación de un nanocompuesto a base de plata y carboximetilcelulosa en las muestras sintetizadas.

## 7.2 Efecto de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa sobre la viabilidad de HGF

Una vez sintetizado y caracterizado el nanocompuesto se procedió a evaluar su efecto citotóxico sobre células humanas sanas y determinar su concentración no citotóxica. Como se muestra en la fig.8, el nanocompuesto y el NaClO causaron una citotoxicidad significativa ( $p < 0.05$ ) del 36% al 89% y del 41% al 100% contra HGF a concentraciones que varían de 15 a 60  $\mu\text{g/mL}$  y 0.656% a 5.25%, respectivamente. Los controles positivos y negativos de Triton X y DMEM causaron citotoxicidad al 100% y al 0%, respectivamente.

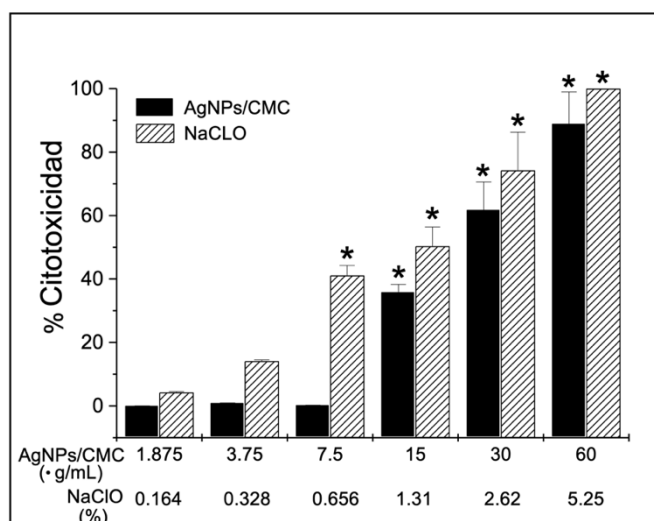


Figura 8. Efecto de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa sobre la viabilidad de HGF

### 7.3 Actividad antimicrobiana de nanocompósitos a base de plata/carboximetilcelulosa

Para establecer la concentración de nanocompósitos a base de plata/carboximetilcelulosa con mayor actividad antimicrobiana para los tres microorganismos se evaluaron concentraciones no tóxicas para las células gingivales humanas. Como se observa en la fig. 9, el nanocompósito causó una inhibición del crecimiento de 60% y 67% de *C. albicans* a 4.8 y 9.6  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, 27% a 66% de inhibición del crecimiento de *E. faecalis* a concentraciones que varían de 1.2 a 9.6  $\mu\text{g/mL}$ , y 50% a 96% de inhibición del crecimiento de *F. nucleatum* a 0.6 a 9.6  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

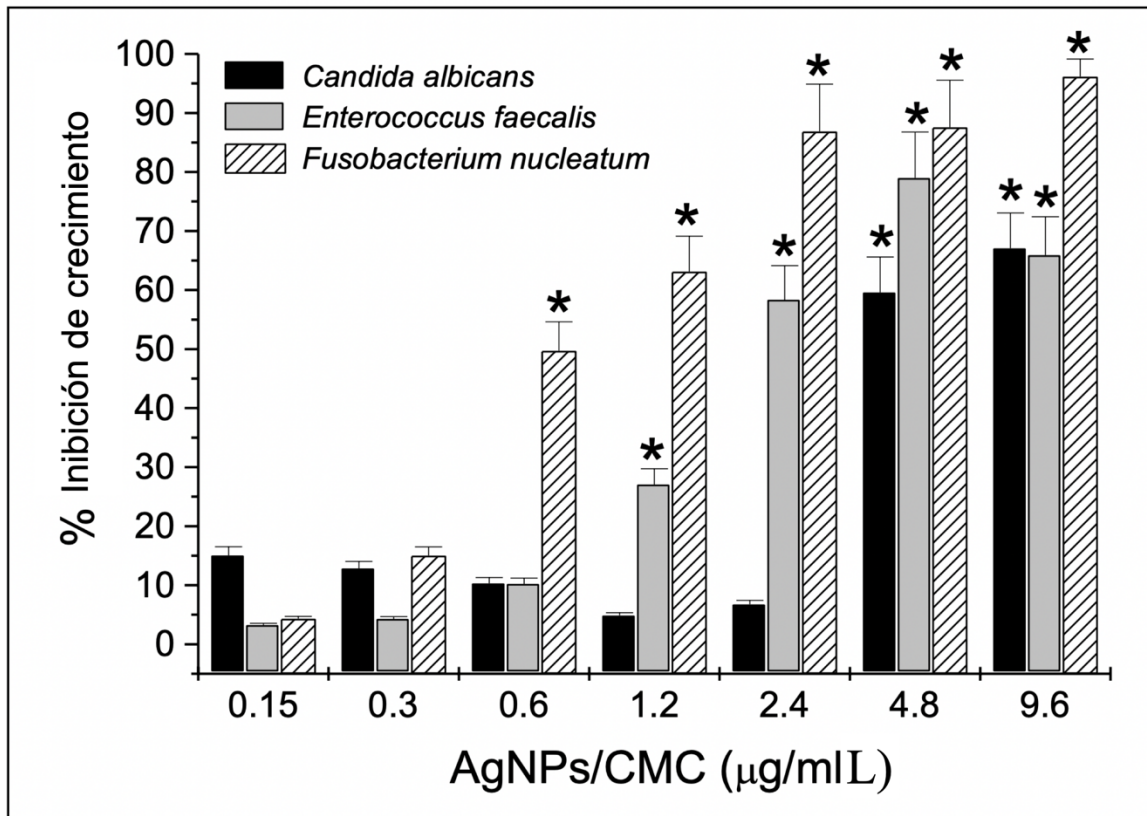


Figura 9. Actividad antimicrobiana de nanocompósitos a base de plata/carboximetilcelulosa

#### 7.4 Actividad anti-biofilm de nanocompósitos a base de plata/carboximetilcelulosa *in vitro*

Una vez identificada la concentración mínima con efecto antimicrobiano sobre los tres microorganismos se procedió a inducir la a formación del biofilm heterogéneo, la cual posterior a 7 días fue evaluado mediante tinción con Cristal Violeta 1% y Rojo Congo 1% para la identificación de los microorganismos utilizando microscopía óptica y de epifluorescencia que muestra estructuras de *C. albicans* en combinación con *E. faecalis* y *F. nucleatum* (Fig. 10). Se observó un efecto anti-biofilm a 4.8  $\mu\text{g/mL}$  del nanocompósito, utilizando PBS como control negativo y el NaClO como control positivo, identificando una reducción del biofilm similar a la generada por el NaClO. Sin embargo, a diferencia del NaClO el nanocompósito mostró pequeños grupos, mientras que PBS y los controles no tratados no alteraron el biofilm (Fig. 10).

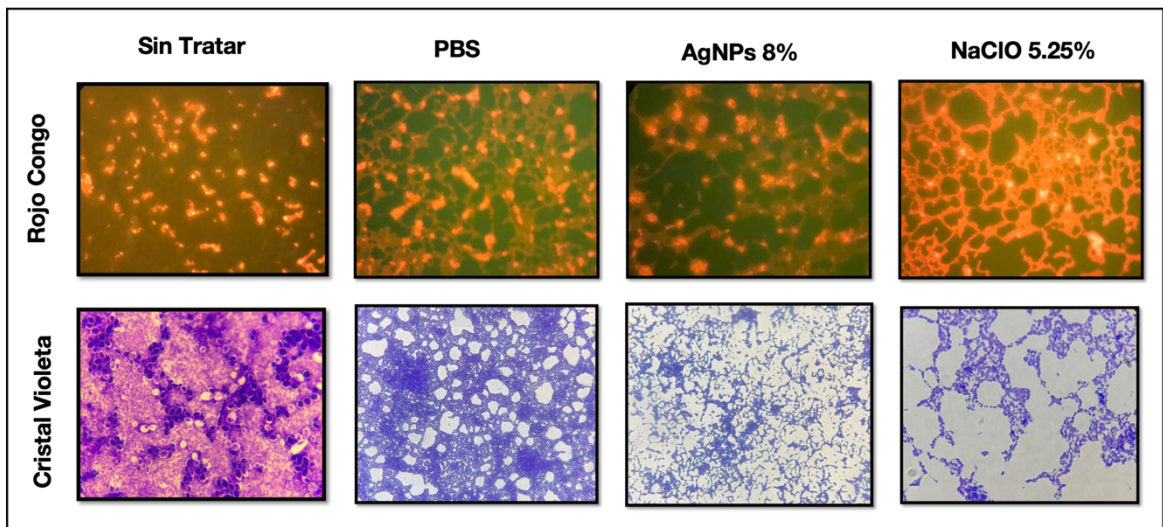


Figura 10. Actividad anti-biofilm de nanocompositos a base de plata/carboximetilcelulosa

## 7.5 Actividad anti-biofilm de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa sobre discos de dentina

Una vez obtenido los resultados de la actividad antibiofilm, se procedió la elaboración del biofilm heterogéneo sobre discos de dentina. En la fig.11 se muestra un esquema con los resultados con cada uno de los tratamientos, para lo cual se utilizó un análisis digital de las imágenes y litofanía en 3D. Se evaluó el efecto de 4.8  $\mu\text{g/mL}$  de nanocompuestos, 5,25% de NaClO (control positivo) y PBS (control negativo). Los resultados mostraron una reducción similar y significativa ( $p < 0.05$ ) del área del biofilm después de la exposición de nanocompuestos (reducción del 58%) y para el NaClO (reducción del 56%), en comparación con el control PBS (fig.11a), que se visualiza en la fig. 11b.

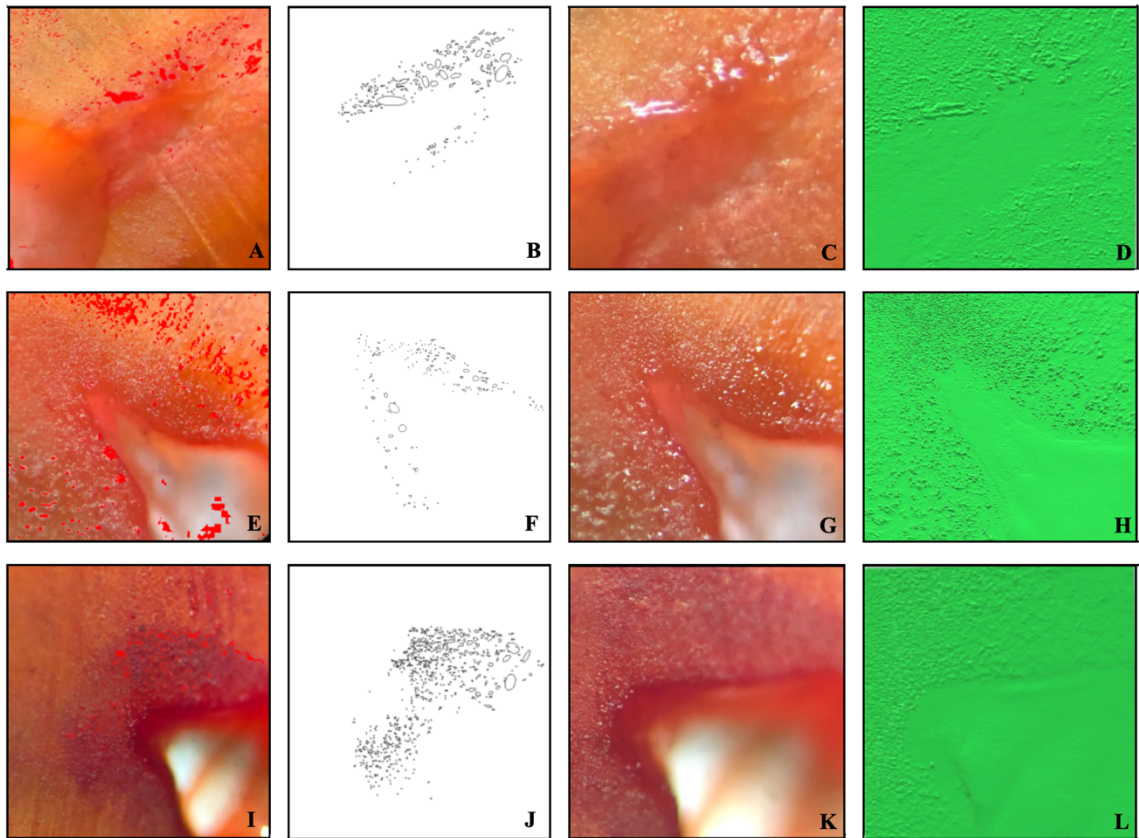


Figura 11. Análisis de biofilm heterogéneo sobre discos de dentina. (A y B) Procesado de imagen con PBS, (C) Zoom de fotografía con PBS, (D) Litofanía 3D con PBS (E y F) Procesado de imagen con NaOCl, (G) Zoom de fotografía con NaOCl, (H) Litofanía 3D con NaOCl, (I y J) Zoom de fotografía con nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa, (K) Zoom de fotografía con el nanocompuesto a base de plata/carboximetilcelulosa (L) Litofanía 3D con el nanocomposito a base de plata/carboximetilcelulosa-

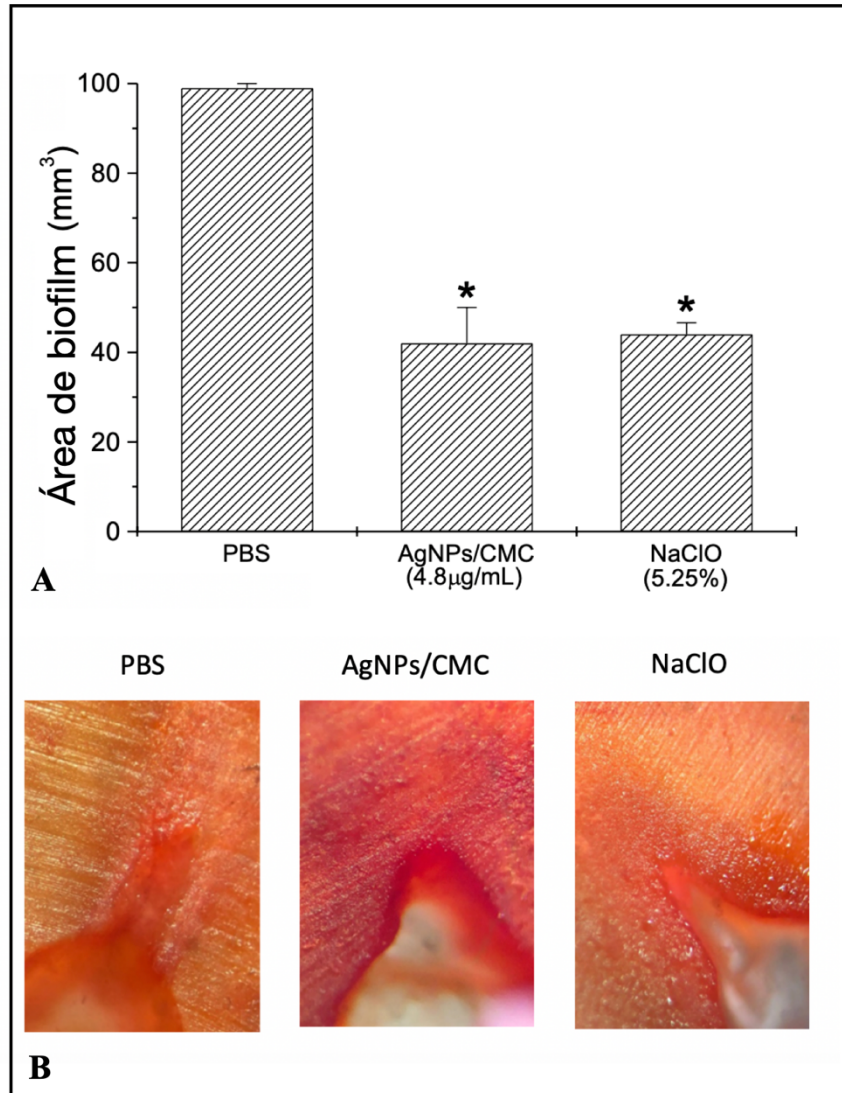


Figura 11. Actividad anti-biofilm de nanocompositos a base de plata/ carboximetilcelulosa sobre discos de dentina. (A) Reducción del área de la biofilm de nanocompósitos AgNP / CMC y NaClO. (B) Imágenes de reducción del biofilm.

## DISCUSIÓN

El tratamiento endodóntico tiene el objetivo de remover mecánicamente la dentina infectada así como desinfectar el sistema de conductos, sin embargo, puede presentar complicaciones futuras presentando infecciones endodónticas relacionadas con la formación de biofilm (Neelakantan y col., 2017) reportado en la literatura causada por microorganismos como *C. albicans*, *E. faecalis* y *F. nucleatum*, que representan especies microbianas con alta prevalencia al fracaso del tratamiento (Borzini y col., 2016; Pereira y col., 2017; Ashraf y col., 2007). La eliminación directa de estos microorganismos del conducto radicular depende de la acción mecánica de la instrumentación y del efecto antimicrobiano de las soluciones de irrigación, entre las cuales, el NaClO es el más utilizado como irrigante durante la terapia endodóntica, debido a su efecto biocida, capacidad de disolver tejido orgánico y necrótico (Faras y col., 2016). Un agente irrigante debe ser biocompatible y de baja citotoxicidad por el riesgo a extruirse a los tejidos perirradiculares durante el tratamiento, siendo NaClO altamente tóxico para los tejidos perirradiculares (Simeone y col., 2015; Uğur y col., 2018). Por lo tanto, es importante buscar nuevas sustancias de irrigación del conducto radicular con efecto biocida, sin efectos citotóxicos (Uğur y col., 2018).

Se ha demostrado que el nanocompósito inhibió significativamente el crecimiento de los microorganismos *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum* en estado planctónico como en biofilm heterogéneo así como en biofilm en discos de dentina. En este sentido, Besnis y col. en el 2014, informaron que una aplicación de nanorecubrimiento de plata en la dentina fue efectiva para prevenir la formación de biofilm mediada por *Streptococcus mutans* e inhibir el crecimiento bacteriano en suspensión, que se midió por la turbidez, la proporción de células vivas y muertas y la producción de lactato, en comparación con la clorhexidina y AgNO<sub>3</sub>, lo que sugiere que esta preparación

podría ser útil para proteger las superficies de los dispositivos médicos. Bajo las condiciones de la presente investigación se demostró que el nanocompósito tiene efectos biocidas contra los microorganismos *C. albicans*, *E. faecalis* y *F. nucleatum* productores de biofilm más prevalentes en los casos de necrosis pulpar y fracasos endodónticos (Borzini y col., 2016; Pereira y col., 2017; Ashraf y col., 2007), en comparación con el NaClO (Figs. 8-10). El nanocompósito no afectó la viabilidad de HFC a concentraciones experimentales que inhibieron el crecimiento microbiano y redujeron el área de biofilm (Fig. 10). Esto es importante ya que se ha demostrado que algunos desinfectantes convencionales inducen apoptosis y necrosis de éstas células, incluidos NaClO, peróxido de hidrógeno y dióxido de cloro, que se absorben en el torrente sanguíneo a través de la mucosa oral o por el foramen apical de los órganos dentales generando citotoxicidad e inflamación de los tejidos perirradiculares (Myers y col., 1978; Bartelstone y col., 1951; Someya y col., 2008; Nishikiori y col., 2008), daño en el ADN (Besinis y col., 2018) e incluso cáncer (Ohnishi y col., 2002). Los posibles mecanismos de acción microbiana de nanocompósitos a base de plata/carboximetilcelulosa implican toxicidad mediada por iones metálicos libres (Feng y col., 2002, Jung y col., 2002) y estrés oxidativo (Foldbjerg y col., 2009). El uso de desinfectantes alternativos, como el agente antibacteriano AgNP, representa una oportunidad para superar la resistencia bacteriana y las limitaciones de eficacia a corto plazo de otros, como la clorhexidina (Pallasch y col., 2003; Ribeiro y col., 2007; Besinis y col., 2014).

Por otro lado, se ha informado que los nanocompósitos con grafeno se oxidan, polidimetilsiloxano o dióxido de titanio más plata y otras nanopartículas metálicas poseen actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y células fúngicas, así como mantienen la citocompatibilidad con células eucariotas, obteniendo resultados similares a los utilizados con CMC en este estudio (Jang y col., 2020; Sankar y col., 2017; Alavi y col., 2018).

Se observó que cuando los discos de dentina se exponían a un biofilm heterogéneo, se eliminaba parcialmente con una solución de irrigación a base de NaClO, lo que mostraba resultados comparables de los del nanocompósito. Otros estudios han informado que los

AgNP fueron efectivos para inhibir las células planctónicas, pero fueron menos activos para eliminar los biofilms después de 5 minutos de tratamiento, en comparación con la clorhexidina o NaClO (Rodrigues y col., 2018; Afkhami y col., 2015). Esto está relacionado con nuestros resultados, ya que se observó una reducción del biofilm en los discos de dentina, sin embargo, el nanocompósito a base de plata/carboximetilcelulosa mostró resultados similares a los de NaClO (58% y 56% de reducción, respectivamente), después de 30 s de tratamiento.

Estos resultados demostraron el uso potencial de agentes de irrigación alternativos como los nanocompósitos en el tratamiento endodóntico, con mayor compatibilidad de células normales y efecto biocida de amplio espectro, así como un tiempo de exposición más corto que los procedimientos convencionales.



## **CONCLUSIONES**

El uso de nanocompósitos a base de plata/carboximetilcelulosa podría emplearse como una solución irrigante por su efecto antimicrobiano en un tiempo de 30 seg, resultando una alternativa potencialmente efectiva para prevenir infecciones después del tratamiento endodóntico.

## **PERSPECTIVAS**

La implementación de nanocompuestos a base de plata/carboximetilcelulosa en la terapia endodóntica ha sido reportada con anterioridad, sin embargo su efecto ante la presencia de un biofilm heterogéneo donde además de bacterias se incluyó hongos resulta innovador para la presente investigación y abre camino a futuras investigaciones, para lo cual no solo se puede promover su uso en endodoncia como irrigante, además se puede implementar como una nueva alternativa como medicación intraconducto entre cita y cita durante el tratamiento endodóntico.

## BIBLIOGRAFÍA

Ashraf H, Samiee M, Eslami G, Hosseini MRG. Presence of *Candida albicans* in root canal system of teeth requiring endodontic retreatment with and without periapical lesions. *Iran Endod J.* 2007;2(1):24-8.

Abarajithan, M., Dham, S., Velmurugan, N., Valerian-Albuquerque, D., Ballal, S., & Senthilkumar, H. (2011). Comparison of Endovac irrigation system with conventional irrigation for removal of intracanal smear layer: an in vitro study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 112(3), 407-411.

Afkhami F, Pourhashemi SJ, Sadegh M, Salehi Y, Fard MJK. (2015). Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. *J Dent.* 2015;43(12):1573-79.

Alavi, M., & Karimi, N. (2018). Antiplanktonic, antibiofilm, antismearing motility and anti-quorum sensing activities of green synthesized Ag-TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>-Ag, Ag-Cu and Cu-Ag nanocomposites against multi-drug-resistant bacteria. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 46(sup3):S399-S413.

Bartelstone HJ. Radioiodine penetration through intact enamel with uptake by bloodstream and thyroid gland. *J Dental Res.* 1951;30:728-33.

Basrani E, Cañete M, 1988. Irrigación y aspiración. Editorial Médica Panamericana. *Endodoncia Técnicas en preclínica y clínica.* Buenos Aires, Argentina. pp. 128-131.

Baumgartner JC. 2004. Microbiological and molecular analysis of endodontic infections. *Endodontic topics*, 7(1):35-51.

Besinis A, De Peralta T, Handy RD. Inhibition of biofilm formation and antibacterial properties of a silver nano-coating on human dentine. *Nanotoxicology*. 2014;8(7):745-754.

Bhaskar SN (1996) Periapical lesions-types, incidence, and clinical features. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 21, 657–71

Borzini L, Condò R, De Dominicis P, Casaglia A, Cerroni L. Root canal irrigation: Chemical agents and plant extracts against *Enterococcus faecalis*. *Open Dent J*. 2016;10:692-703.

Byström, A., & Sundqvist, G. (1983). Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 55(3), 307-312.

Chávez de Paz, L. (2004). Gram-positive organisms in endodontic infections. *Endodontic Topics*, 9(1), 79-96.

Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., & Ehrlich, G. (2003). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *The Journal of clinical investigation*, 112(10), 1466-1477.

Dawson TM, Snyder SH. 1991. Epidemiology of heart failure. *Journal of Neuroscience* 14:5147-5149.

de Paz Villanueva, L. E. C. (2002). *Fusobacterium nucleatum* in endodontic flare-ups. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 93(2), 179-183.

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193

Drake, D. R., Wiemann, A. H., Rivera, E. M., & Walton, R. E. (1994). Bacterial retention in canal walls in vitro: effect of smear layer. *Journal of endodontics*, 20(2), 78-82.

Estrela, C., Sydney, G. B., Figueiredo, J. A. P., & Estrela, C. R. D. A. (2009). A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. *Journal of Applied Oral Science*, 17(2), 87-91.

Faras F, Abo-Alhassan F, Sadeq A, Burezq H. Complication of improper management of sodium hypochlorite accident during root canal treatment. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2016;6(5):493-6.

Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*. 2000;52:662-668.

Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett*. 2009;190:156-162.

Fouad, A. F., Zerella, J., Barry, J., & Spångberg, L. S. (2005). Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 99(1), 112-118.

Friedman, S. (2002). Considerations and concepts of case selection in the management of post-treatment endodontic disease (treatment failure). *Endodontic Topics*, 1(1), 54-78.

Garza-Navarro, M. A., Aguirre-Rosales, J. A., Llanas-Vázquez, E. E., Moreno-Cortez, I. E., Torres-Castro, A., & González-González, V. (2013). Totally ecofriendly synthesis of silver nanoparticles from aqueous dissolutions of polysaccharides. *International Journal of Polymer Science*, 2013.

Glossary: American Association of Endodontics, 1998

Gopikrishna, V., Pare, S., Kumar, A. P., & Narayanan, L. L. (2013). Irrigation protocol among endodontic faculty and post-graduate students in dental colleges of India: A survey. *Journal of conservative dentistry: JCD*, 16(5), 394.

Graves, D. T., Oates, T., & Garlet, B18G. P. (2011). Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of oral microbiology*, 3(1), 5304.

Grossman, L. I. (1967). Origin of microorganisms in traumatized, pulpless, sound teeth. *Journal of dental research*, 46(3), 551-553.

Hamblin, M. R., & Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3(5), 436-450.

Henderson B y Wilson M. 1998. Commensal communism and the oral cavity. *Journal of dental research* 77(9):1674-1683.

Hülsmann, M., & Denden, J. M. (1998). Incidentes iatrogénicos durante la irrigación del conducto radicular-revisión de la literatura y presentación de un caso clínico. *J Endodon Pract*, 4(4), 15-26.

Hülsmann, M., & Hahn, W. (2000). Complications during root canal irrigation—literature review and case reports. *International endodontic journal*, 33(3), 186-193.

Jang J, Choi Y, Tanaka M, Choi, J. Development of silver/graphene oxide nanocomposites for antibacterial and antibiofilm applications. *J Ind Eng Chem*. 2020;83:46-52.

Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:2171-2178.

Kakehashi, S., Stanley, H. R., & Fitzgerald, R. J. (1965). The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 20(3), 340-349.

Kim, D. H., Kim, H. Y., Kim, H. G., Ryu, J. H., & Lee, H. M. (2007). The solid-to-liquid transition region of an Ag–Pd bimetallic nanocluster. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 20(3), 035208.

Kishen, A. (2010). Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. *Endodontic Topics*, 22(1), 99-123

Lin, L. M., Huang, G. T. J., & Rosenberg, P. A. (2007). Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *Journal of endodontics*, 33(8), 908-916.

Love, R. M. (2001). *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. *International endodontic journal*, 34(5), 399-405.

Moraes, S. R., Siqueira Jr, J. F., Rocas, I. N., Ferreira, M. C. S., & Domingues, R. M. C. P. (2002). Clonality of *Fusobacterium nucleatum* in root canal infections. *Oral microbiology and immunology*, 17(6), 394-396.

Myers DR, Shoaf HK, Dirksen TR, Pashley DH, Whitford GM, Reynolds KE. Distribution of <sup>14</sup>C-formaldehyde after pulpotomy with formocresol. *J Am Dental Assoc*. 1978;96:805-13.

Nair, P. N. R. (2006). On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *International Endodontic Journal*, 39(4), 249-281.

Nair, P. N. R., Henry, S., Cano, V., & Vera, J. (2005). Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 99(2), 231-252.

Nair, P. R. (1997). Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontology 2000*, 13(1), 121-148.

Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, Cheung GSP. Biofilms in endodontics—current status and future directions. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1748-69.

Nielsen, B. A., & Baumgartner, J. C. (2007). Comparison of the EndoVac system to needle irrigation of root canals. *Journal of endodontics*, 33(5), 611-615.

Nishikiori R, Nomura Y, Sawajiri M, Masuki K, Hirata I, Okazaki M. Influence of chlorine dioxide on cell death and cell cycle of human gingival fibroblasts. *J Dent*. 2008;36(12):993-8.

Norrington, D. W., Ruby, J., Beck, P., & Eleazer, P. D. (2008). Observations of biofilm growth on human dentin and potential destruction after exposure to antibiotics. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 105(4), 526-529.

Odell LJ, Baumgartner JC, Xia T, David LL. 1999. Survey for collagenase gene prtC in *Porphyromonas gingivalis* and *Porphyromonas endodontalis* isolated from endodontic infections *J. Endod Aug*; 25(8):555-8.



Ohnishi S, Murata M, Kawanishi S. DNA damage induced by hypochlorite and hypobromite with reference to inflammation-associated carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2002;178:37-42.

Pallasch TJ. Antibiotic resistance. *Dental Clin.* 2003;47(4):623-39.

Pereira RS, Rodrigues VAA, Furtado W, Gueiros S, Pereira GS, Avila-Campos MJ. Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. *Anaerobe.* 2017;48:12-18.

Peters, O. A. (2004). Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. *Journal of endodontics*, 30(8), 559-567.

Pinheiro, E. T., Gomes, B. P. F. A., Ferraz, C. C. R., Sousa, E. L. R., Teixeira, F. B., & Souza-Filho, F. J. (2003). Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *International endodontic journal*, 36(1), 1-11.

Ribeiro AR, Kellermann A, Santos LRD, Bessa MC, Nascimento VPD. Salmonella spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the Salmonella enteritidis isolates. *Braz J Microbiol.* 2007;38(2):296-9.

Ricucci, D., & Siqueira Jr, J. F. (2010). Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *Journal of endodontics*, 36(8), 1277-1288.

Rôças, I. N., Hülsmann, M., & Siqueira Jr, J. F. (2008). Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *Journal of endodontics*, 34(8), 926-931.

Rodrigues CT, De Andrade FB, De Vasconcelos LRSM, Midená RZ, Pereira TC, Kuga MC, Duarte MAH, Bernardineli N. Antibacterial properties of silver nanoparticles as a

root canal irrigant against *Enterococcus faecalis* biofilm and infected dentinal tubules. *Int Endod J*. 2018;51(8):901-911.

Safavi, K. E., Spngberg, L. S., & Langeland, K. (1990). Root canal dentinal tubule disinfection. *Journal of Endodontics*, 16(5), 207-210.

Sankar GG, Murthy PS, Das A, Sathya S, Nankar R, Venugopalan VP, Doble M. Polydimethyl siloxane based nanocomposites with antibiofilm properties for biomedical applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017;105(5):1075-82.

Schilder, H. (1974). Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am*, 18, 269-296.

Shrestha, A., & Kishen, A. (2016). Antibacterial nanoparticles in endodontics: a review. *Journal of endodontics*, 42(10), 1417-1426.

Simeone M, Valletta A, Giudice A, Di Lorenzo P, Iandolo A. The activation of irrigation solutions in endodontics: a perfected technique. *G Ital Endod*. 2015;29(2):65-69.

Siqueira Jr, J. F. (2002). Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 94(3), 281-293.

Siqueira Jr, J. F., & Rôças, I. N. (2004). Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 97(1), 85-94.

Siqueira JR, J. F., & Rôças, I. N. (2014). Present status and future directions in endodontic microbiology. *Endodontic topics*, 30(1), 3-22.

Siqueira Jr, J. F., Rôças, I. N., Favieri, A., & Lima, K. C. (2000). Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics*, 26(6), 331-334.

Someya H, Higo Y, Ohno M, Tsutsui TW, Tsutsui T. Clastogenic activity of seven endodontic medications used in dental practice in human dental pulp cells. *Mutat Res.* 2008;650:39-47.

Soukos, N. S., & Goodson, J. M. (2011). Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontology 2000*, 55(1), 143-166.

Stathopoulou, M. E. K., Banti, C. N., Kourkoumelis, N., Hatzidimitriou, A. G., Kalampounias, A. G., & Hadjidakou, S. K. (2018). Silver complex of salicylic acid and its hydrogel-cream in wound healing chemotherapy. *Journal of inorganic biochemistry*, 181, 41-55.

Sundqvist, G. (1976). Bacteriological studies of necrotic dental pulps (Doctoral dissertation, Umeå University).

Sundqvist, G. (1992). Ecology of the root canal flora. *Journal of endodontics*, 18(9), 427-430.

Sundqvist, G., & Figdor, D. (2003). Life as an endodontic pathogen: Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endodontic Topics*, 6(1), 3-28.

Torabinejad M, Walton RE. 2010. *Endodoncia Principios y prácticas*. Elsevier, pp 49-64.  
Uğur AZ, Akpınar KE, Hepokur C, Erdönmez D. Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. *Braz Oral Res.* 2018;32:1-8.

Wu, D., Fan, W., Kishen, A., Gutmann, J. L., & Fan, B. (2014). Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of endodontics*, 40(2), 285-290.

Zehnder, M. (2006). Root canal irrigants. *Journal of Endodontics*, 32(5),

## RESÚMEN BIOGRÁFICO

Elizabeth Madla Cruz

Candidata para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis:

ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE UN NANOCOMPÓSITO A BASE DE PLATA/CARBOXIMETILCELULOSA Y EL HIPOCLORITO DE SODIO EN UN MODELO DE BIOFILM HETEROGÉNEO *IN VITRO* Y EN DISCOS DE DENTINA HUMANA

**Campo de Estudio:** Ciencias de la Salud

### **Datos Personales:**

Nacida en la ciudad de Monterrey, N.L. el 3 de septiembre de 1985, hija de Ricardo Madla de la Garza y de Hortensia Cruz Menzhaca.

### **Educación:**

Egresada de la Licenciatura de Cirujano Dentista, Facultad de Odontología UANL en el 2007, egresada de la Maestría en Ciencias Odontológicas con Especialidad en Endodoncia, Facultad de Odontología UANL en el 2012.

### **Experiencia Profesional:**

Catédrica, instructora de clínica y sub-coordinadora académica del Posgrado de Endodoncia de la Facultad de Odontología UANL del 2012 a la fecha. Asesora de casos clínicos y de proyectos de investigación, práctica privada dedicada a la endodoncia del 2012 a la fecha.

# ANEXO

## Journal Pre-proof

Antimicrobial activity and inhibition of biofilm formation *in vitro* and on human dentine by silver nanoparticles/carboxymethyl-cellulose composites



Elizabeth Madla-Cruz (Methodology) (Investigation) (Writing - original draft), Myriam De la Garza-Ramos (Conceptualization) (Methodology) (Supervision)-ce:contributor-role>Funding Acquisition), César I. Romo-Saenz (Conceptualization) (Methodology) (Supervision) (Validation) (Resources), Patricia Tamez-Guerra (Validation) (Formal analysis) (Writing - original draft), Marco A. Garza-Navarro (Resources) (Methodology), Victor Urrutia-Baca (Validation)-ce:contributor-role>Formal Analysis) (Writing - original draft), María A. Martínez-Rodríguez (Methodology) (Validation), Ricardo Gomez-Flores (Conceptualization) (Methodology) (Supervision) (Validation) (Resources) (Writing - review and editing) (Funding acquisition)

PII: S0003-9969(20)30321-6

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104943>

Reference: AOB 104943

To appear in: *Archives of Oral Biology*

Received Date: 28 August 2020

Revised Date: 3 October 2020

Accepted Date: 5 October 2020

Please cite this article as: Madla-Cruz E, De la Garza-Ramos M, Romo-Saenz CI, Tamez-Guerra P, Garza-Navarro MA, Urrutia-Baca V, Martínez-Rodríguez MA, Gomez-Flores R, Antimicrobial activity and inhibition of biofilm formation *in vitro* and on human dentine by silver nanoparticles/carboxymethyl-cellulose composites, *Archives of Oral Biology* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104943>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Published by Elsevier.

**Antimicrobial activity and inhibition of biofilm formation *in vitro* and on human dentine by silver nanoparticles/carboxymethyl-cellulose composites**

Running title: Antibiofilm effect of Ag nanoparticles

Elizabeth Madla-Cruz<sup>a</sup>, Myriam De la Garza-Ramos<sup>b</sup>, César I. Romo-Saenz<sup>a</sup>, Patricia Tamez-Guerra<sup>a</sup>, Marco A. Garza-Navarro<sup>c</sup>, Victor Urrutia-Baca<sup>d</sup>, María A. Martínez-Rodríguez<sup>c</sup> and Ricardo Gomez-Flores<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología e Inmunología, San Nicolas de los Garza, Nuevo León, México, C.P. 66455

<sup>b</sup>Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Facultad de Odontología/Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), Monterrey, Nuevo León, México, CP. 64460

<sup>c</sup>Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, C.P. 66455

<sup>d</sup>CHRISTUS Excellence and Innovation Center, Monterrey, N.L., México C.P. 66260.

\*Corresponding author: Tel: +5281(83) 29-40-00 ext. 6453. E-mail addresses:

[ricardo.gomezf@uanl.mx](mailto:ricardo.gomezf@uanl.mx); [rgomez60@hotmail.com](mailto:rgomez60@hotmail.com).



### Highlights

- Quasi-spherical AgNPs/CMC composites inhibited *in vitro* growth of *C. albicans*, *E. faecalis*, and *F. nucleatum*
- AgNPs/CMC composites significantly reduced heterogeneous biofilm formation on dentin discs
- AgNPs/CMC composites are not toxic to normal cells, possess broad-spectrum biocidal effect, and require shorter exposure time than conventional procedures
- The use of AgNPs/CMC composites is recommended as alternative irrigation agents in endodontic treatments

### Abstract

**Objective:** To evaluate the antimicrobial activity of a silver nanoparticles/carboxymethyl-cellulose (AgNPs/CMC) composite on *in vitro* and dentine disc heterogeneous biofilms.

**Design:** AgNPs/CMC composite effect on normal human gingival fibroblast cells (HGF) viability was determined by the MTT reduction assay. In addition, antimicrobial effect of AgNPs/CMC composite on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and *Fusobacterium nucleatum* growth *in vitro* and heterogeneous biofilms, as well as dentine disc biofilms was evaluated.

**Results:** Quasi-spherical AgNPs/CMC composites, with a mean 22.3 nm particle-size were synthesized. They were not toxic to HGF cells at concentrations tested that were antimicrobial, however they caused significant cytotoxicity (89%,  $p < 0.05$ ) at concentrations  $\geq 15 \mu\text{g/mL}$ . *In vitro*, they inhibited up to 67%, 66%, and 96% *C. albicans*,

*E. faecalis*, and *F. nucleatum* growth at concentrations ranging from 1.2 µg/mL to 9.6 µg/mL, as compared with untreated control. We also demonstrated significant ( $p < 0.05$ ) 58% biofilm reduction by 4.8 µg/mL AgNPs/CMC composite on human dentine discs.

**Conclusion:** AgNPs/CMC composite showed anti biofilm activity on monocultures, heterogenous cultures, and dentine discs, resulting a potentially effective alternative to prevent and eliminate infections after endodontic treatment.

*Keywords:* Silver nanoparticle; carboxymethyl-cellulose; biocidal activity; composite; heterogeneous biofilm; dentine disc; oral pathogen; *Candida albicans*; *Enterococcus faecalis*; *Fusobacterium nucleatum*.

## 1. Introduction

The persistence of microbial infections in the root canal is mainly associated with a failure in the endodontic procedure (Nair, Sjögren, Krey, Kahnberg, & Sundqvist, 1990; Lin, Skribner, & Gaengler, 1992). A favorable outcome with root canal treatment significantly improves, if infection is effectively eradicated before the root canal system is obturated (Siqueira, 2001). Endodontic treatment is essentially directed toward the heal and prevention of periradicular infections (Siqueira & Lopes, 1999). In this regard, studies have revealed that the effectiveness of an endodontic treatment is affected by the presence of bacteria in the root canals at the time of filling (Fabricius, 2006). Sodium hypochlorite (NaOCl) is the most recommended root canal irrigant. Its aqueous solution is a dynamic balance of sodium hydroxide and hypochlorous acid, which on interaction with

microorganisms and organic tissue causes chloramination, amino acid neutralization, and saponification reactions leading to strong antibacterial and tissue dissolving effects (Estrela, Estrela, Barbin, Spano, Marchesan, & Pecora, 2002). However, it is very toxic if it reaches the periradicular tissues and does not eliminate all bacteria present in infected root canals (Sundqvist, Figdor, Persson, & Sjögren, 1998).

Knowledge of endodontic infections has significantly increased during the last 30 years, however several issues have not been elucidated (Siqueira, 2002). They are mediated by the formation of biofilms, which are mainly composed of heterogeneous bacteria (Siqueira, Rôças, & Ricucci, 2010), but in some cases, the yeast *Candida albicans* constitutes 30% to 40% of biofilms (Lucas, 1993), whereas *Enterococcus faecalis* is a predominant microorganism and occasionally the only species detected in root canals of teeth associated with persistent periradicular lesions (Stuart, Schwartz, Beeson, & Owatz, 2006). Furthermore, *Fusobacterium nucleatum* is a Gram negative anaerobic species of the phylum Fusobacteria, which is predominant in dental plaque biofilms. It plays a role in biofilm colonization by reducing conditions required for oxygen-intolerant anaerobes growth (Signat, Roques, Poulet, & Duffaut, 2011; Diaz, Zilm, & Rogers, 2002). In addition, its pathogenicity increases when it is exposed to oxygenated environments, causing important cell morphology alterations (Silva, Diniz, Cara, Santos, Nicoli, Carvalho, & Farias, 2005).

Biofilms allow the survival of bacterial species even in a nutrient deprived environment and show higher bacterial resistance due to the exopolysaccharide matrix (Ricucci, & Siqueira, 2010). Agents that alter this matrix may penetrate the biofilm and kill microorganisms (Kishen, 2010). Therefore, destroying or significantly reducing biofilms is essential for a successful endodontic treatment, as well as implementing advanced endodontic disinfection strategies, effective in eliminating planktonic bacteria and biofilms within the root canals. However, clinical studies have shown that even after meticulous chemomechanical disinfection and obturation, bacterial biofilm may still persist in the root canal system (Siqueira, Rôças, & Ricucci, 2010).

Recent developments in nanotechnology has prompted the generation of new nanostructures-based functional materials (Stathopoulou, Banti, Kourkoumelis, Hatzidimitriou, Kalampounias, & Hadjidakou, 2018). Because antimicrobial effect of silver

is well recognized, silver-based nanocomposites have been extensively used in many biocidal applications. In this regard, silver nanoparticles (AgNPs) bactericidal, fungicidal, and antiviral potential is well recognized (Stathopoulou, Banti, Kourkoumelis, Hatzidimitriou, Kalamponias, & Hadjikakou, 2018). AgNPs exhibit large surface area for contact, allowing attachment and penetration to bacteria cell membrane (Shrestha, & Kishen, 2016). In particular, AgNPs suspensions have been recommended as an alternative to root canal irrigation, not only for their strong bactericidal potential, but also for their biocompatibility, especially at low concentrations (Wu, Fan, Kishen, Gutmann, & Fan, 2014). It has been reported that AgNPs have a cytotoxicity that is proportional to their size, which is related to the generation of reactive oxygen species during their surface oxidation and the subsequent release of silver ions in biological environments (Bapat, Chaubal, Joshi, Bapat, Choudhury, Pandey, Gorain, & Kesharwani, 2018).

Furthermore, green chemistry methodologies avoid production of toxic species to human health and the environment (Moulton, Braydich-Stolle, Nadagouda, Kunzelman, Hussain, & Varma, 2010). Accordingly, the synthesis of AgNPs following green chemistry routes has been successfully achieved using biopolymers such as chitosan, poly(lactic acid), sodium alginate, cellulose, and carboxymethyl-cellulose (CMC) as reducing and capping agents (Shahid-ul-Islam, Butola, & Kumar, 2020; Cavallaro, Lazzara, Milioto, Parisi, Evtugyn, Rozhina, & Fakhrullin, 2018; Garza-Navarro, M.A., Aguirre-Rosales, Llanas-Vázquez, Moreno-Cortez, Torres-Castro, & González-González, 2013).

Specifically, CMC is a promising reducing and immobilization polymer for AgNPs green synthesis, due to its biocompatible and biodegradable characteristics (Mirzaei-Mohkam, Garavand, Dehnad, Keramat, & Nasirpour, 2019; Ruan, Zhang, Wang, Sun, Gao, Xiong, & Liang, 2019). It does not cause significant toxic effects on epithelial cells (Lee, Lee, Che, & Lee, 2015) or affect bacterial adhesion (Ye, Ma, Qin, & Liu, 2018; Wilson, & Harvey, 1989). Moreover, the abundant hydroxyl and carboxymethyl groups on its molecular structure makes possible the reduction of silver ions and subsequent immobilization of AgNPs. Accordingly, it has been reported the “green” preparation of CMC-AgNPs composites with a good particle size control and remarkable efficiency over the silver ions reduction (Garza-Navarro, M.A., Aguirre-Rosales, Llanas-Vázquez, Moreno-Cortez, Torres-Castro, & González-González, 2013; Martínez-Rodríguez, Madla-

Cruz, Urrutia-Baca, De la Garza-Ramos, González-González, & Garza-Navarro, 2020). Hence, the aim of the present study was to evaluate the antimicrobial effect of green synthesized AgNPs/CMC composite on endodontic biofilms, as well as its cytotoxicity.

## 2. Material and methods

### 2.1 Green synthesis and characterization of AgNPs/CMC composite

CMC with degree of substitution of 1.2 and molecular weight of 120 kDa, and silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Deionized water (Barnstead EASYpure II system with resistivity of  $18.2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$  at  $25^\circ\text{C}$ ) was used to prepare all solutions in this investigation. AgNPs synthesis was performed as previously reported (Garza-Navarro, Aguirre-Rosales, Llanas-Vázquez, Moreno-Cortez, Torres-Castro, & González-González, 2013). In brief, aqueous CMC and  $\text{AgNO}_3$  solutions were prepared at concentrations of  $15 \text{ mg/mL}$  and  $0.94 \text{ mg/mL}$ , respectively, after which  $20 \text{ mL}$  of CMC were placed in a round-bottom three-neck flask (reactor) and stirred for  $10 \text{ min}$  at room temperature ( $25^\circ\text{C}$ ). Next,  $10 \text{ mL}$  of  $\text{AgNO}_3$  solution were added to the reactor and temperature was raised to  $90^\circ\text{C}$ ; reaction was kept at this temperature for  $24 \text{ h}$  under reflux conditions, after which, resultant reddish dispersion was poured into a previously cooled round-bottom flask to rapidly reach room temperature. Dispersion was then frozen, lyophilized, weighted, and dissolved in deionized water to obtain AgNPs/CMC composite dispersions. AgNPs/CMC composite crystalline and morphological features, and chemical composition were examined by transmission electron microscopy in a Field Emission Gun, FEI Titan G2 80-300 microscope operated at  $300 \text{ kV}$ , using electron microscopy techniques as bright field (BF) and Z-contrast imaging (HAADF-STEM), as well as selected area electron diffraction (SAED) and X-ray energy dispersive spectroscopy (XEDS). For TEM specimen preparation, an aliquot of the composite aqueous dispersion was placed onto a lacey-carbon-Cu-grid. The specimen was dried under room conditions, prior to its characterization.

### 2.2 Effect of AgNPs/CMC composite on human gingival fibroblast cells (HGF) viability

The cytotoxic effect of AgNPs/CMC composite on HGF cells (ATCC® PCS-201-018™) was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazole (MTT) bromide (Sigma-Aldrich) reduction method in flat-bottomed 96-well microplates (Corning Incorporated, Corning, NY). For this, medium from confluent cell cultures contained in 25 cm<sup>2</sup> bottles, was discarded and two washes with PBS solution containing 0.004% EDTA were performed, after which 500 µL of 0.05% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) were added and incubated at 37 °C for 15 min. Suspension cell count was determined by mixing 20 µL of cell suspension with 20 µL of 0.4% trypan blue (Gibco, Carlsbad, CA). Next, 5 X 10<sup>3</sup> viable cells/well in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), were incubated in flat-bottomed 96-well microplates at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> until confluence (48 h to 72 h), after which 1:2 serial dilutions of 60 µg/mL AgNPs/CMC composite or 5.25% (w/v) sodium hypochlorite (NaOCl; positive control) (1.875 to 60 mg/mL and 0.164 to 5.25% (w/v), respectively) were added and incubated for additional 24 h and 48 h (Staudte, Güntsch, Völpel, & Sigusch, 2010), using 2% Triton X-100 and DMEM as positive and negative controls, respectively. Culture medium was then discarded, and cell layers were washed once with PBS solution containing 0.004% EDTA. Next 30 µL of MTT (3 mg/mL) were added to the wells and incubated for 1 hour, after which 200 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to dissolve formazan crystals and optical densities (ODs) read at 570 nm in a Smart Spectrophotometer (Bio-Rad, Hercules, CA). Percent cytotoxicity was calculated as follows: % Cytotoxicity = (A<sub>570</sub> treated cells/A<sub>570</sub> untreated cells) X 100.

### 2.3 Antimicrobial effect of AgNPs/CMC composite

*Candida albicans* (ATCC® 90029™; aerobic microorganism), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 11420™; facultative microorganism), and *Fusobacterium nucleatum* (ATCC® 10953™; anaerobe microorganism that grows under aerobic conditions in biofilms (Gursoy, Pöllänen, Könönen, & Uitto, 2010) and adapts to oxidative stress (Silva, Diniz, Cara, Santos, Nicoli, Carvalho, & Farias, 2005)), were obtained from the microbial culture

collection of the Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Next, 100  $\mu\text{L}$  of  $2 \times 10^6$  cells/mL of microbial suspensions were independently incubated in the presence or absence of 1:2 serial dilutions of 9.6  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs/CMC composite suspension (this concentration was selected based on lack of toxicity to normal cells), 5.25% (w/v) NaOCl, and culture medium (negative control) in Bacto™ brain heart infusion (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI) in flat-bottomed 96-well plates (Corning Incorporated) for 24 h at 37 °C on aerobic conditions (Stowe, Sedgley, Stowe, & Fenno, 2004). Microbial growth was then evaluated by measuring ODs at 600 nm, using a microplate reader (Multiskan™ Go Microplate Spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific). Percent growth inhibition was calculated as follows: % Growth inhibition =  $(\text{OD}_{600} \text{ untreated cells} / \text{OD}_{600} \text{ treated cells}) \times 100$ .

#### 2.4 Effect of AgNPs/CMC on heterogeneous biofilms

Two-milliliter of  $1 \times 10^6$  cells/mL of *C. albicans*, *E. faecalis*, and *F. nucleatum* combined cultures were incubated for 7 days at 37 °C under aerobic conditions in flat-bottomed 96-well plates (Corning Incorporated). Heterogeneous biofilms were then treated with 4.8  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs-CMC composite [concentration that significantly inhibits 60%, 79%, and 88% of these microorganisms, respectively (Fig. 3)], 5.25% (w/v) NaOCl, and the negative controls PBS and culture medium for 30 s (common exposure time to antimicrobial agents during tooth brushing and mouth rinsing (Miller & Baumgartner, 2010) at room temperature (25 °C) (Allaker & Yuan 2019). Next, they were stained with 1% crystal violet [useful to morphologically differentiate among the three species of microorganisms (yeasts, cocci, and bacilli)] and 1% Congo red (allows for *C. albicans* detection), evaluated under optical and epifluorescence microscopy (AxioStar Plus®, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) respectively, at 40 X magnification, and images registered in a digital camera (Canon®, PowerShot G10, Canon Inc., Tokyo, Japan).

#### 2.5 Effect of AgNPs/CMC on dentine disc biofilms

Dentine discs were prepared from the root segments of extracted human premolars, which were kindly donated by the Facultad de Odontología at Universidad Autónoma de Nuevo León, México. For this, 2 mm thickness cross sections were cut with a precision saw (IsoMet Low Speed Saw; Buehler, Lake Bluff, IL) and a precision cutting device (IsoMet Diamond Wafering Blades; Buehler). Discs were then treated with 1% (w/v) NaOCl for 15 minutes, after which they were rinsed with water and sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min. Heterogeneous biofilms were grown by incubating the discs with two milliliters of BHI medium containing  $1 \times 10^6$  cells/mL of *C. albicans*, *E. faecalis*, and *F. nucleatum* cultures in exponential phase, in 6-well plates (Corning Incorporated) at 37 °C for 7 days on aerobic conditions. Dentine disc biofilms were then gently treated with 4.8 µg/mL AgNPs/CMC composite or 5.25% (w/v) NaOCl for 30 s at room temperature and stained with 0.25% safranin (Sigma-Aldrich). Antibiofilm activity was then evaluated under a stereoscope (Carl Zeiss) at 10 X magnification, using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD) to determine the biofilm area present on dentine discs.

#### 2.6 Statistical analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  SD of two triplicate determinations per treatment from three independent experiments. Level of significance was assessed by the Student *t* test and one-way ANOVA, using the statistical data package SPSS (v. 21).

### 3. Results

#### 3.1 Characterization of AgNPs/CMC composite

As shown in Figures 1a and 1b, synthesized nanoparticles assembled into aggregates, which might be related to their interactions with CMC. Moreover, these nanoparticles displayed a quasi-spherical morphology (Fig. 1c). In addition, Figure 1d depicts the chemical composition of this sample, which was recorded by XEDS from the indicated zone in Figure 1c. Elemental analysis obtained from this spectrum agrees with that expected for AgNPs/CMC, since it is possible to notice the presence of C and Ag (inset in Fig. 1d). We



also observed the presence of a Cu signal, which corresponded to the grid that was used for sample characterization (see Figure 1d). Figure 1e displays the adjust of experimental data to the Gaussian statistic model from particle size measuring. Experimental data were obtained from measuring 300 randomly selected particles. As it is observed, the center of particle size distribution was 22.3 nm, with a standard deviation of 11.1 nm (Fig. 1e). Furthermore, Figure 1f shows a BF image obtained at 1.25 MX from a nanoparticle in this sample. Herein is possible to notice a regular atomic arrangement, depicting lattice fringes with a regular interplanar spacing of 2.4 Å. This spacing is congruent with that reported for family planes {111} of the crystalline structure of silver (see JCPDS: 04-0783). Similarly, in SAED pattern reported in Figure 1g, we recognized diffraction rings related to family planes {111}, {220}, and {311} reported for the FCC packing of silver (JCPDS: 04-0783). These results confirmed the obtaining of the AgNPs/CMC composite (Fig. 1h).

### 3.2 Effect of AgNPs/CMC composite on HGF viability

As shown in Figure 2, AgNPs/CMC composite and NaOCl caused significant ( $p < 0.05$ ) 36% to 89% and 41% to 100% cytotoxicity against HGF at concentrations ranging from 15 to 60 µg/mL and 0.656% to 5.25% (w/v), respectively. Triton X and DMEM positive and negative controls caused 100% and 0% cytotoxicity, respectively.

### 3.3 Antimicrobial activity of AgNPs/CMC composite

As observed in Figure 3, AgNPs/CMC composite caused significant ( $p < 0.05$ ) 60% and 67% *C. albicans* growth inhibition at 4.8 µg/mL and 9.6 µg/mL respectively, 27% to 66% *E. faecalis* growth inhibition at concentrations ranging from 1.2 µg/mL to 9.6 µg/mL, and 50% to 96% *F. nucleatum* growth inhibition from 0.6 µg/mL to 9.6 µg/mL respectively. Furthermore, 5.25% (w/v) NaOCl caused 90%, 85%, and 92% *C. albicans*, *E. faecalis*, and *F. nucleatum* growth inhibition, respectively (data not shown).

### 3.4 AgNPs/CMC composite anti-biofilm activity

Formation of a heterogeneous biofilm was evaluated by crystal violet and Congo red staining for identification of microorganisms by optical and epifluorescence microscopy respectively. Figure 4b shows structures of *C. albicans* in combination with *E. faecalis* and *F. nucleatum* (Fig. 4a). Anti-biofilm effect was observed at 4.8 µg/mL AgNPs/CMC composite and 5.25% (w/v) NaOCl, after crystal violet staining. A significant ( $p < 0.05$ ) biofilm reduction of 53% and 55% was observed respectively, as compared with the PBS control (Fig. 4b).

### 3.5 Anti-biofilm activity of AgNPs/CMC composite on dentine discs

The effect of 4.8 µg/mL AgNPs/CMC composite, 5.25% (w/v) NaOCl (positive control), and PBS (negative control) on a heterogeneous biofilm produced on dentine discs was evaluated. Results showed significant ( $p < 0.05$ ) biofilm reduction by AgNPs/CMC composite (58% reduction) and NaOCl (56% reduction), as compared with PBS control (Fig. 5).

## 4. Discussion

Root canal treatment is a process to debride and disinfect teeth root canals, however, it may present future complications from biofilm-producing microbial infections (Neelakantan *et al.* 2017), mainly caused by *C. albicans*, *E. faecalis*, and *F. nucleatum*, which represent the microbial species with the highest prevalence upon treatment failure (Borzini, Condò, De Dominicis, Casaglia, & Cerroni, 2016; Pereira, Rodrigues, Furtado, Gueiros, Pereira, & Avila-Campos, 2017; Ashraf, Samiee, Eslami, & Hosseini, 2007). Direct elimination of these microorganisms from the root canal depends on instrumentation mechanical action and anti-microbial effect of irrigating solutions, among which, NaOCl is the most demanded, because of its biocidal effect and proteolytic characteristics, effectiveness, and availability (Faras, Abo-Alhassan, Sadeq, & Burezq, 2016). An irrigating agent must be biocompatible and of low cytotoxicity due to its direct interaction with periodontal tissue during treatment, being NaOCl highly toxic to periapical tissue (Simeone, Valletta, Giudice, Di Lorenzo, & Iandolo, 2015; Uğur, Akpınar, Hepokur, &

Erdönmez, 2018). Therefore, it is important to search for new root canal irrigation substances with biocidal effect, without cytotoxic effects (Mollashahi, Saberi, & Karkehabadi, 2016).

Physical and chemical methods are commonly applied to synthesize nanoparticles. However, they are expensive and use high energy or unsafe solvents, but most importantly, they produce and release large amounts of toxic byproducts that contaminate the environment. Therefore, inexpensive and nontoxic methods are necessary for metal nanoparticle synthesis (Huq, 2020). We showed that AgNPs/CMC composite (Fig. 1) significantly inhibited oral pathogens growth alone, in heterogeneous biofilms, and in dentine disc biofilms. In this regard, it was reported that a silver nano-coating application on dentine was effective to prevent *Streptococcus mutans*-mediated biofilm formation and inhibit bacterial growth in liquid medium, which were measured by turbidity, proportion of live and dead cells, and lactate production, as compared with chlorhexidine and AgNO<sub>3</sub>, suggesting this preparation might be useful to protect medical device surfaces (Besinis, De Peralta, & Handy, 2014). We have extended the use of AgNPs/CMC composite by testing its effects on the most prevalent biofilm-producing microorganisms *C. albicans*, *E. faecalis*, and *F. nucleatum* in unsuccessful root canal disinfection (Borzini, Condò, De Dominicis, Casaglia, & Cerroni, 2016; Pereira, Rodrigues, Furtado, Gueiros, Pereira, & Avila-Campos, 2017; Ashraf, Samiee, Eslami, & Hosseini, 2007), as compared with NaOCl (Figs. 2-5). In this regard, Cinteza *et al.* (Cinteza, Scamoroscenco, Voicu, Nistor, Nitu, Trica, Maria-Luiza Jecu, & Petcu, 2018) reported significant antibacterial activity of chitosan-stabilized AgNPs against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *C. albicans*, resulting in MICs ranging between 0.78 µg/mL and 3.13 µg/mL. In this regard, we observed AgNPs/CMS composite MICs against *C. albicans*, *E. faecalis*, and *F. nucleatum* were in the range of 0.6 µg/mL to 4.8 µg/mL, which agreed with Cinteza *et al.* results (Cinteza, Scamoroscenco, Voicu, Nistor, Nitu, Trica, Maria-Luiza Jecu, & Petcu, 2018). However, the use of chitosan was reported to significantly reduce cell attachment efficiency, and proliferation and viability of normal human dental pulp cells (Alhomrany, R., Zhang, C., & Chou, L. (2019).

Moreover, Pedroza-Toscano *et al.* (Pedroza-Toscano, López-Cuenca, Rabelero-Velasco, Moreno-Medrano, Mendizabal-Ruiz, & Salazar-Peña, 2017) showed antimicrobial

activity of 5 µg/disk of AgNPs/CMC against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by the agar disk diffusion method, whereas Alahmadi *et al.* (Alahmadi, Betts, Heinze, Kelly, Koschella, & Wadhawan, 2018) reported antibacterial activity of silver/cellulose nanocomposites (20 µg/ml) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Furthermore, Prema *et al.* (Prema, Thangapandiyam, & Immanuel, 2017) showed antimicrobial activity of AgNPs/CMC against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio vulnificus* at MICs between 40 µg/mL and 60 µg/mL. The use of other CMC-AgNPs materials, such as AgNPs-loaded CMC (from bamboo-extracted cellulose) hydrogel, was reported to possess antimicrobial activity against *Escherichia coli* (MIC = 1.32 µg/mL) and *Bacillus subtilis* (MIC = 4.3 µg/mL) (Kumar, Gaur, Kumar, & Park, 2019). Park *et al.* (Park, Kuang, Lim, Gwon, & Nho, 2012) also showed the antibacterial effect AgNPs/CMC hydrogel (MIC = 50 µg/mL), prepared by a gamma ray irradiation, against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

In addition, nanocomposites with graphene oxide, polydimethyl siloxane or titanium dioxide plus silver and other metal nanoparticles are known to possess antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative bacteria, and fungal cells, as well as maintaining cytocompatibility with eukaryotic cells (Jang, Choi, Tanaka, & Choi, 2020; Sankar, Murthy, Das, Sathya, Nankar, Venugopalan, & Doble, 2017; Alavi & Karimi, 2018), obtaining similar results as those with CMC used in the present study (Figs. 2-5).

Our composite did not affect HGF viability at experimental concentrations that inhibited microbial growth or reduced biofilms area (Fig. 2). This is important as conventional disinfectants such as NaOCl, hydrogen peroxide, and chlorine dioxide have been shown to induce high cytotoxicity, as found in this study, where we observed significant ( $p < 0.05$ ) toxicity against HGF (Fig. 2). These compounds are absorbed into the bloodstream through the oral mucosa or from the teeth apical foramen, causing normal tissue toxicity (Myers, Shoaf, Dirksen, Pashley, Whitford, & Reynolds, 1978; Bartelstone, 1951; Someya, Higo, Ohno, Tsutsui, & Tsutsui, 2008; Nishikiori, Nomura, Sawajiri, Masuki, Hirata, & Okazaki, 2008), DNA damage (Uğur, Akpınar, Hepokur, & Erdönmez, 2018), and even cancer (Ohnishi, Murata, & Kawanishi, 2008).

Furthermore, AgNPs potential mechanisms of microbial action involve free metal ion-mediated toxicity (Feng, Wu, Chen, Cui, Kim, & Kim 2000; Jung, Koo, Kim, Shin, Kim, & Park 2008) and oxidative stress (Foldbjerg, Olesen, Hougaard, Dang, Hoffmann, & Autrup 2009). The use of alternative disinfectants such as the anti-bacterial agent AgNPs represents an opportunity to overcome bacterial resistance and short-term efficacy limitations of others such as chlorhexidine (Pallasch, 2003; Ribeiro, Kellermann, Santos, Bessa, & Nascimento 2007; Besinis, De Peralta, & Handy, 2014).

We observed that when dentine discs were exposed to a heterogeneous biofilm, it was partially removed by NaOCl based irrigation solution, showing comparable results from those by AgNPs/CMC composite (Fig. 5). Other studies have reported that AgNPs were effective to inhibit planktonic cells, but they were less active to remove biofilms after 5 minutes of treatment, as compared with chlorhexidine or NaOCl (Rodrigues, De Andrade, De Vasconcelos, Midena, Pereira, Kuga, Duarte, & Bernardini, 2018; Afkhami, Pourhashemi, Sadegh, Salehi, & Fard 2015). This is related to our results, since biofilm reduction in dentine discs was observed and our nanocomposite showed similar results than those of NaOCl (58% and 56% reduction, respectively), after 30 s (approximate exposure time of an antimicrobial agent during a dental procedure (Miller & Baumgartner, 2010)) of treatment.

## 5. Conclusion

The results of the present study demonstrated the potential use of alternative irrigation agents such as AgNPs/CMC composites in endodontic treatment. They did not cause significant toxic effects on HGF at concentrations  $< 15 \mu\text{g/mL}$ , possessed broad-spectrum biocidal effect, and prevented or eliminated the formation of heterogeneous biofilms affecting dental human health.

### CRedit Author Statement

Elizabeth Madla-Cruz: Methodology, Investigation, Writing Original Draft. Myriam De la Garza-Ramos: Conceptualization, Methodology, Supervision, Funding Acquisition. César I. Romo-Saenz: Conceptualization, Methodology, Supervision, Validation, Resources. Patricia Tamez-Guerra: Validation, Formal Analysis, Original Draft. Marco A. Garza-Navarro: Resources, Methodology. Victor Urrutia-Baca: Validation, Formal Analysis, Original Draft. María A. Martínez-Rodríguez: Methodology, Validation. Ricardo Gomez-

Flores: Conceptualization, Methodology, Supervision, Validation, Resources, Writing-Review & Editing, Funding Acquisition.

#### **Funding source**

This study was supported by grants from Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica-UANL 2019 (grant number CN-933) to RGF and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) through Programa de Estímulos a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2018 (grant numbers 252534 and 251475) to MGR.

#### **Declaration of Competing Interest**

The authors declare no conflict of interest.

#### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Laboratorio de Inmunología y Virología of Facultad de Ciencias Biológicas (FCB-UANL) and Unidad de Odontología Integral y Especialidades of Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (UOIE-CIDICS) at Universidad Autónoma de Nuevo León for supporting the development of this study.

## References

- Afkhami, F., Pourhashemi, S.J., Sadegh, M., Salehi, Y., & Fard, M.J.K. (2015). Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Dentistry*, 43(12), 1573-1579. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.08.012>.
- Alahmadi, N.S., Betts, J.W., Heinze, T., Kelly, S.M., Koschella, A., & Wadhawan, J.D. (2018). Synthesis and antimicrobial effects of highly dispersed, cellulose-stabilized silver/cellulose nanocomposites. *RSC advances*, 8(7), 3646-3656. <https://doi.org/10.1039/C7RA12280B>.
- Alavi, M. & Karimi, N. (2018). Antiplanktonic, antibiofilm, antiswarming motility and anti-quorum sensing activities of green synthesized Ag-TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>-Ag, Ag-Cu and Cu-Ag nanocomposites against multi-drug-resistant bacteria. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup3), S399-S413. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1496923>.
- Alhomrany, R., Zhang, C., & Chou, L. (2019). Cytotoxic effect of chitosan nanoparticles on normal human dental pulp cells. *Nanoscience and Nanotechnology*, 3(1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.18063/nn.v3i1.940>.
- Allaker, R.P. & Yuan, Z. (2019). Nanoparticles and the control of oral biofilms. In K. Subramani, & W. Ahmed (Eds.), *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry* (pp. 243-275). Waltham: Elsevier.
- Ashraf, H., Samiee, M., Eslami, G., & Hosseini, M.R.G. (2007). Presence of *Candida albicans* in root canal system of teeth requiring endodontic retreatment with and without periapical lesions. *Iranian Endodontic Journal*, 2(1), 24-28. <https://europepmc.org/article/pmc/pmc3863409#free-full-text>.
- Bapat, R.A., Chaubal, T.V., Joshi, C.P., Bapat, P.R., Choudhury, H., Pandey, M., Gorain, B., & Kesharwani, P. (2018). An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. *Materials Science and Engineering: C*, 91, 881-898. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.069>.

- Bartelstone, H.J. (1951). Radioiodine penetration through intact enamel with uptake by bloodstream and thyroid gland. *Journal of Dental Research*, 30, 728-733.  
<https://doi.org/10.1177/00220345510300051601>.
- Besinis, A., De Peralta, T., & Handy, R.D. (2014). The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on *Streptococcus mutans* using a suite of bioassays. *Nanotoxicology*, 8(1), 1-16. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.742935>.
- Borzini, L., Condò, R., De Dominicis, P., Casaglia, A., & Cerroni, L. (2016). Root canal irrigation: Chemical agents and plant extracts against *Enterococcus faecalis*. *Open Dentistry Journal*, 10, 692-703. <https://doi.org/10.2174/1874210601610010692>.
- Cavallaro, G., Lazzara, G., Milioto, S., Parisi, F., Evtugyn, V., Rozhina, E., & Fakhrullin, R. (2018). Nanohydrogel formation within the halloysite lumen for triggered and sustained release. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(9), 8265–8273.  
<https://doi.org/10.1021/acsami.7b19361>.
- Cinteza, L.O., Scomorosenco, C., Voicu, S.N., Nistor, C.L., Nitu, S.G., Trica, B., Maria-Luiza J., & Petcu, C. (2018). Chitosan-stabilized Ag nanoparticles with superior biocompatibility and their synergistic antibacterial effect in mixtures with essential oils. *Nanomaterials*, 8(10), 826-842. <https://doi.org/10.3390/nano8100826>.
- Diaz, P.I., Zilm, P.S., & Rogers, A.H. (2002). *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. *Microbiology*, 148(2), 467-472. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-467>.
- Estrela, C., Estrela, C.R., Barbin, E.L., Spano, J.C., Marchesan, M.A., & Pecora, J.D. (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dental Journal*, 13, 113-117. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402002000200007>.
- Fabricius, L., Dahlén, G., Sundqvist, G., Happonen, R.P., & Möller, A.J.R. (2006). Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *European Journal of Oral Sciences*, 114(4): 278-285. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2006.00380.x>.
- Faras, F., Abo-Alhassan, F., Sadeq, A., & Burezq, H. (2016). Complication of improper management of sodium hypochlorite accident during root canal treatment. *Journal of*



- International Society of Preventive and Community Dentistry*, 6(5), 493-496.  
<https://dx.doi.org/10.4103%2F2231-0762.192939>.
- Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N., & Kim, J.O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52, 662-668.  
[https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20001215\)52:4%3C662::AID-JBM10%3E3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001215)52:4%3C662::AID-JBM10%3E3.0.CO;2-3).
- Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D.A., Hoffmann, H.J., & Autrup, H. (2009). PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicology Letters*, 190, 156-162.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.009>.
- Garza-Navarro, M.A., Aguirre-Rosales, J.A., Llanas-Vázquez, E.E., Moreno-Cortez, I.E., Torres-Castro, A., & González-González, V.A. (2013). Totally ecofriendly synthesis of silver nanoparticles from aqueous dissolutions of polysaccharides. *International Journal of Polymers Science*, 2013, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2013/436021>.
- Gursoy, U. K., Pöllänen, M., Könönen, E., & Uitto, V.J. (2010). Biofilm formation enhances the oxygen tolerance and invasiveness of *Fusobacterium nucleatum* in an oral mucosa culture model. *Journal of Periodontology*, 81(7), 1084-1091.  
<https://doi.org/10.1902/jop.2010.090664>.
- Huq, M. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Pseudoduganella eburnea* MAHUQ-39 and their antimicrobial mechanisms investigation against drug resistant human pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1510-1524.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21041510>.
- Jang, J., Choi, Y., Tanaka, M., & Choi, J. (2020). Development of silver/graphene oxide nanocomposites for antibacterial and antibiofilm applications. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 83, 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.11.011>.
- Jung, W.K., Koo, H.C., Kim, K.W., Shin, S., Kim, S.H., & Park, Y.H. (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2171-2178.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.02001-07>.
- Kishen, A. (2010). Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. *Endodontic Topics*, 22, 99-123. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00284.x>.

- Kumar, H., Gaur, A., Kumar, S., & Park, J.W. (2019). Development of silver nanoparticles-loaded CMC hydrogel using bamboo as a raw material for special medical applications. *Chemical Papers*, 73(4), 953-964. <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0650-0>.
- Lee, J.S., Lee, S.U., Che, C.Y., & Lee, J.E. (2015). Comparison of cytotoxicity and wound healing effect of carboxymethylcellulose and hyaluronic acid on human corneal epithelial cells. *International Journal of Ophthalmology*, 8(2), 215-221.
- Lin, L.M., Skribner, J.E., & Gaengler, P. (1992). Factors associated with endodontic treatment failures. *Journal of Endodontics*, 18(12): 625-627. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)81335-X](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81335-X).
- Lucas, V.S. (1993). Association of psychotropic drugs, prevalence of denture-related stomatitis and oral candidosis. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 21, 313-316. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1993.tb00782.x>.
- Martínez-Rodríguez, M.A., Madla-Cruz, E., Urrutia-Baca, V.H., De la Garza-Ramos, M.A., González-González, V.A., & Garza-Navarro, M.A. (2020). Influence of polysaccharides' molecular structure on the antibacterial activity and cytotoxicity of green synthesized composites based on silver nanoparticles and carboxymethyl-cellulose. *Nanomaterials*, 10, 1164-1182. <https://doi.org/10.3390/nano10061164>.
- Miller, T A., & Baumgartner, J C. (2010). Comparison of the antimicrobial efficacy of irrigation using the EndoVac to endodontic needle delivery. *Journal of Endodontics*, 36(3), 509-511. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.10.008>.
- Mirzaei-Mohkam, A., Garavand, F., Dehnad, D., Keramat, J., & Nasirpour, A. (2019). Optimisation, antioxidant attributes, stability and release behaviour of carboxymethyl cellulose films incorporated with nanoencapsulated vitamin E. *Progress in Organic Coatings*, 134, 333-341. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.05.026>.
- Mollashahi, N.F., Saberi, E., & Karkehabadi, H. (2016). Evaluation of cytotoxic effects of various endodontic irrigation solutions on the survival of stem cell of human apical papilla. *Iranian Endodontic Journal*, 11(4), 293-297. <https://dx.doi.org/10.22037/2Fiej.2016.7>.
- Moulton, M.C., Braydich-Stolle, L.K., Nadagouda, M.N., Kunzelman, S., Hussain, S.M., & Varma, R.S. (2010). Synthesis, characterization and biocompatibility of "green" synthesized silver nanoparticles using tea polyphenols. *Nanoscale*, 2(5), 763-770. <https://doi.org/10.1039/C0NR00046A>.

- Myers, D.R., Shoaf, H.K., Dirksen, T.R., Pashley, D.H., Whitford, G.M., & Reynolds, K.E. (1978). Distribution of <sup>14</sup>C-formaldehyde after pulpotomy with formocresol. *Journal of the American Dental Association* 96, 805-813.  
<https://doi.org/10.14219/jada.archive.1978.0187>.
- Nair, P.R., Sjögren, U., Krey, G., Kahnberg, K.E., & Sundqvist, G. (1990). Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *Journal of Endodontics*, 16(12): 580-588. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(07\)80201-9](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(07)80201-9).
- Neelakantan, P., Romero, M., Vera, J., Daood, U., Khan, A.U., Yan, A., & Cheung, G.S.P. (2017). Biofilms in endodontics—current status and future directions. *International Journal of Molecular Science*, 18(8), 1748-1769. <https://doi.org/10.3390/ijms18081748>.
- Nishikiori, R., Nomura, Y., Sawajiri, M., Masuki, K., Hirata, I., & Okazaki, M. (2008). Influence of chlorine dioxide on cell death and cell cycle of human gingival fibroblasts. *Journal of Dentistry*, 36(12), 993-998. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.08.006>.
- Ohnishi, S., Murata, M., & Kawanishi, S. (2002). DNA damage induced by hypochlorite and hypobromite with reference to inflammation-associated carcinogenesis. *Cancer Letters*, 178, 37-42. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00812-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00812-6).
- Pallasch, T.J. (2003). Antibiotic resistance. *Dental Clinic*, 47(4), 623-639.  
[https://doi.org/10.1016/S0011-8532\(03\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0011-8532(03)00039-9).
- Park, J.S., Kuang, J., Lim, Y.M., Gwon, H.J., & Nho, Y.C. (2012). Characterization of silver nanoparticle in the carboxymethyl cellulose hydrogel prepared by a gamma ray irradiation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12(1), 743-747.  
<https://doi.org/10.1166/jnn.2012.5366>.
- Pedroza-Toscano, M. A., López-Cuenca, S., Rabelero-Velasco, M., Moreno-Medrano, E. D., Mendizabal-Ruiz, A. P., & Salazar-Peña, R. (2017). Silver nanoparticles obtained by semicontinuous chemical reduction using carboxymethyl cellulose as a stabilizing agent and its antibacterial capacity. *Journal of Nanomaterials*, 2017, 1-7.  
<https://doi.org/10.1155/2017/1390180>.
- Pereira, R.S., Rodrigues, V.A.A., Furtado, W., Gueiros, S., Pereira, G.S., & Avila-Campos, M.J. (2017). Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth

- with endodontic failure. *Anaerobe*, 48, 12-18.  
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.06.016>.
- Prema, P., Thangapandiyam, S., & Immanuel, G. (2017). CMC stabilized nano silver synthesis, characterization and its antibacterial and synergistic effect with broad spectrum antibiotics. *Carbohydrate polymers*, 158, 141-148.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.083>.
- Ribeiro, A.R., Kellermann, A., Santos, L.R.D., Bessa, M.C., & Nascimento, V.P.D. (2007). *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella enteritidis* isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 296-299. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200021>.
- Ricucci, D., Siqueira, J.F. Jr. (2010). Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *Journal of Endodontics*, 36, 1277-1288. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.04.007>.
- Rodrigues, C.T., De Andrade, F.B., De Vasconcelos, L.R.S.M., Midena, R.Z., Pereira, T.C., Kuga, M.C., Duarte, M.A.H., & Bernardineli, N. (2018). Antibacterial properties of silver nanoparticles as a root canal irrigant against *Enterococcus faecalis* biofilm and infected dentinal tubules. *International Endodontic Journal*, 51(8), 901-911.  
<https://doi.org/10.1111/iej.12904>.
- Ruan, C., Zhang, Y., Wang, J., Sun, Y., Gao, X., Xiong, G., & Liang, J. (2019). Preparation and antioxidant activity of sodium alginate and carboxymethyl cellulose edible films with epigallocatechin gallate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 1038-1044. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.143>.
- Sankar, G.G., Murthy, P.S., Das, A., Sathya, S., Nankar, R., Venugopalan, V.P., & Doble, M. (2017). Polydimethyl siloxane based nanocomposites with antibiofilm properties for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 105(5), 1075-1082. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33650>.
- Shahid-ul-Islam, Butola, B.S., & Kumar, A. (2020). Green chemistry based in-situ synthesis of silver nanoparticles for multifunctional finishing of chitosan polysaccharide modified cellulosic textile substrate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 1135-1145. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.202>.

- Shrestha, A., & Kishen, A. (2016). Antibacterial nanoparticles in endodontics: a review. *Journal of Endodontics*, 42(10), 1417-1426. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.05.021>.
- Signat, B., Roques, C., Poulet, P., & Duffaut, D. (2011). Role of *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Current Issues in Molecular Biology*, 13(2), 25-36. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.730.8890&rep=rep1&type=pdf>.
- Silva, V.L., Diniz, C.G., Cara, D.C., Santos, S.G., Nicoli, J.R., Carvalho, M.A.R., & Farias, L.M. (2005). Enhanced pathogenicity of *Fusobacterium nucleatum* adapted to oxidative stress. *Microbial Pathogenesis*, 39(4), 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2005.07.002>.
- Simeone, M., Valletta, A., Giudice, A., Di Lorenzo, P., & Iandolo, A. (2015). The activation of irrigation solutions in endodontics: a perfected technique. *Giornale italiano di Endodonzia*, 29(2), 65-69. <https://doi.org/10.32067/gie.2015.29.02.05>.
- Siqueira, J.F. Jr., & Lopes, H.P. (1999). Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *International Endodontic Journal*, 32(5), 361-369. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1999.00275.x>.
- Siqueira, J.F. Jr., Rôças, I.N., & Ricucci, D. (2010). Biofilms in endodontic infection. *Endodontic Topics*, 22, 33-49. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00279.x>.
- Siqueira, J.F. Jr. (2002). Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology* 94(3), 281-293. <https://doi.org/10.1067/moe.2002.126163>.
- Siqueira, J.F. Jr. (2001). Aetiology of root canal treatment failure: why well- treated teeth can fail. *International Endodontic Journal*, 34(1), 1-10. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2001.00396.x>.
- Someya, H., Higo, Y., Ohno, M., Tsutsui, T.W., & Tsutsui T. (2008). Clastogenic activity of seven endodontic medications used in dental practice in human dental pulp cells. *Mutation Research*, 650, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.002>.
- Stathopoulou, M.E.K., Banti, C.N., Kourkoumelis, N., Hatzidimitriou, A.G., Kalamponias, A.G., & Hadjikakou, S.K. (2018). Silver complex of salicylic acid and its hydrogel-cream in wound healing chemotherapy. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 181, 41-55. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.01.004>.

- Staudte, H., Güntsch, A., Völpel, A., & Sigusch, B.W. (2010). Vitamin C attenuates the cytotoxic effects of *Porphyromonas gingivalis* on human gingival fibroblasts. *Archives of Oral Biology*, 55(1), 40-45. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.11.009>.
- Stuart, C.H., Schwartz, S.A., Beeson, T.J., & Owatz, C.B. (2006). *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics*, 32(2), 93-98. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.049>.
- Stowe, T.J., Sedgley, C.M., Stowe, B., & Fenno, J.C. (2004). The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*, 30(6), 429-431. <https://doi.org/10.1097/00004770-200406000-00013>.
- Sundqvist, G., Figdor, D., Persson, S., & Sjögren, U. (1998). Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology*, 85, 86-93. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90404-8](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90404-8).
- Uğur, A.Z., Akpınar, K.E., Hepokur, C., & Erdönmez, D. (2018). Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. *Brazilian Oral Research*, 32, 1-8. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0119>.
- Wilson, M., & Harvey, W. (1989). Prevention of bacterial adhesion to denture acrylic. *Journal of Dentistry*, 17(4), 166-170.
- Wu, D., Fan, W., Kishen, A., Gutmann, J.L., & Fan, B. (2014). Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of Endodontics*, 40(2), 285-290. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.08.022>.
- Ye, J., Ma, D., Qin, W., & Liu, Y. (2018). Physical and Antibacterial Properties of Sodium Alginate—Sodium Carboxymethylcellulose Films Containing *Lactococcus lactis*. *Molecules*, 23(10), 2645-2659.

Figure legends

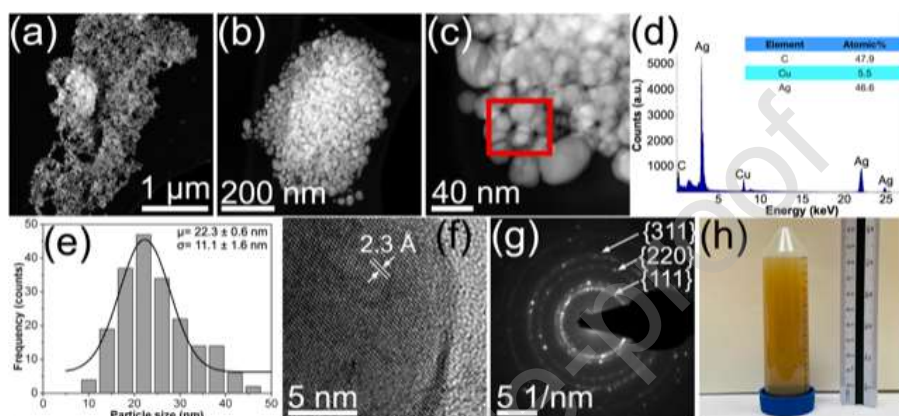


Figure 1. TEM characterization of CMC-AgNPs composite: (a) HAADF-STEM image taken at low magnification (20 kX), (b) HAADF-STEM image showing a composite aggregate at 80 kX, (c) HAADF-STEM image displaying nanoparticles' morphology at 320 kX, (d) XEDS spectrum obtained from the zone indicated in (c) (inset shows elemental analysis of this zone), (e) particle size distribution obtained for the sample, (f) BF image taken from a selected nanoparticle at 1.25 MX, and (g) SAED pattern recorded from a selected zone of this sample. The image in (h) shows a photograph of the CMC-AgNPs composite.

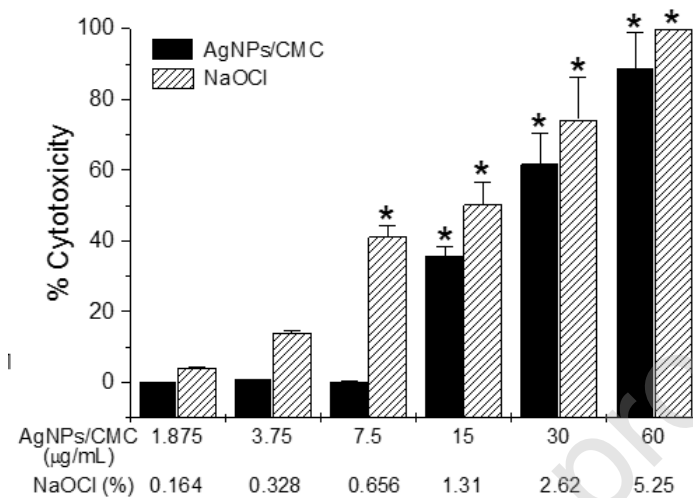


Figure 2. Effect of AgNPs/CMC on HGF viability. The cytotoxic effect of AgNPs/CMC on HGF was evaluated by the MTT reduction assay, as explained in the text. Triton X and DMEM positive and negative controls caused 100% and 0% cytotoxicity, respectively. Data represent mean  $\pm$  SD of triplicate determinations per treatment, from three independent experiments. \* $P < 0.05$ , as compared with untreated control.



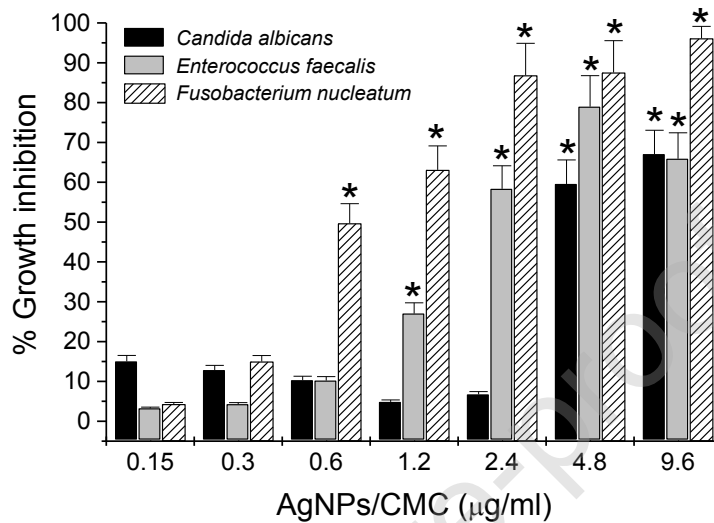


Figure 3. Antimicrobial activity of AgNPs/CMC on planktonic oral pathogens. *C. albicans*, *E. faecalis*, and *F. nucleatum* cultures were independently incubated in the presence or absence of AgNPs/CMC, NaOCl (positive control), and culture medium (negative control) for 24 h at 37 °C, and microbial growth measured at 600 nm, as detailed in the text. Data represent mean  $\pm$  SD of triplicate determinations per treatment, from three independent experiments. \* $P < 0.05$ , as compared with untreated control.

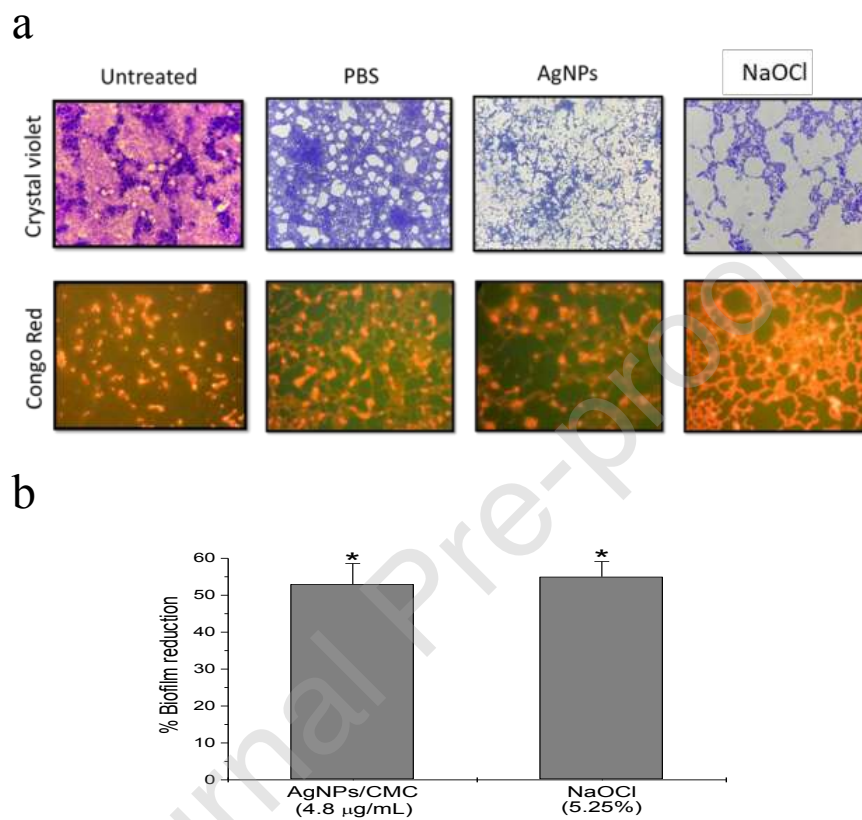


Figure 4. Heterogeneous biofilm production by oral pathogens. *C. albicans*, *E. faecalis*, and *F. nucleatum* combined cultures were incubated for 7 days at 37 °C to form heterogeneous biofilms, after which they were treated with 4.8  $\mu\text{g/mL}$  AgNPs/CMC, 5.25% (w/v) NaOCl (positive control), and the negative controls PBS and culture medium. Biofilms were then

stained with crystal violet and Congo red and evaluated under optical and epifluorescence microscopy, respectively, at 40 X magnification (a), as explained in the text. Percentages of biofilm reduction by AgNPs/CMC and NaOCl.

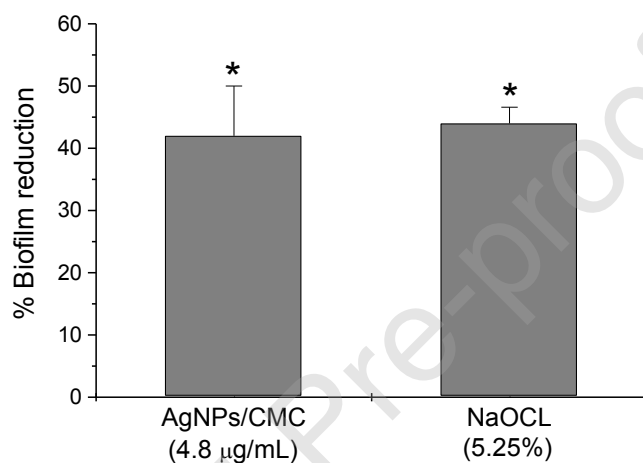


Figure 5. Effect of AgNPs/CMC on dentine disc biofilms. Heterogeneous microbial biofilms were generated on dentine discs by incubating  $1 \times 10^6$  cells/mL *C. albicans*, *E.*

*faecalis*, and *F. nucleatum* cultures at 37 °C for 7 days and treated with AgNPs/CMC, NaOCl (positive control), and PBS (negative control), after which anti-biofilm activity was evaluated under a stereoscope, as detailed in the text.

Journal Pre-proof