

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**EFFECTO ANTIMICROBIANO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA
CONTRA EL MICROORGANISMO *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

POR

MAYRA BEATRIZ AGUILA RUIZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN ODONTOLOGÍA AVANZADA**

DICIEMBRE 2014

**EFECTO ANTIMICROBIANO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA ANTE
EL MICROORGANISMO ENTEROCOCCUS FAECALIS**

Comité de Tesis

Director de Tesis

Secretario

Vocal

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Rosa Isela Sánchez Nájera Asesor de mi tesis. Así como a la Dra. Osvelia Rodríguez Luis Codirectora de tesis, gracias por su apoyo, sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Departamento de Biología Molecular y al Departamento de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología de la UANL por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

A mi familia por el apoyo moral y económico que siempre me ha brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

Una dedicatoria especial a mi hermana Martha Paula por ser mi ejemplo de vida y lucha ante las adversidades.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. HIPÓTESIS.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4. ANTECEDENTES.....	16
4.1 Enterococcus Faecalis.....	16
4.2 Nanotecnología.....	18
4.3 Nanopartículas de plata.....	19
4.4 Propiedad antimicrobiana de las nanopartículas de plata.....	20
5. MÉTODOS.....	22
5.1 Universo de estudio.....	22
5.1.1 Población de la cual se obtendrá la muestra.....	22
5.2 Tamaño de la muestra.....	22
5.3 Forma de asignación de los casos a los grupos de estudio.....	23
5.4 Características del grupo control y del (los) grupo(s) experimental(es).....	23
5.4.1 Grupo control.....	23
5.4.2 Grupos experimentales.....	23
5.5 Criterios de selección.....	23
5.5.1 Criterios de Inclusión.....	23
5.5.2 Criterios de exclusión.....	24
5.5.3 Criterios de eliminación.....	24
5.6 Procedimiento.....	24
6. RESULTADOS.....	29

7. DISCUSIÓN.....	37
8. CONCLUSIONES.....	39
9. LITERATURA CITADA.....	40
10.RESUMEN BIOGRÁFICO.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Tabla 1. Promedio de absorbancias iniciales y pruebas t, según la concentración, con el control positivo	29
2. Tabla 2. Promedio de absorbancias a las 24 horas y pruebas t, según la concentración, con el control positivo.....	31
3. Tabla 3. Promedio de absorbancias a las 48 horas y pruebas t, según la concentración, con el control positivo	32
4. Tabla 4. Promedio de absorbancias a las 72 horas y pruebas t, según la concentración, con el control positivo.....	34
5. Tabla 5. Porcentajes de efectividad para E. Faecalis (200 µl), según la concentración y el momento de la evaluación.....	35
6. Tabla 6. Porcentajes de efectividad para E. Faecalis (100 µl), según la concentración y el momento de la evaluación.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Campana de flujo laminar.....	25
Figura 2. Preparación de las diluciones.....	25
Figura 2. Inoculación de las AgNP en los pocillos de la microplaca.....	26
Figura 3. Inoculación del <i>Enterococcus faecalis</i> en los pocillos de la microplaca...	26
Figura 4. Microplaca lista para lectura inicial.....	26
Figura 5. Lector de Microplacas de Absorbancia Biotek.....	27

NOMENCLATURA

AgNP. Nanopartículas de plata

E. faecalis. *Enterococcus faecalis*

NaCl. Cloruro de sodio

NaClO. Hipoclorito de sodio

NP. Nanopartículas de plata

pH. Potencial de hidrógeno.

MH. Mueller Hinton

CMI. Concentración Mínima Inhibitoria

RESUMEN

La prevalencia nosocomial de los enterococcus ha ido en aumento; esto debido al aumento de la resistencia a los antimicrobianos, la adquisición de factores de virulencia y la capacidad del enterococcus para formar biofilms. En cavidad oral, el *Enterococcus faecalis* es uno de los microorganismos más resistentes y dominantes en el ecosistema microbiano de las lesiones periapicales asintomáticas y persistentes; éste también se detecta con frecuencia en la microbiota oral de pacientes con periodontitis lo que sugiere que la infección periodontal puede favorecer la colonización en la cavidad oral por parte de esta especie.

Debido al brote de las enfermedades infecciosas causado por diferentes bacterias patógenas y el desarrollo de resistencia a los antibióticos de las compañías farmacéuticas, los investigadores se encuentran en busca de nuevos agentes antibacterianos.

Las nanopartículas de plata (AgNP) poseen excelentes propiedades antimicrobianas por lo que son los nanomateriales más utilizados diseñados para su uso en una amplia gama de aplicaciones de consumo y médicos; debido a lo anterior, se realiza en la literatura una búsqueda para determinar el éxito de este eficaz antimicrobiano ante la presencia del microorganismo *Enterococcus faecalis*. El objetivo de este estudio es evaluar la resistencia del *Enterococcus faecalis* y su capacidad de replicación después de ser expuesto a las nanopartículas de plata. Materiales y métodos: se utilizaron cultivos de *Enterococcus faecalis* con aplicación en solución de nanopartículas de plata en tamaño de 10 nm diluidos en 0.02 mg/ml de agua o buffer utilizado la Técnica de Microdilución en miniplacas de 96 pocillos; se utilizó como control positivo el hipoclorito de sodio y como control negativo agua destilada. Los resultados fueron obtenidos a través del lector de microplacas para absorbancia a una lectura de 600 nm para determinar si el microorganismo era sensible, intermedio o resistente según la concentración de las diluciones. Resultados: Las AgNP mostraron ser efectivas como antimicrobiano. El porcentaje más alto de efectividad se mostró a las 48 horas de la incubación. Solo el control positivo de hipoclorito de sodio al 5% mostró efectividad. Discusión: los

resultados mostrados concordaron con la literatura que se encuentra actualmente respecto al efecto antimicrobiano de las AgNP. Conclusiones: Las nanopartículas de plata han demostrado ser efectivos antimicrobianos en contra de microorganismos resistentes lo que podría marcar un nuevo uso de éstas como auxiliar en el tratamiento de patologías orales.

Palabras clave: Nanopartículas de plata, *E. faecalis*, antimicrobiano

ABSTRACT

The prevalence of nosocomial enterococcus has been increasing; this due to the increased resistance to antimicrobials, acquisition of virulence factors and the ability of enterococcus to form biofilms. In oral cavity, *Enterococcus faecalis* is one of the strongest and dominant microbe in the microbial ecosystem of asymptomatic and persistent periapical lesions microorganisms. This is also frequently detected in oral flora of periodontitis patients suggesting that periodontal infection may promote oral cavity colonization by the species.

Due to the outbreak of infectious diseases caused by various pathogenic bacteria and the development of antibiotic resistance from pharmaceutical companies, researchers are looking for new antibacterial agents.

Silver Nanoparticles (AgNP) have excellent antimicrobial properties, which are most commonly used nanomaterials for use in a wide range of consumer and medical applications; due to this, it has been performed a search in the literature to determine the success of this highly effective antimicrobial against *Enterococcus faecalis*. The objective of this study is to evaluate the resistance of *Enterococcus faecalis* and their replication capacity after exposure to the silver nanoparticles diluted to different concentrations. Materials and methods: cultures of *Enterococcus faecalis* with the application of silver nanoparticles solution in size of 10 nm diluted in 0.2 mg / ml in water or buffer and a culture to which applied a sodium hypochlorite at 5% and 2.25% as positive controls. The method used to find MIC was Microdilution test. Results: Silver nanoparticles were effective antimicrobials against *E. faecalis* in all their dilutions. Higher percent of effectiveness was showed at 48 hours after their incubation. Sodium hypochlorite was effective at 5% only. Discussion: several of our findings agree with different authors that have studied antimicrobial effects of AgNP. Conclusions: Silver nanoparticles had showed effective antimicrobial properties which may result in the use of new agents for the treatment of several oral pathologies.

Key words: Silver nanoparticles, *E. faecalis*, antimicrobial.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la creciente incidencia de la presencia del *Enterococcus faecalis* en la cavidad oral como por ejemplo en los casos de una periodontitis apical o en el fracaso de un tratamiento radicular, además de los factores de supervivencia que lo condicionan, demanda la utilización de nuevos agentes antimicrobianos que no generen resistencia y posean una buena propiedad antibacteriana.

Se ha constatado la capacidad de este microorganismo de sobrevivir en un entorno en el que hay nutrientes disponibles escasos y en el que la comensalía con otras bacterias es mínima.

En el escenario actual, los materiales a nanoescala han surgido como nuevos agentes antimicrobianos debido a su alta relación de superficie a volumen y sus propiedades únicas físicas y químicas.

La nanotecnología, que se refiere a las estructuras en la escala nanométrica (1-100 nm), se considera como una tecnología de corriente vital en el siglo XXI sobre la base de su potencial económico y científico.

Las nanopartículas de plata (AgNP) representan un importante avance en la nanomedicina basado en la lucha contra las bacterias polirresistentes.

Debido a su excelente capacidad antimicrobiana, las nanopartículas de plata podrían ser consideradas como antimicrobiano para la eliminación del *E. faecalis*, ya que se ha probado, actúan exitosamente en la eliminación de diferentes tipos de bacterias según la literatura.

De esta forma, las nanopartículas de plata, podrían ser utilizadas en odontología para diversas aplicaciones en patologías orales donde se presente el microorganismo, debido a que se ha constatado que es poco probable que un microorganismo genere algún tipo de resistencia ante la plata.

La plata, por su parte, tomando ventaja de sus propiedades bactericidas, diversas preparaciones que contienen plata se han utilizado para el tratamiento de heridas crónicas. En los siglos XVII y XVIII, el nitrato de plata ya se utilizaba para el tratamiento de úlceras, y en 1960, se introdujo para el tratamiento de las quemaduras.

Después de una disminución en el uso de sales de plata consiguientes a la introducción de los antibióticos en 1940, en años más recientes, ha habido un interés renovado en la plata, debido a la mayor resistencia de las bacterias a los antibióticos.

Es entonces cuando según la literatura y requerimientos en odontología actuales, es válido hacernos la pregunta: ¿Cuál es la efectividad de las nanopartículas de plata en su propiedad antimicrobiana en la eliminación del microorganismo *Enterococcus faecalis*?

Determinando que es un efectivo antimicrobiano, las AgNP podrán ser utilizadas en odontología en varias presentaciones y para diferentes tratamientos.

Es por eso que en el presente trabajo se busca obtener a bajas concentraciones la efectividad antimicrobiana de las AgNP contra el microorganismo *E. faecalis*. Sirviendo de parteaguas para una posible elaboración de tratamientos de patologías orales causadas por este microorganismo.

2. HIPÓTESIS

H_1 : Las nanopartículas de plata poseen un efecto antimicrobiano contra el *E. faecalis*.

H_0 : Las nanopartículas de plata no poseen un efecto antimicrobiano contra el *E. faecalis*.

3. OBJETIVO

3.1 General.

Evaluar la resistencia del *Enterococcus faecalis* y su capacidad de replicación después de ser expuesto a las nanopartículas de plata diluidas a diferentes concentraciones.

3.2 Objetivos específicos:

- 3.2.1 Medición de la absorbancia de las AgNP en su lectura inicial, a las 24, 48 y 72 horas.
- 3.2.2 Determinación del porcentaje de efectividad de las AgNP como antibacteriano a las 24, 48 y 72 horas.
- 3.2.3 Determinar la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de plata contra el *Enterococcus faecalis*.

4. ANTECEDENTES

4.1 *Enterococcus Faecalis*

Son bacterias Gram-positivas, anaerobias facultativas que se caracterizan por su capacidad para crecer en concentraciones de 6,5% de NaCl a un pH alto y para hidrolizar la bilis esculina y L-pirrolidono-B-naftilamida (PYR). (1). Además, los enterococos son cocos que a menudo se producen en pares (diplococos) o en cadenas cortas. (Balaei Gajan E. 2013).

La prevalencia nosocomial de los enterococcus ha ido en aumento; esto debido al aumento de la resistencia a los antimicrobianos, la adquisición de factores de virulencia y la capacidad del enterococcus para formar biofilms. (Sava, IG. 2010)

Además, es bien sabido que el *Enterococcus* es capaz de adquirir genes de resistencia, incluida la resistencia de alto nivel (HLR) a los antibióticos aminoglucósidos. (Silva J. 2013)

Además, entre las infecciones nosocomiales más comunes producidos por estos organismos son infecciones del tracto urinario (asociada con la instrumentación y resistencia a los antimicrobianos), seguido de infecciones intra-abdominales y pélvicas. También causan infecciones de heridas quirúrgicas, bacteriemia, sepsis neonatal y meningitis, raras veces. Una razón importante por estos organismos sobreviven en medio hospitalario es la resistencia intrínseca a varios antibióticos de uso común y, quizás lo más importante, su capacidad para adquirir resistencia a todos los antibióticos disponibles en la actualidad, ya sea por mutación o por la recepción de material genético extraño mediante la transferencia de plásmidos y transposones. (Sood S. 2008)

Fármacos como las ampicilinas, tetraciclinas, vancomicina, gentamicina, entre otros, han sido utilizados para combatir la presencia del *E. faecalis* en diferentes enfermedades. (Barge S. 2013; Seo Y. 2013)

Investigaciones recientes han demostrado la aparición de clones similares de *E. faecalis* resistentes a la vancomicina y a la gentamicina obtenidos a partir de animales y de pacientes humanos. La vigilancia continua de la resistencia a los antimicrobianos en enterococos de los seres humanos y los animales es esencial para seguir las tendencias y detectar la aparición de resistencia. (Hammerum AM. 2010)

En cavidad oral, el *Enterococcus faecalis* es un microorganismo grampositivo anaerobio facultativo de los más resistentes y dominantes en el ecosistema microbiano de las lesiones periapicales asintomáticas y persistentes en los casos de retratamiento endodental. (Stuart CH, 2006; Luddin N, 2013)

Es ecológicamente tolerante y tiene la capacidad para sobrevivir a las duras condiciones, ya que presenta considerables polimorfismos genéticos y se puede unir a la dentina y resistir la acción de hidróxido de calcio, especialmente cuando no se mantiene un pH alto. (Luddin N. 2013)

La prevalencia de las infecciones por *E. faecalis* varía de 24% a 77%. Este hallazgo puede explicarse por varios factores de supervivencia y la virulencia poseídos por *E. faecalis*, incluyendo su capacidad para competir con otros microorganismos, invadir los túbulos dentinarios, y resistir a la privación nutricional. La prevalencia de *E. faecalis* en los conductos radiculares se asocia con su presencia en saliva. (Wang QQ, 2012)

El fenotipo y genotipo del *E. faecalis* encontrado en pruebas de factores de virulencia ha sido el mismo en saliva como en el conducto radicular. (Zhu X, W. 2010). Sin embargo, su presencia es más común en los conductos radiculares de los dientes con periodontitis apical que en la saliva. (Wang QQ, 2012)

Se ha reportado que el *E. faecalis* de lesiones endodentales aislado y expuesto a la tetraciclina, muestra un alto nivel de resistencia a ésta, un antibiótico que tiene uso en el tratamiento local de infecciones dentales. Esto abre un debate muy necesario sobre el papel y la eficacia de este antibiótico para las infecciones orales. Además, estas cepas han mostrado poseer genes que podrían contribuir a la patogenicidad de la cavidad pulpar. (Lins RX. 2013)

En relación con la enfermedad periodontal, investigaciones recientes han demostrado que el *E. faecalis* se detecta con frecuencia en la microbiota oral de pacientes con periodontitis lo que sugiere que la infección periodontal puede favorecer la colonización en la cavidad oral por parte de esta especie. (Souto R. 2008)

El *Enterococcus faecalis* puede contribuir a la degradación periodontal en sitios subgingivales muy infectados, particularmente en los pacientes que responden pobremente a las formas mecánicas de la terapia periodontal. (Rams TE, 2013)

Fármacos eficaces utilizados en el tratamiento de enfermedad periodontal como la tetraciclina, eritromicina, clindamicina, y metronidazol, han revelado pobre actividad in vitro contra *E. faecalis* subgingivales clínicos humanos aislados, y probablemente serían agentes terapéuticos ineficaces contra estas especies en las bolsas periodontales. (Rams TE, 2013)

4.2 Nanotecnología

La Nanotecnología se refiere en general a un campo de la ciencia y la tecnología aplicada, cuyo hilo conductor es el control de la materia a escala atómica y molecular. (Oza Goldie, 2012)

La nanotecnología, que se refiere a las estructuras en la escala nanométrica (1-100 nm), se considera como una tecnología de corriente vital en el siglo XXI sobre la base de su potencial económico y científico. (René García Contreras, 2011)

Los recientes avances en la nanotecnología han revolucionado todos los aspectos de la vida, desde la ingeniería a los cosméticos. Una de las zonas más dinámicas de desarrollo es el de la nanomedicina. (Thorley AJ. 2013)

Una serie de productos basados en nanopartículas para el diagnóstico y la terapéutica han sido aprobados para aplicaciones clínicas, e incluso varios más están actualmente en ensayos clínicos. Sin embargo, el horizonte de la nanomedicina está aún en fase de rápida expansión.

Una tendencia importante es el desarrollo de nanopartículas que son capaces de lograr varios objetivos, tales como formación de imágenes y la terapia o la realización de una sola función avanzada a través de la incorporación de múltiples unidades multifuncionales. La aparición de estas nanopartículas se debe a los avances en las técnicas de nanofabricación. (Bao G, 2013)

Al controlar el tamaño, forma, superficie, y el estado de aglomeración de las nanopartículas, perfiles específicos de liberación de iones se pueden desarrollar para cualquier aplicación dada. Actualmente, las NP se forman en una amplia variedad de diferentes formas y tamaños incluyendo esferas, placas, y los cables. (Sweet MJ, 2012)

Debido a su tamaño (de menos de 100 nm), las nanopartículas muestran propiedades que son diferentes a la del mismo material de tamaño mayor. (Thorley AJ. 2013) Las nanopartículas (NP) tienen una mayor relación de superficie a volumen (masa por unidad) que las partículas a no nanoescala del mismo material, y por lo tanto son más reactivas. (René García Contreras, 2011)

4.3 Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata han surgido como nuevos agentes antimicrobianos debido a su alta relación de superficie a volumen y sus propiedades únicas físicas y químicas. (Oza Goldie, 2012).

Numerosos métodos para la síntesis de nanopartículas de plata se han reportado incluyendo reducción química, descomposición térmica, ablación por láser, y la síntesis de sonoquímica. Entre éstos, el método de reducción química y el método de ablación por láser son las rutas sintéticas más comúnmente empleadas. (Ravindran A, 2013)

Típicamente, las nanopartículas de plata se sintetizan mediante la reducción de una sal de plata con un agente reductor como borohidruro de sodio en presencia de un estabilizador coloidal. Los estabilizadores coloidales más comunes utilizados son el alcohol de polivinilo, polivinilpirrolidona), albúmina de suero bovino (BSA), citrato, y celulosa. Recientes métodos incluyen el uso de α -D-glucosa como un azúcar reductor y

un almidón como el estabilizador para desarrollar implantación de iones de nanopartículas de plata utilizado para crear nanopartículas de plata. (Moddy VV, 2010)

Debido a sus propiedades antimicrobianas, las nanopartículas de plata (AgNP) son los nanomateriales más utilizados diseñados para su uso en una amplia gama de aplicaciones de consumo y médicos. (Behra R, 2013)

4.4 Propiedad antimicrobiana de las nanopartículas de plata

Debido al brote de las enfermedades infecciosas causado por diferentes bacterias patógenas y el desarrollo de resistencia a los antibióticos de las compañías farmacéuticas, los investigadores se encuentran en busca de nuevos agentes antibacterianos. (Oza Goldie, 2012)

A través de los años, compuestos de plata y nanopartículas han exhibido actividad antibacteriana que ha resultado en el uso generalizado de las nanopartículas de plata (AgNP) en ropa de cama, máquinas de lavado, purificación de agua, pasta de dientes, de champú y enjuague, botellas de enfermería, los desodorantes, los filtros de y utensilios de cocina y los humidificadores. (René García Contreras, 2011)

Las nanopartículas de plata (AgNPs) representan un importante avance en la nanomedicina basado en la lucha contra las bacterias poliresistentes. (Fayaz AM, 2010)

La propiedad antimicrobiana de la plata está relacionada con la cantidad de plata y la tasa de la plata liberada. (Oza Goldie, 2012)

Las nanopartículas de plata tienen un gran efecto bactericida sobre una gama de varios microorganismos, y se sabe muy bien que su efecto bactericida depende del tamaño y la forma de la partícula. (L.F. Espinosa-Cristóbal, 2013)

Las nanopartículas de plata muestran eficiente propiedad antimicrobiana en comparación con otras sales debido a su extremadamente gran área de superficie, lo que proporciona un mejor contacto con los microorganismos.

El efecto de los iones de plata en las bacterias puede ser observado por los cambios estructurales y morfológicos. Se sugiere que cuando las moléculas de ADN están en un estado relajado, la replicación de ADN puede llevarse a cabo eficazmente. Pero cuando el ADN está en forma condensada, pierde su capacidad de replicación, por tanto, cuando los iones de plata penetran en el interior de la célula bacteriana de la molécula de ADN, ésta se adopta la forma condensada y pierde su capacidad de replicación lo que conduce a la muerte celular. (Oza Goldie, 2012)

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1 Universo de estudio.

5.1.1 Población de la cual se obtendrá la muestra.

Cultivos de *Enterococcus faecalis* con aplicación en solución de nanopartículas de plata en tamaño de 10 nm y diluídas a diferentes concentraciones, comparando con un agente antiséptico como el NaClO y un placebo que es el agua destilada.

5.1.2 Características de la cepa.

Cepas de *E. faecalis* ATCC 29212 fueron activadas en la cámara de anaerobiosis y sembradas en caldo Mueller-Hinton. Se incubaron bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C por 24 horas.

5.2 Tamaño de la muestra.

La muestra estará integrada por cultivos de bacterias que cumplieron con los requisitos de inclusión, exclusión y eliminación considerados en el estudio.

Los datos serán capturados en una base de datos en el programa IBM Statistics 19 con el que se realizarán tablas de frecuencia de dos variables dentro de las cuales será considerada la variable principal (Concentración mínima inhibitoria) de cada uno de los grupos experimentales (soluciones de nanopartículas de plata de 10 nm diluidos en 0.2 mg/ml de agua o buffer) y del grupo control (hipoclorito de sodio) y el resto de las variables establecidas en el instrumento de observación. Para algunos procedimientos estadísticos de clasificación y manejo de base de datos será empleado el programa Microsoft Excel 2010.

El presente proyecto contará con un modelo estadístico de presentación de datos que consistirá en la elaboración y descripción de tablas de frecuencias y porcentajes para las

variables cualitativas y de intervalo, así como un modelo descriptivo de medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas, además del uso de gráficos para las tablas mayormente relacionadas con el análisis de los datos, posterior a este diseño se realizará una descripción detallada de los resultados.

5.3 Forma de asignación de los casos a los grupos de estudio:

Aleatoria

5.4 Características del grupo control y del (los) grupo(s) experimental(es)

5.4.1 Grupo control: cultivo de bacterias de *E. faecalis* en caldo Mueller- Hinton donde se observe el crecimiento o proliferación de las colonias sin la aplicación de la solución de nanopartículas de plata y utilizando solo agua destilada (control negativo). Cultivo de bacterias de *E. faecalis* en caldo Mueller- Hinton donde se observe la proliferación o inhibición del crecimiento de las colonias sin la aplicación de la solución de nanopartículas de plata y utilizando hipoclorito de sodio en dos diferentes concentraciones: 5.25% y 2.25% (control positivo).

5.4.2 Grupos experimentales: cultivo de bacterias de *E. faecalis* en caldo Mueller-Hinton donde se aplique la solución de nanopartículas de plata de tamaño de 10 nm según el método de Microdilución en miniplacas de 96 pocillos para observar la disminución o el cese del crecimiento bacteriano.

Se elaborarán diferentes diluciones de la solución de nanopartículas de plata para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

5.5 Criterios de selección:

5.5.1 Criterios de Inclusión.

Cepa que sea viable y prolifere en un medio de cultivo caldo Mueller-Hinton.

5.5.2 Criterios de exclusión.

Aquella cepa bacteriana que se encuentre caducada.

5.5.3 Criterios de eliminación.

Aquella cepa no viable o que no muestre crecimiento en el medio de cultivo caldo Mueller- Hinton. Aquella cepa que se contamine en el proceso de investigación.

5.6 Procedimiento

Se realizó la activación de la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 en la cámara de anaerobiosis y sembradas en caldo Mueller-Hinton. Se incubó bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C por 24 horas.

Una vez obtenida la solución de nanopartículas de plata de tamaño de 10 nm a una concentración de 0.02 mg/ml (Laboratorios Sigma-Aldrich) se realizaron diluciones de ésta concentración para determinar la CMI. Partiendo del tubo inicial con contenido de 1 ml de las nanopartículas en estado puro, se obtuvieron 9 diluciones.

Las diluciones fueron las siguientes:

- a) Tubo 1: 750 µl de AgNP y 250 µl de agua destilada estéril.
- b) Tubo 2: 500 µl de AgNP y 500 µl de agua destilada estéril.
- c) Tubo 3: 250 µl de AgNP y 750 µl de agua destilada estéril.
- d) Tubo 4: 125 µl de AgNP y 825 µl de agua destilada estéril.
- e) Tubo 5: 62.5 µl de AgNP y 937.5 µl de agua destilada estéril.
- f) Tubo 6: 31.5 µl de AgNP y 968.5 µl de agua destilada estéril.
- g) Tubo 7: 15.2 µl de AgNP 985 µl de agua destilada estéril.
- h) Tubo 8: 7.5 µl de AgNP y 992.5 µl de agua destilada estéril.
- i) Tubo 9: 3.5 µl de AgNP y 996.5 µl de agua destilada estéril.



Figura 1. Campana de flujo laminar.



Figura 2. Preparación de las diluciones.

Una vez realizadas las diluciones se llevó a cabo la Técnica de Microdilución en caldo, en condiciones de anaerobiosis en campana de flujo laminar.

Técnica de Microdilución en Caldo.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de cada una de las diluciones y de los controles positivos y negativos, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por medio de la técnica de microdilución en caldo. La CMI es la mínima concentración de un antibiótico que inhibe el desarrollo visible de un microorganismo.

Se usaron placas de cultivo de 96 pozos (Costar 3595, Corning Inc.) aprovechando para ensayar hasta 9 diluciones de las columnas 1-9 de las filas A-C. Las columnas 10, 11 y 12 de las filas A, B y C se utilizaron para los controles.

Se prepararon tubos con caldo MH y una suspensión calibrada de microorganismos de *E. faecalis* usando el 0.5 de la Escala Mc Farland que corresponde al 1.5×10^8 UFC/mL. Dicha escala relaciona la turbidez de unos patrones de sulfato bórico (mezcla de cloruro de bario al 1% y ácido sulfúrico al 1%) con el número de bacterias presentes en una muestra.

Se colocó el microorganismo con medio en los poros de las columnas A, B y C de las filas 1-12 en una concentración de 100 μ l.

En la fila 1 se colocó el tubo 1 en las filas A, B y C. En la fila 2 se colocó el tubo 2 en las filas A, B y C. y así sucesivamente hasta la columna 9 en las filas A, B y C.

En la columna 10, filas A, B y C se colocó como control positivo el NaClO al 5.25% y en la columna 11, filas A, B y C se colocó como control positivo también NaClO al 2%. Como control negativo se utilizó la columna 12, filas A, B y C colocando agua destilada estéril (200 μ l) y 100 μ l de microorganismo con medio.

Todas las diluciones de nanopartículas en las columnas descritas anteriormente se colocaron en una concentración de 200 μ l.



Figura 2. Inoculación de las AgNP en los pocillos de la microplaca



Figura 3. Inoculación del *Enterococcus faecalis* en los pocillos de la microplaca.

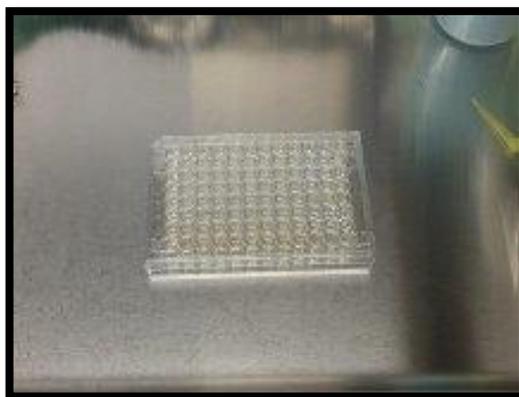


Figura 4. Microplaca antes de lectura inicial.

En las filas G y H de las columnas 1-9 se colocaron 100 μl de medio MH, 100 μl de las diluciones del mismo modo descrito anteriormente para las filas A, B y C; y 100 μl del microorganismo *E. faecalis*.

Como blancos se utilizaron la fila D en las columnas 10, 11 y 12 con 100 μl del microorganismo *E. faecalis*; la fila E en las columnas 10, 11 y 12 con 100 μl de medio MH; la fila F en las columnas 10, 11 y 12 con 200 μl de AgNP; la fila G en las columnas 10, 11 y 12 con 100 μl de medio y 200 μl de AgNP.

Se realizó la primera lectura sin incubar la bacteria con el lector de microplacas para absorbancia Biotek.



Figura 5. Lector de microplacas para absorbancia Biotek.

Posteriormente, las placas se incubaron a 37°C por 24h (anaeróticamente, de acuerdo a los requerimientos de la cepa). Al término del período de incubación, las placas de 96 pozos fueron examinados a simple vista con la finalidad de observar la turbidez que nos indica que el crecimiento bacteriano ha sido inhibido por la concentración de las AgNP contenidas en el medio. La segunda lectura se realizó a las 24 horas, la tercera lectura se realizó a las 48 horas y, la cuarta y última lectura a las 72 horas.

En una segunda microplaca se llevó a cabo el control de los blancos de cada una de las diluciones y grupos controles (positivo y negativo). También se inocularon AgNP puras (200 μl y 100 μl) con medio y microorganismo para estudiar su efectividad en este estado.

La distribución fue llevada a cabo de la siguiente manera:

En la fila A, columnas 1, 2 y 3 se colocaron 200 μ l de AgNP en estado puro y 100 μ l de bacteria *E. faecalis* con medio.

En las filas A, B y C, columnas 4-12 se colocaron los blancos de las diluciones: 200 μ l de cada una de las diluciones y 100 μ l de medio sin bacteria.

En la fila C, columna 1,2 y 3 se colocaron 200 μ l del blanco del control positivo (hipoclorito de sodio al 5%) y 100 μ l de medio sin bacteria. De mismo modo, en la fila D, columna 1,2 y 3 se colocaron 200 μ l del blanco del control positivo (hipoclorito de sodio al 2.25%) y 100 μ l de medio sin bacteria.

En las filas D, E y F, columnas de la 4-12 se colocaron como blanco 100 μ l de las diluciones de AgNP y 100 μ l de medio sin bacteria.

En la fila E, columna 1, 2 y 3 se colocaron como blanco 100 μ l de AgNP y 100 μ l de medio sin bacteria.

En la fila G, columnas 1, 2 y 3 se colocaron 100 μ l de AgNP puras, 100 μ l de medio y 100 μ l de bacteria *E. faecalis*.

En la fila G, columnas 4, 5 y 6 se colocó el blanco de 200 μ l de agua destilada y 100 μ l de medio sin bacteria.

En la fila G columnas 7, 8 y 9 se colocó el blanco de 200 μ l de AgNP puras y 100 μ l de medio sin bacteria.

De igual manera se realizó la lectura de esta microplaca antes de incubar, a las 24, 48 y 72 horas.

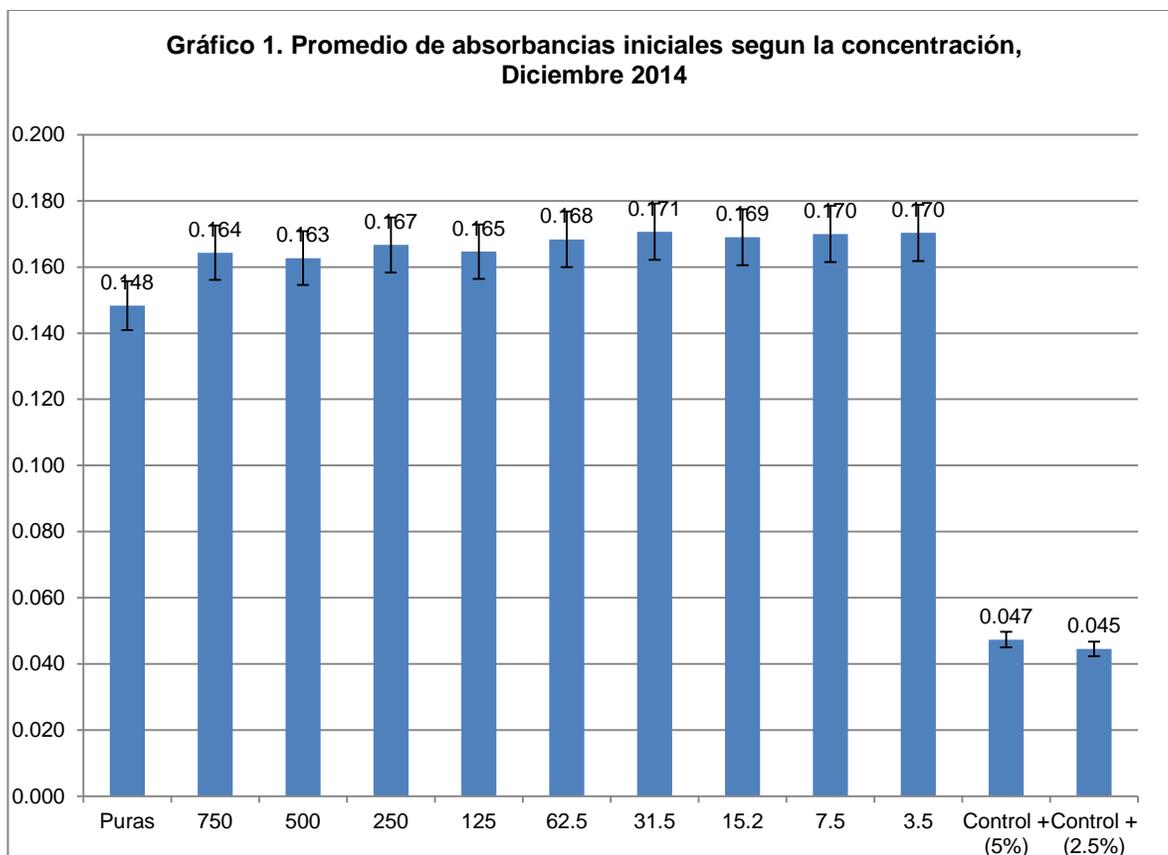
6. RESULTADOS

Los resultados que se muestran a continuación fueron obtenidos en base a la metodología descrita anteriormente.

Las tablas que se muestran representan los resultados obtenidos de la lectura inicial, antes de incubar el microorganismo; y a las 24, 48 y 72 horas después de incubar el microorganismo.

Tabla 1. Promedio de absorbancias iniciales y pruebas t, según la concentración, con el control positivo

Diluciones	E. Faecalis (200 µl)		Prueba t (Control +)		E. Faecalis (100 µl)		Prueba t (Control +)		S.S (200 µl)		Prueba t (Control +)	
	Media	D.E.	5%	2.50%	Media	D.E.	5%	2.50%	Media	D.E.	5%	2.50%
Puras	0.148	0.008	0.000	0.000	0.166	0.012	0.000	0.002	0.157	0.019	0.000	0.002
750	0.164	0.004	0.000	0.000	0.186	0.010	0.000	0.001	0.171	0.005	0.000	0.000
500	0.163	0.002	0.000	0.000	0.179	0.007	0.000	0.001	0.173	0.001	0.000	0.000
250	0.167	0.003	0.000	0.000	0.188	0.001	0.000	0.000	0.176	0.004	0.000	0.000
125	0.165	0.004	0.000	0.000	0.186	0.004	0.000	0.000	0.175	0.003	0.000	0.000
62.5	0.168	0.003	0.000	0.000	0.182	0.004	0.000	0.000	0.178	0.001	0.000	0.000
31.5	0.171	0.005	0.000	0.000	0.182	0.004	0.000	0.000	0.176	0.002	0.000	0.000
15.2	0.169	0.006	0.000	0.000	0.189	0.001	0.000	0.000	0.177	0.003	0.000	0.000
7.5	0.170	0.003	0.000	0.000	0.185	0.007	0.000	0.001	0.175	0.001	0.000	0.000
3.5	0.170	0.002	0.000	0.000	0.189	0.006	0.000	0.000	0.173	0.003	0.000	0.000



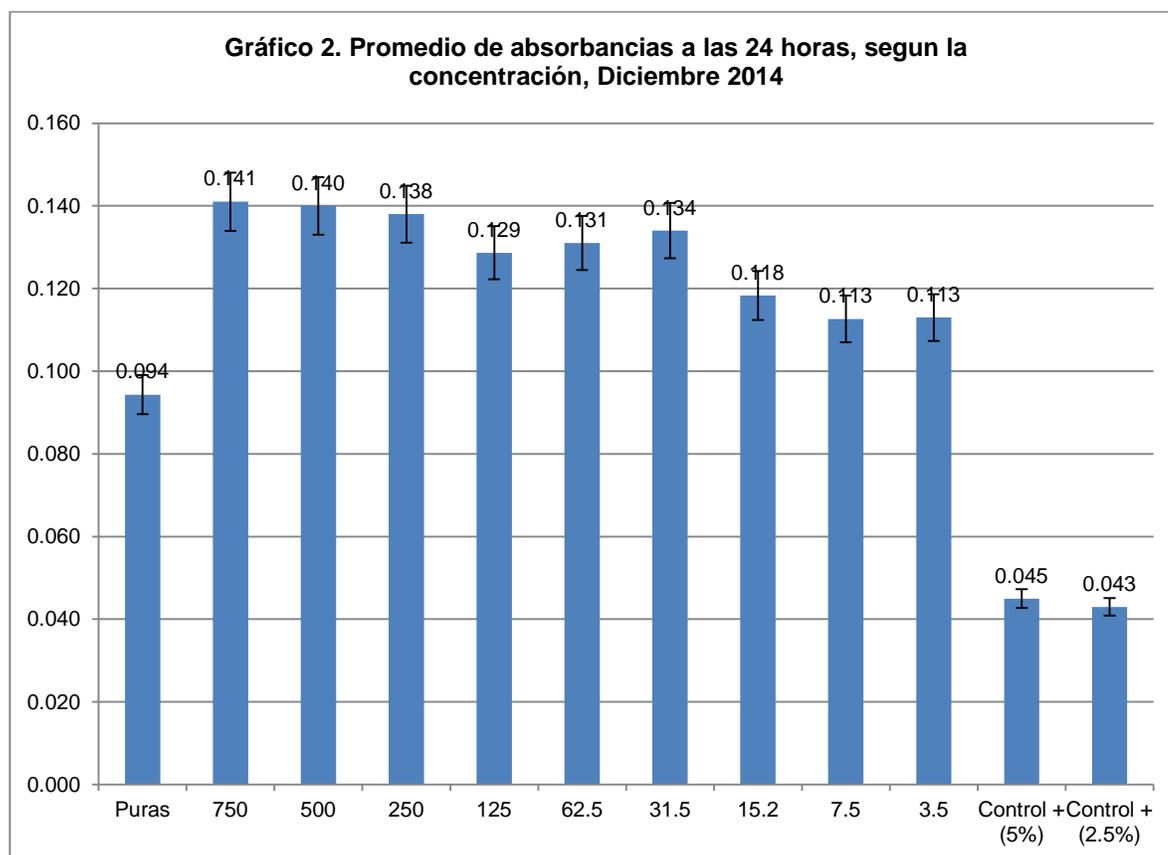
En la lectura inicial (0 horas), la media para *Enterococcus faecalis* en la concentración de 200 μ l, va desde 0.148 ± 0.008 en estado puro, hasta la última dilución de 3.5 μ l con una media de 0.170 ± 0.002 .

Para *Enterococcus faecalis* en concentración de 100 μ l, la media en estado puro va desde 0.166 ± 0.012 hasta 0.189 ± 0.006 de la última dilución de 3.5 μ l.

En todos los resultados mostrados el valor $P > 0.05$ por lo que no existe diferencia significativa entre el grupo control y el grupo experimental.

Tabla 2. Promedio de absorbancias a las 24 horas y pruebas t, según la concentración, con el control positivo

Diluciones	E. Faecalis (200 µl)				E. Faecalis (100 µl)				S.S (200 µl)		Prueba t (Control +)	
	Media	D.E.	5%	2.50%	Media	D.E.	5%	2.50%	Media	D.E.	5%	2.50%
Puras	0.094	0.003	0.000	0.000	0.096	0.001	0.000	0.000	0.126	0.021	0.001	0.007
750	0.141	0.009	0.000	0.000	0.203	0.004	0.000	0.000	0.126	0.005	0.000	0.000
500	0.140	0.008	0.000	0.000	0.207	0.036	0.002	0.012	0.135	0.014	0.000	0.002
250	0.138	0.010	0.000	0.001	0.207	0.025	0.001	0.006	0.121	0.011	0.000	0.001
125	0.129	0.018	0.001	0.004	0.204	0.007	0.000	0.001	0.118	0.003	0.000	0.000
62.5	0.131	0.005	0.000	0.000	0.220	0.016	0.000	0.002	0.121	0.010	0.000	0.001
31.5	0.134	0.012	0.000	0.001	0.211	0.006	0.000	0.000	0.121	0.003	0.000	0.000
15.2	0.118	0.006	0.000	0.000	0.243	0.057	0.003	0.019	0.140	0.019	0.001	0.003
7.5	0.113	0.005	0.000	0.000	0.241	0.076	0.008	0.034	0.126	0.009	0.000	0.001
3.5	0.113	0.006	0.000	0.000	0.238	0.073	0.008	0.032	0.109	0.008	0.000	0.001



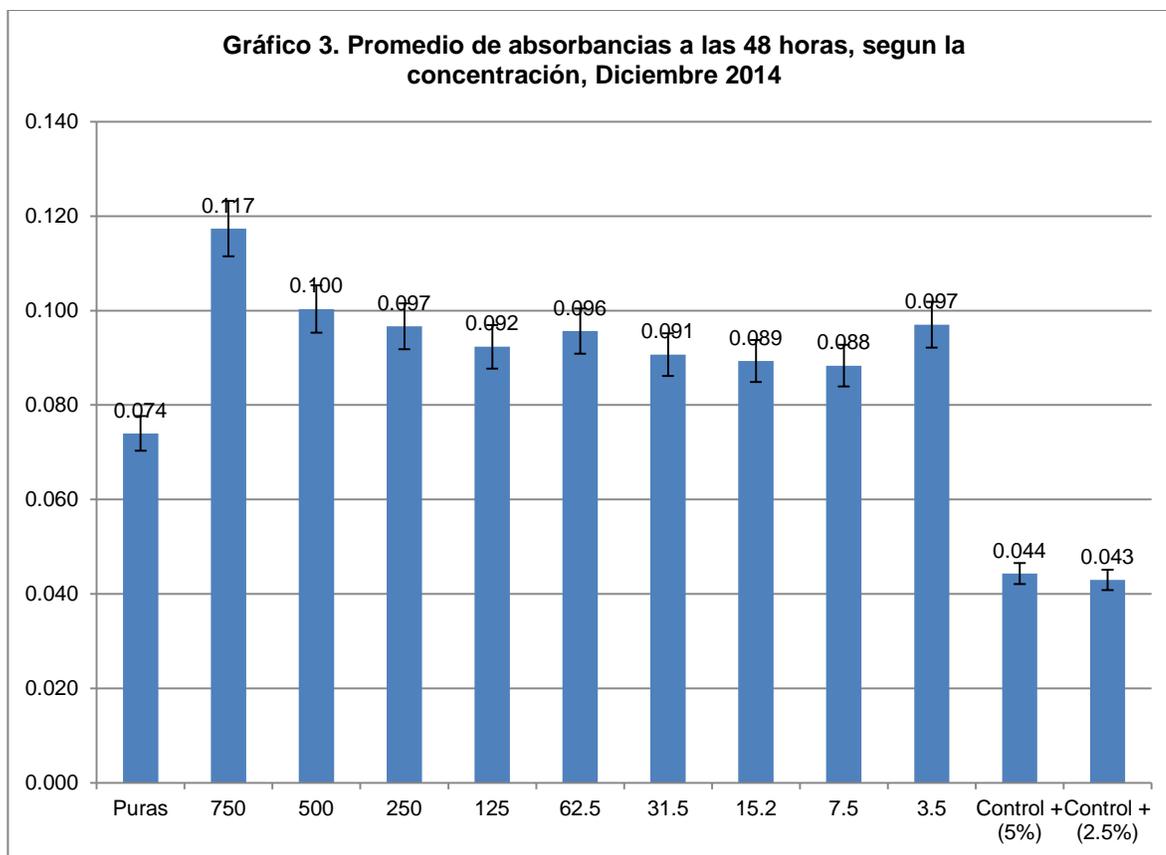
En la lectura a las 24 horas, la media para *Enterococcus faecalis* en la concentración de 200 μ l, va desde 0.094 ± 0.003 en estado puro, hasta la última dilución de 3.5 μ l con una media de 0.113 ± 0.006 . La mínima cantidad inhibitoria (MCI) se muestra en la dilución de 125 μ l con 0.129 ± 0.018 .

Para *Enterococcus faecalis* en concentración de 100 μ l, la media en estado puro va desde 0.096 ± 0.001 hasta 0.238 ± 0.073 de la última dilución de 3.5 μ l. La mínima cantidad inhibitoria (MCI) se muestra en la dilución de 125 μ l con 0.204 ± 0.007 .

En todos los resultados mostrados el valor $P > 0.05$ por lo que no existe diferencia significativa entre el grupo control y el grupo experimental.

Tabla 3. Promedio de absorbancias a las 48 horas y pruebas t, según la concentración, con el control positivo

Diluciones	E. Faecalis (200 ml)		Prueba t (Control +)		E. Faecalis (100 ml)		Prueba t (Control +)		S.S (200 ml)		Prueba t (Control +)	
	Media	D.E.	5%	2.50%	Media	D.E.	5%	2.50%	Media	D.E.	5%	2.50%
Puras	0.074	0.002	0.000	0.000	0.152	0.010	0.000	0.002	0.089	0.004	0.000	0.000
750	0.117	0.011	0.000	0.001	0.181	0.011	0.000	0.002	0.096	0.005	0.000	0.000
500	0.100	0.010	0.000	0.002	0.198	0.023	0.001	0.006	0.098	0.003	0.000	0.000
250	0.097	0.010	0.000	0.003	0.182	0.009	0.000	0.001	0.094	0.011	0.001	0.004
125	0.092	0.010	0.000	0.003	0.181	0.009	0.000	0.001	0.094	0.002	0.000	0.000
62.5	0.096	0.012	0.001	0.005	0.184	0.001	0.000	0.000	0.094	0.003	0.000	0.000
31.5	0.091	0.006	0.000	0.001	0.182	0.000	0.000	0.000	0.093	0.001	0.000	0.000
15.2	0.089	0.005	0.000	0.001	0.186	0.006	0.000	0.000	0.093	0.005	0.000	0.000
7.5	0.088	0.004	0.000	0.000	0.192	0.004	0.000	0.000	0.089	0.004	0.000	0.000
3.5	0.097	0.006	0.000	0.001	0.188	0.001	0.000	0.000	0.086	0.003	0.000	0.000



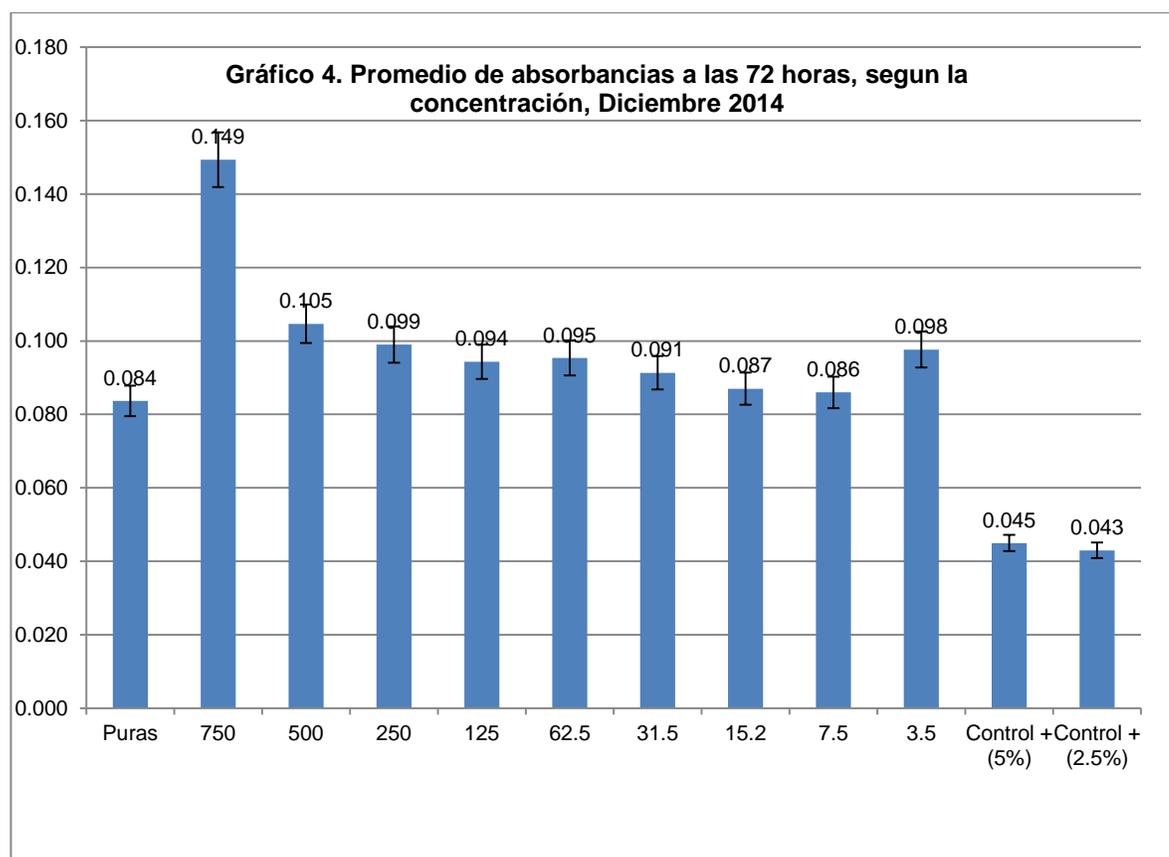
En la lectura a las 48 horas, la media para *Enterococcus faecalis* en la concentración de 200 μ l, va desde 0.074 ± 0.002 en estado puro, hasta la última dilución de 3.5 μ l con una media de 0.097 ± 0.006 . La mínima cantidad inhibitoria (MCI) se muestra en la dilución de 125 μ l con 0.092 ± 0.010 .

Para *Enterococcus faecalis* en concentración de 100 μ l, la media en estado puro va desde 0.152 ± 0.010 hasta 0.188 ± 0.001 de la última dilución de 3.5 μ l. La mínima cantidad inhibitoria (MCI) se muestra en la dilución de 125 μ l con 0.181 ± 0.009 .

En todos los resultados mostrados el valor $P > 0.05$ por lo que no existe diferencia significativa entre el grupo control y el grupo experimental.

Tabla 4. Promedio de absorbancias a las 72 horas y pruebas t, según la concentración, con el control positivo

Diluciones	E. Faecalis (200 ml)		Prueba t (Control +)		E. Faecalis (100 ml)		Prueba t (Control +)		S.S (200 ml)		Prueba t (Control +)	
	Media	D.E.	5%	2.50%	Media	D.E.	5%	2.50%	Media	D.E.	5%	2.50%
Puras	0.084	0.005	0.000	0.001	0.175	0.016	0.000	0.004	0.110	0.004	0.000	0.000
750	0.149	0.016	0.000	0.002	0.185	0.039	0.003	0.018	0.087	0.004	0.000	0.000
500	0.105	0.015	0.001	0.006	0.201	0.056	0.007	0.029	0.091	0.005	0.000	0.001
250	0.099	0.003	0.000	0.000	0.163	0.016	0.000	0.005	0.090	0.004	0.000	0.000
125	0.094	0.009	0.000	0.002	0.160	0.001	0.000	0.000	0.087	0.002	0.000	0.000
62.5	0.095	0.013	0.001	0.006	0.162	0.008	0.000	0.001	0.089	0.003	0.000	0.000
31.5	0.091	0.009	0.000	0.003	0.161	0.009	0.000	0.002	0.087	0.002	0.000	0.000
15.2	0.087	0.003	0.000	0.000	0.170	0.004	0.000	0.000	0.087	0.007	0.000	0.002
7.5	0.086	0.005	0.000	0.001	0.166	0.009	0.000	0.001	0.084	0.002	0.000	0.000
3.5	0.098	0.011	0.001	0.003	0.167	0.018	0.000	0.005	0.082	0.001	0.000	0.000



En la lectura a las 72 horas, la media para *Enterococcus faecalis* en la concentración de 200 μ l, va desde 0.084 ± 0.005 en estado puro, hasta la última dilución de 3.5 μ l con una media de 0.098 ± 0.011 . La mínima cantidad inhibitoria (MCI) se muestra en la dilución de 125 μ l con 0.094 ± 0.009 .

Para *Enterococcus faecalis* en concentración de 100 μ l, la media en estado puro va desde 0.175 ± 0.016 hasta 0.167 ± 0.018 de la última dilución de 3.5 μ l. La mínima cantidad inhibitoria (MCI) se muestra en la dilución de 125 μ l con 0.160 ± 0.001 .

En todos los resultados mostrados el valor $P > 0.05$ por lo que no existe diferencia significativa entre el grupo control y el grupo experimental.

Tabla 5. Porcentajes de efectividad para E. Faecalis, según la concentración y el momento de la evaluación. (200 μ l)

Diluciones	24 horas	48 horas	72 horas
Puras	53.82%	74.08%	64.45%
750	19.88%	40.05%	12.78%
500	19.76%	54.36%	50.58%
250	23.75%	58.01%	56.07%
125	30.85%	62.00%	60.28%
62.5	30.60%	59.56%	59.53%
31.5	30.13%	65.75%	65.20%
15.2	42.93%	67.51%	58.62%
7.5	46.61%	66.39%	68.29%
3.5	47.38%	60.60%	60.05%

Todas las concentraciones mostraron efectividad. Los mayores porcentajes se mostraron a las 48 horas en todas las diluciones y a las 72 horas se mostró un decrecimiento de todos los porcentajes.

El porcentaje más alto obtenido fue a las 48 horas de las nanopartículas en estado puro.

Tabla 6. Porcentajes de efectividad para *E. Faecalis*, según la concentración y el momento de la evaluación. (100 μ l)

Diluciones	24 horas	48 horas	72 horas
Puras	0%	8.67%	0%
750	0%	3.67%	1.10%
500	0%	0%	0%
250	0%	4.31%	17.96%
125	0%	3.63%	19%
62.5	0%	0%	15.33%
31.5	0%	0%	16.28%
15.2	0%	2.13%	13.50%
7.5	0%	0%	14.30%
3.5	0%	.70%	15.91%

A las 24 horas, ninguna de las diluciones de nanopartículas, ni aún en su estado puro, mostraron efectividad alguna antes al microorganismo *E. faecalis*.

A las 48 horas, el porcentaje de efectividad aumentó para la mayoría de las diluciones a excepción de 500 μ l, 62.5 μ l y 31.5 μ l. El valor más alto para las 48 horas fue en estado puro con un 8.67% de efectividad, mas éste no se mantuvo hasta las 72 horas y decreció hasta 0%.

A las 72 horas, el porcentaje de efectividad aumentó para la mayoría de las diluciones, a excepción del estado puro y la dilución de 500 μ l, que mostraron un 0% de efectividad. El porcentaje más alto registrado fue para la dilución de 125 μ l de 19%.

7. DISCUSIÓN

Svensäter G. et al (2004) afirmó que las características fisiológicas de ciertos microorganismos residentes puede dar protección a las bacterias o la resistencia contra las influencias exógenas nocivas, en particular agentes antimicrobianos.

Sava (2010) argumenta que la prevalencia nosocomial de los enterococcus ha incrementado; esto debido al aumento de la resistencia a los antimicrobianos, la adquisición de factores de virulencia y la capacidad del enterococcus para formar biofilms.

Los microorganismos son poco probables en desarrollar resistencia contra la plata en comparación con antibióticos. Las AgNP interactúan con múltiples objetivos en la célula microbiana, como la membrana celular, enzimas y plásmidos, proporcionando al mismo tiempo las bacterias menos capacidad para ganar resistencia, esto según Rai (2012).

El tamaño de las AgNP utilizado en este trabajo fue utilizado según lo citado por otros autores relacionado con su efectividad en contra del crecimiento microbiano.

Según lo citado por Espinosa-Cristóbal et al (2009), entre más pequeña la nanopartícula, más se liberan iones de Ag⁺ y su efecto antibacteriano puede ser mejor. En base a esto AgNP de 10 nm fueron utilizadas en estado puro y en 9 diluciones diferentes para determinar su efectividad como antimicrobiano contra el *E. faecalis*.

Todas las diluciones de nanopartículas de plata así como en su estado puro, resultaron agentes bactericidas activos y las actividades antimicrobianas fueron variadas según su concentración en dilución; esto para las pruebas donde se inocularon 200 µl del antimicrobiano (AgNP) siguiendo el patrón sugerido por Espinosa-Cristóbal et al (2009).

Los porcentajes de efectividad más altos se registraron en estado puro en comparación con las diluciones y el porcentaje más alto (74.08%) se registró a las 48 horas de incubación de la microplaca. A las 72 horas el patrón de efectividad se mostró con un ligero decrecimiento (64.45%) pero aun así se mantuvo la efectividad antimicrobiana.

Esto coincide con los hallazgos reportados por Losasso et al (2014) donde se probó la efectividad antimicrobiana de las AgNP contra varios serotipos de Salmonella, donde dependiendo del serotipo y la concentración, lograron mantener una efectividad hasta las 72 horas en uno de los serotipos, mientras que en otro, a las 72 horas hubo una recuperación del crecimiento bacteriano y por lo tanto un decrecimiento en la efectividad de las AgNP.

Los resultados mostrados en las inoculaciones con una concentración de 100 µl del antimicrobiano, no mostraron efectividad significativa en estado puro ni en ninguna de las otras diluciones. No obstante, el mayor porcentaje en estado puro (8.67%) se mostró hasta 48 horas después de la incubación, recuperándose el crecimiento por completo a las 72 horas. La dilución de 125 µl de AgNP mostró una efectividad de hasta el 19% a las 72 horas, siendo éste el porcentaje más alto obtenido de la prueba con 100µl.

La MCI apreciada en este estudio se obtuvo en la dilución de 125 µl de AgNP.

Respecto a los controles positivos, el NaOCl a una concentración del 5% mostró la efectividad más alta (86%) hasta las 48 horas, manteniendo ésta efectividad hasta las 72 horas de haber sido incubado. El control positivo de NaOCl al 2% no mostró efectividad significativa en ninguno de los períodos de tiempo examinado.

Esto parece concordar con Tirali et al (2013) donde probaron la efectividad del NaOCl contra el *E. faecalis* y *Candida Albicans*, en este estudio utilizaron diferentes concentraciones de NaOCl, donde la más efectiva fue la concentración del 5.25%

8. CONCLUSIONES

Actualmente, el campo de la medicina enfrenta un nuevo reto, esto debido al aumento de resistencia de algunos microorganismos ante determinados antibióticos.

En odontología, diversas bacterias presentes en patologías orales, han demostrado ser multirresistentes a diversos tipos de farmacéuticos o antisépticos.

En años recientes, el campo de la nanotecnología ha ido desarrollando nuevas opciones de tratamiento en el campo de la medicina.

Las nanopartículas de plata surgen como una alternativa de tratamiento ante diferentes patologías que pudieran involucrar microorganismos resistentes.

Además con la ventaja que posee de que sea muy improbable el desarrollo de resistencia de microorganismos a la plata, es una alternativa de tratamiento atractiva hoy en día.

Se ha comprobado la efectividad de las nanopartículas de plata en tamaño como en concentraciones muy pequeñas en contra del *E. faecalis*.

Esto representa un punto a favor en cuanto a la toxicidad de estas partículas ya que se ha demostrado que no causan daño alguno a estas concentraciones y cada día surgen más técnicas para su elaboración que las hacen menos dañinas al ser humano y al medio ambiente.

En el campo de la odontología, podría ser un coadyuvante en tratamientos donde puede ser utilizado como irrigante, o bien, como medicamento, ya que se ha demostrado que su eficacia aumenta proporcionalmente al tiempo en que se encuentra expuesto.

9. LITERATURA CITADA

Artículos en revistas:

- Ahmad, T. W. (Jul2013). Biosynthesis, structural characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*. Vol. 107, p227-2.
- Balaei Gajan E, S. A. (Epub 2013 May 30). Antibiotic Resistance in Enterococcus faecalis Isolated from Hospitalized Patients. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.*, 7(2):102-4. doi: 10.5681/joddd.2013.018. .
- Bao G, M. S. (2013 Apr 29.). Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. . *Annu Rev Biomed Eng.* .
- Barge S, R. R. (2013 Jul 1). Enterococcus faecalis Endogenous Endophthalmitis from Valvular Endocarditis. . *Case Rep Ophthalmol Med.* , 174869. doi: 10.1155/2013/174869.
- Behra R, S. L. (2013 Jul 24). Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective. *J R Soc Interface.* , 10(87):20130396. doi: 10.1098/rsif.2013.0396. .
- Chernousova S, E. M. (2013 Feb 4). Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. . *Angew Chem Int Ed Engl.* , 52(6):1636-53. doi: 10.1002/anie.201205923.
- Chiara Rigo, L. F. (2013). Active Silver Nanoparticles for Wound Healing. * *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 4.
- Citrinum., G. S. (Feb 2013.). Honary, Soheyla. . *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* , Vol. 12 Issue 1, p7-11. 5p. 3 Graphs.
- Contreras., R. G. (2011). Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *International Dental Journal.*, 61: 297–301 doi: 10.1111/j.1875-595X.2011.00072.x.
- Espinosa-Cristóbal., L. (2013 May). Antibacterial effect of silver nanoparticles against Streptococcus mutans. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* , 1;33(4):2197-202. doi: 10.1016/j.msec.2013.01.039. .
- Fayaz AM, B. (2010 Feb). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-

negative bacteria. . *Nanomedicine.*, 6(1):103-9. doi: 10.1016/j.nano.2009.04.006.

G., S. Y. (2013 Jul 15). Antimicrobial Resistance Pattern in *Enterococcus faecalis* Strains Isolated From Expressed Prostatic Secretions of Patients With Chronic Bacterial Prostatitis. . *Korean J Urol.*, 54(7):477-81. doi: 10.4111/kju.2013.54.7.477. .

Hammerum AM, L. C. (2010 Oct). Antimicrobial-resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard? . *Foodborne Pathog Dis.*, 7(10):1137-46. doi: 10.1089/fpd.2010.0552. .

Lins RX, d. O. (2013 Sep). Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. *J Dent.* , 41(9):779-86. doi: 10.1016/j.jdent.2013.07.004.

Losasso C1, Belluco S1, Cibir V1 (2014 May) Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella* serovars. *Front Microbiol.* 26;5:227. doi: 10.3389/fmicb.2014.00227. eCollection 2014.

Luddin N, A. H. (Jan 2013). The antibacterial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*: A review on agar diffusion and direct contact methods. *J Conserv Dent.* , 16(1):9-16. doi: 10.4103/0972-0707.105291.

Mody VV, S. R. (2010 Oct). Introduction to metallic nanoparticles. . *J Pharm Bioallied Sci.*, 2(4):282-9. doi: 10.4103/0975-7406.72127.

Ong C, L. J. (2013). Silver nanoparticles in cancer: therapeutic efficacy and toxicity. . *Curr Med Chem.*, 1;20(6):772-81. .

Oza, G. (Jun 2012). Extracellular Fabrication of Silver Nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa* and its Antimicrobial Assay. . *Advances in Applied Science Research.* , Vol. 3 Issue 3, p1776-1783. 8p.

Pinheiro ET, G. B.-F. (2003). Microorganisms from canals of rootfilled teeth with periapical lesions. . *Int Endod J*, 36: 1-11.

Rams TE, F. D. (2013 Jul). Antibiotic susceptibility of periodontal *Enterococcus faecalis*. . *J Periodontol.* , 84(7):1026-33. doi: 10.1902/jop.2012.120050. .

Ravindran A, C. P. (2013 May). Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects. *Colloids Surf B Biointerfaces.* , 1;105:342-52. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.07.036. .

- Sava IG, H. E. (2010 Jun). Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. . *Clin Microbiol Infect.* , 16(6):533-40. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03213.x. .
- Silva J, R. Y. (2013 Feb). [Detection of virulence genes in aminoglycoside susceptible and resistant *Enterococcus faecalis*]. . *Rev Chilena Infectol.*, 30(1):17-22. doi: 10.1590/S0716-10182013000100003. .
- Sood S, M. M. (2008 Aug). Enterococcal infections & antimicrobial resistance. . *Indian J Med Res.*, 128(2):111-21. .
- Souto R, C. A. (2008 Feb). Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. . *Arch Oral Biol.*, 53(2):155-60. .
- Stuart CH, S. S. (Feb 2006.). *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. . *J Endod.*, 32(2):93-8. .
- Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Topics* 2004; 9:27–36.
- Sweet MJ, C. A. (2012). Review: metal-based nanoparticles; size, function, and areas for advancement in applied microbiology. . *Adv Appl Microbiol.* , 80:113-42. doi: 10.1016/B978-0-12-394381-1.00005-2. .
- Tirali RE1, Bodur H, Sipahi B, Sungurtekin E. (2013 Apr) Evaluation of the antimicrobial activities of chlorhexidine gluconate, sodium hypochlorite and octenidine hydrochloride in vitro. *Aust Endod J.* ;39(1):15-8. doi: 10.1111/j.1747-4477.2010.00266.x. Epub 2010 Oct 24.
- Thorley AJ, T. T. (2013 Jun 25.). New perspectives in nanomedicine. . *Pharmacol Ther.* , pii: S0163-7258(13)00145-9. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.06.008.
- Wang QQ, Z. C. (2012 Mar). Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. . *Int J Oral Sci.*, 4(1):19-23. doi: 10.1038/ijos.2012.17.
- Yogesha, S. B. (2012). An optical tweezer-based study of antimicrobial activity of silver nanoparticles. *Bull. Mater. Sci., Vol. 35, No. 4.,* pp. 529–532.
- Zhu X, W. Q. (Dec 2010). Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *J Endod.* , 36(12):1950-5. doi: 10.1016/j.joen.2010.08.053. .

10. RESUMEN BIOGRÁFICO

Mayra Beatriz Aguila Ruiz

Candidato para el Grado de:

Maestría en Odontología Avanzada

Tesis: Efecto Antimicrobiano De Las Nanopartículas De Plata Contra El
Microorganismo *Enterococcus Faecalis*

Datos personales: Nació en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, teniendo como padres a Martín Guadalupe Aguila González y Martha Ruiz González.

Educación: Estudió la primaria y secundaria en el “Instituto Morelos” ubicado en San Nicolás de los Garza, Nuevo León en el período comprendido entre 1994- 2003.

Sus estudios de preparatoria los continuó en la Preparatoria No. 7 Unidad Puentes en el período de 2003-2005.

Posteriormente cursó la carrera de Cirujano Dentista en el período de 2005- a 2010 en la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

En el período de 2010-2011 realizó el servicio social en la Facultad de Odontología de la UANL; y posteriormente se dedicó a trabajar como asistente dental y cirujano dentista en el período de agosto 2011 a julio 2012 en un consultorio particular.

En el período de 2012-2014 realizó la residencia en el Posgrado de Odontología Avanzada de la UANL para conseguir el grado de Maestría en Odontología Avanzada, para el cual se presentó este trabajo.