



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
Y ESTUDIOS AVANZADOS EN ODONTOLOGÍA  
“DR. KEISABURO MIYATA”**

**BIOSINTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON *SYZYGium  
AROMATICUM* SOBRE GUTAPERCHA ENDODÓNTICA Y  
DETERMINACIÓN DE EFECTO ANTIMICROBIANO**

## **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**E. EN E. ERIKA ALEJANDRA JARDÓN ROMERO**

**TUTOR ACADÉMICO  
DRA. EN C.S. EDITH LARA CARRILLO**

**TUTORES ADJUNTOS  
M. EN C.O.O. SARAI LÓPEZ GONZÁLEZ  
DRA. EN ED. SILVIA CRISTINA MANZUR QUIROGA**

**TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO FEBRERO DE 2017**



## Índice

Contenido	Páginas
Resumen	
Introducción	
1. Antecedentes	1
1.1 Microbiología del conducto radicular	1
1.2 Preparación biomecánica y obturación del sistema de conductos	6
1.3 Nanotecnología	12
2. Planteamiento del problema	24
3. Justificación	25
4. Hipótesis	26
5. Objetivos	27
6. Materiales y métodos	28
6.1 Diseño de estudio	28
6.2 Operacionalización de las variables	29
6.3 Equipo y materiales	29
7. Resultados	38
7.1 Acuse de envío para la publicación	38
7.2 Artículo completo enviado	39
7.3 Resultados adicionales	59
8. Discusión	65
9. Conclusiones	69
10. Referencias	70
11. Anexos	79

## Resumen

### **Biosíntesis de nanopartículas de plata con *Syzygium aromaticum* sobre gutapercha endodóntica y determinación de efecto antimicrobiano**

**Introducción:** La nanotecnología se ha convertido en un área de investigación con resultados prometedores para la innovación tecnológica; en consecuencia, la endodoncia puede beneficiarse de este campo de la investigación, debido a las diferentes propiedades químicas y físicas de los materiales producidos en una escala nanométrica. La actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata (Nps-Ag) contra varias especies de microorganismos de interés endodóntico ha sido registrada en varias investigaciones. **Objetivo:** Determinar las propiedades antimicrobianas de la biosíntesis de Nps-Ag con *Syzygium aromaticum* en gutapercha endodóntica (GP), sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y antifúngicas contra *Candida albicans*. **Metodología:** Estudio experimental, en el cual se incorporó el extracto acuoso de *Syzygium aromaticum* al nitrato de plata, como reductor para la biosíntesis *in situ* de Nps-Ag sobre conos de GP. Las nanopartículas (Nps) fueron caracterizadas mediante UV-visible, Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) y Microscopio Electrónico de Transmisión (MET). Posteriormente se evaluó el efecto antimicrobiano por método de contacto directo en agar sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. **Resultados:** La cinética de formación de las Nps-Ag se obtuvo mediante UV-vis. La forma y posición del plasmón de resonancia electrónica demostró la presencia de nanopartículas con morfología esférica y distribución de tamaños estrecha, corroborado mediante TEM. Las micrografías de MEB, constataron la presencia de nanopartículas sobre la superficie de los conos. Se observaron halos de inhibición de 2-3mm en comparación con la GP control (sin NPs-Ag) para cada una de las bacterias. **Conclusiones:** De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, los conos de GP con Nps-Ag, pueden aumentar la tasa de éxito en los tratamientos endodónticos, ya que la presencia de Nps contribuye a la eliminación de microorganismos residuales y a prevenir la reinfección del sistema de conductos radiculares

## Introducción

El tratamiento de conductos pretende prevenir y/o curar las patologías periapicales, cuya causa más frecuente son los microorganismos. Hasta el inicio de la pulpitis, las bacterias implicadas serán principalmente aerobias; sin embargo, su proliferación originará condiciones de anaerobiosis y necrosis pulpar, creándose así condiciones favorables para el crecimiento de bacterias anaerobias facultativas y, posteriormente, de anaerobias estrictas.

La preparación biomecánica permite reducir el número de microorganismos presentes en el sistema de conductos y posteriormente evitar su reinfección mediante la obturación, la cual consiste esencialmente en reemplazar el contenido natural o patológico de los conductos por materiales inertes o antisépticos bien tolerados por los tejidos periapicales.<sup>1</sup>

En los últimos dos siglos la gutapercha ha sido el material semisólido más popular utilizado para la obturación endodóntica, debido a las ventajas que proporciona su composición química y características físicas.<sup>2</sup>

Por otro lado, la nanotecnología ha cambiado la perspectiva funcional de los materiales empleados en Medicina y Odontología, ofreciendo a éstos una mejor funcionalidad debido principalmente a su tamaño nanométrico. Un ejemplo son las nanopartículas de plata que exhiben diferentes propiedades una vez aplicadas a los sistemas biológicos, en comparación con los sistemas tradicionales de tratamiento. El tamaño nanométrico les confiere la habilidad de penetrar distintas membranas biológicas como la pared bacteriana, incrementando su efecto bactericida conocido ya desde tiempo.<sup>3</sup>

En consecuencia, la endodoncia puede beneficiarse de este campo de la investigación, debido a las diferentes propiedades químicas y físicas de los materiales producidos en una escala nanométrica. La actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata contra varias especies de microorganismos de interés endodóntico ha sido registrada en varias investigaciones.<sup>4,5</sup>

El objetivo de este estudio, fue conseguir la biosíntesis de nanopartículas de plata con *syzygium aromaticum* en gutapercha endodóntica, y determinar las propiedades antimicrobianas sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y levaduras *Candida albicans*.

## 1. Antecedentes

### 1.1 Microbiología del conducto radicular

Las infecciones endodónticas se pueden clasificar según su localización anatómica (infección intrarradicular o extrarradicular). La infección intrarradicular se debe a microorganismos que colonizan el sistema de conductos radiculares, y se pueden subdividir en tres categorías según el momento en que las bacterias entran al sistema de conductos: a) infección primaria, causada por microorganismos que invaden y colonizan el tejido necrótico de la pulpa en un primer momento; b) infección secundaria, causada por microorganismos que no están presentes en la infección primaria, pero que son introducidos en el conducto radicular en algún momento después de la intervención profesional (es decir, es secundaria a la intervención); y c) infección persistente causada por microorganismos que fueron componentes de la infección primaria y secundaria que resistieron de alguna forma los procedimientos antimicrobianos que tienen lugar dentro del conducto y pudieron persistir en periodos de privación de nutrientes en los conductos tratados. Las infecciones persistentes y secundarias son en su mayoría indistinguibles por la clínica, excepto en los casos donde los signos y síntomas de infección surgen en un diente no infectado previamente. (Fig. 1)



Fig.1 Micrografía electrónica de barrido, muestra biofilm bacteriano compuesto por microorganismos de diferentes morfotipos cubriendo en una lesión cariosa profunda.

Fuente: [http://www.eis.uva.es/~macromol/curso03-04/automovil/paginas/El\\_caucho.htm](http://www.eis.uva.es/~macromol/curso03-04/automovil/paginas/El_caucho.htm)

La infección extrarradicular se caracteriza por la invasión microbiana de los tejidos perirradiculares inflamados y es una secuela de la infección intrarradicular, pero lo cierto es que las infecciones perirradiculares pueden ser dependientes o independientes de la infección radicular.<sup>6</sup>

### **1.1.1 Infección intrarradicular primaria.**

Se caracteriza por la presencia de una comunidad variada dominada notoriamente por bacterias anaerobias. El número varía de entre  $10^3$  y  $10^8$  por conducto radicular. Los estudios moleculares demuestran la presencia de una media de 10 a 20 especies o filiotipos por conducto infectado. Los conductos de dientes con tractos sinusales contienen una media de 17 especies. El tamaño de la lesión de periodontitis apical es proporcional al número de especies bacterianas y de células que haya en el conducto radicular.<sup>7</sup>

Algunos conductos relacionados con lesiones más grandes pueden llegar a albergar incluso más de 40 taxones es decir, cuanto mayor sea la lesión, mayor será la diversidad y la densidad bacteriana dentro del conducto.<sup>8</sup>

Las especies bacterianas que se detectan con mayor frecuencia en la infecciones primarias, incluidos los casos con abscesos, pertenecen a diversos generos de bacterias gram negativas (*Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema*, *Campylobacter* y *Veionella*) y gram positivas (*Parvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Actinomyces*, *Peptoestreptococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* y *Eubacterium*).<sup>6-9</sup>

### **1.1.2 Ecología microbiana y ecosistema del conducto radicular**

Un conducto radicular con pulpa necrótica constituye un espacio que favorece la colonización bacteriana y proporciona a las bacterias un entorno húmedo, caliente, nutritivo y anaerobio en el que están protegidas en general de las defensas del huésped, debido a la ausencia de una circulación sanguínea activa en el tejido de una pulpa necrótica. Además, las paredes del conducto radicular son superficies que no presentan recovecos que permitan la colonización y formación de comunidades complejas. No es difícil que prácticamente todas las especies

bacterianas orales puedan considerar el conducto radicular necrótico como un medio fértil para el crecimiento y colonización bacteriana.

Los principales factores etiológicos que determinan la composición de la microbiota del conducto radicular son la tensión de oxígeno, tipo, cantidad de nutrientes disponibles y las interacciones bacterianas. También pueden estar implicados otros factores como la temperatura, pH y receptores de adhesinas.

En las fases iniciales del proceso infeccioso en la pulpa, predominan bacterias facultativas. Tras unos días o semanas, el oxígeno se agota como consecuencia de la necrosis de la pulpa y del consumo por las bacterias facultativas. El aporte continuo del oxígeno está interrumpido por la pérdida de la circulación sanguínea hacia la pulpa necrótica y se desarrolla un entorno anaerobio que permite la supervivencia y crecimiento de bacterias anaerobias obligadas. Con el paso del tiempo, las condiciones anaerobias son cada vez más pronunciadas, en particular en el tercio apical del conducto radicular. Por lo tanto las bacterias anaerobias dominarán en la microbiota, superando el número de bacterias facultativas.<sup>6</sup>

Las principales fuentes de nutrientes de las bacterias que colonizan el sistema de conducto radicular son: a) pulpa necrótica, b) proteínas y glucoproteínas de los líquidos tisulares y el exudado que embebe el sistema de conductos a través de los forámenes apical y lateral, c) componentes de la saliva que pueden penetrar coronalmente el conducto radicular, y d) productos del metabolismo de otras bacterias.<sup>1-3</sup>

Al haber mayor cantidad de nutrientes en el conducto principal, la mayor parte de la microbiota infectante (en particular, las especies anaerobias exigentes) se localicen en esta región. Las especies bacterianas que mejor compiten y utilizan los nutrientes en el sistema del conducto radicular son las que tendrán éxito en la colonización.<sup>2,4,6</sup>

Además de verse influidos por las variaciones en los niveles de oxígeno, los cambios en la microbiota que coloniza el sistema del conducto radicular también dependen de la dinámica de la utilización de los nutrientes. Las especies sacarolíticas dominan en las fases más tempranas del proceso infeccioso, pero



pronto se ven superadas en número por las especies asacarolíticas que dominarán en las fases posteriores.<sup>6</sup> (Fig. 2)

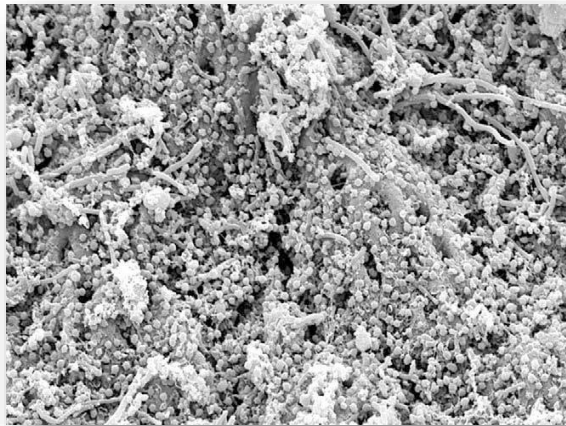


Fig.2. Población bacteriana mixta colonizando la pared del conducto radicular.  
Fuente: Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP: Patrones de la colonización microbiana en las infecciones primarias del conducto radicular. Oral Surg oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 93: 174, 2002.

Aunque el tejido de la pulpa necrótica se puede considerar una fuente finita de nutrientes para las bacterias, dado el pequeño volumen de tejido que se va degradando de forma gradual, la inducción de la inflamación perirradicular garantiza una fuente mantenida de nutrientes, en particular en forma de proteínas y glucoproteínas presentes en el exudado que baña el conducto. En esta fase, el proceso infeccioso comienza a dominar las bacterias que tienen capacidad proteolítica o que pueden establecer interacciones de colaboración con las que utilizan este sustrato en su metabolismo. Por lo tanto, las proteínas se van convirtiendo en la principal fuente de nutrientes, a medida que los procesos infecciosos alcanzan la fase de inducción de una inflamación perirradicular, en particular en la parte apical del conducto, lo que favorece el establecimiento de las especies anaerobias que utilizan los péptidos o aminoácidos en su metabolismo.<sup>4-6</sup>

### **1.1.3 Infección endodóntica secundaria o persistente**

Las infecciones radiculares persistentes se deben a microorganismos que han resistido a procedimientos antimicrobianos dentro del conducto y que han sobrevivido al conducto tratado. El momento podría ser entre citas, durante el

tratamiento, o incluso después de obturado el conducto radicular. En cualquier caso, si los microorganismos que penetran intentan adaptarse a un nuevo entorno, sobrevivir y proliferar, se establecerá una infección secundaria. Lo anterior constituye la principal causa de fracaso endodóntico.<sup>7</sup>

#### **1.1.4 Fracaso del tratamiento endodóntico**

El tratamiento antimicrobiano meticuloso puede ser insuficiente para eliminar por completo las bacterias del sistema de conductos radiculares infectado, ya que las bacterias persistentes pueden ser resistentes o inaccesibles a los procedimientos terapéuticos. Sea cual sea la causa de la persistencia, diversidad y densidad bacteriana se reduce en gran medida después del tratamiento.

No se han identificado especies aisladas importantes que persistan después de los procesos terapéuticos. Por lo general, las bacterias gramnegativas, que son miembros habituales de las infecciones primarias, se han eliminado, a excepción de algunos bacilos anaerobios como *F. nucleatum*, *Prevotella* y *Campylobacter rectus*, que son algunas de las bacterias que podemos encontrar en muestras obtenidas después de la instrumentación o de administrar medicación.<sup>10</sup> La mayoría de los estudios sobre esta materia han demostrado con claridad que, cuando las bacterias se resisten a los procedimientos terapéuticos, las bacterias grampositivas son las más frecuentes. Los gérmenes gram positivos facultativos o anaerobios que podemos detectar a menudo en esas muestras son *streptococcus*, *P. micra*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *P. alactolyticus*, *lactobacilos*, *E. faecalis*, y *Olsenella uli*, lo que apoya la teoría de que las bacterias gram positivas pueden ser más resistentes al tratamiento antimicrobiano y que podrían tener la capacidad de adaptarse a las condiciones ambientales más adversas en los conductos radiculares instrumentados y medicados.<sup>9,11</sup>

## **1.2 Preparación biomecánica y obturación del sistema de conductos**

El éxito de la terapia endodóntica depende, en primer término, de la limpieza y conformación del sistema de conductos radiculares, y esto se lleva a cabo mediante el procedimiento conocido como preparación biomecánica.<sup>12</sup>

La razón fundamental del tratamiento de conductos se basa en principios biológicos simples. Dado que la pulpa está rodeada por dentina subyacente, no puede inflamarse durante la respuesta inflamatoria natural del organismo; de esta forma una pulpa vascular puede degenerar en una necrosis.

Hülsmann y cols<sup>13</sup> concluyeron que el principal objetivo de la preparación del sistema de conductos radiculares es la prevención de la inflamación perirradicular, o la promoción de su cicatrización en caso de que ya esté instaurada, mediante las siguientes pautas:

- ∂ Remoción de tejido vital o necrótico de los conductos radiculares.
- ∂ Creación de un espacio suficiente para la irrigación y medicación.
- ∂ Preservación de la integridad y ubicación de la anatomía de la porción apical del conducto.
- ∂ Evitar daño iatrogénico al conducto radicular y a la superficie radicular.
- ∂ Facilitar la obturación del conducto radicular.
- ∂ Evitar una nueva inflamación o infección de los tejidos perirradiculares.
- ∂ Preservación de suficiente espesor de dentina radicular para garantizar la conservación funcional del diente a largo plazo.

### **1.2.1 Limpieza y conformación de los conductos radiculares**

Es la remoción de todo el contenido del sistema de conductos radiculares antes de la conformación y durante la misma: material infectado, material antigénico, sustratos orgánicos, microflora, productos bacterianos, restos de comida, tejidos remanentes, cálculos pulpares, sustancias químicas inflamatorias, materiales de

relleno contaminado y detritos dentinarios que se producen durante los procedimientos de conformación del canal.<sup>1,12,13</sup>

La limpieza facilita la extracción mecánica de los contenidos del sistema de conductos, disolución química y salida de mediadores de la inflamación.

Una limpieza adecuada facilita el uso de los instrumentos para eliminar físicamente las sustancias, la irrigación de los sistemas para eliminar los restos de materiales y la disolución de los contenidos de las zonas inaccesibles gracias a las sustancias químicas.

De esta manera, durante la ejecución del tratamiento de conductos surgen dos objetivos fundamentales: el objetivo biológico de la limpieza y conformación de los conductos radiculares, es decir, dejarlos libres de contenido orgánico, y el mecánico, darle forma cónica, uniforme, progresiva y regular, para que pueda ser obturado herméticamente con facilidad.<sup>1</sup>

### **1.2.2 Irrigación e Instrumentación rotatoria**

Cohen<sup>1</sup> señala que el tratamiento de conductos consiste esencialmente en un proceso de desbridamiento durante el que hay que eliminar los elementos irritantes del conducto y el tejido periapical para obtener resultados satisfactorios.

Este desbridamiento puede efectuarse de diferentes maneras, dependiendo de las circunstancias: instrumentación del conducto, aplicación de medicamentos e irrigantes o cirugía. En ningún caso se pueden obtener resultados aceptables sin alguna forma de desbridamiento. Cuando se prepara correctamente el conducto, es casi seguro que cualquiera de los métodos de obturación aceptados producirá resultados.

Este trabajo sincronizado (instrumentación e irrigación) elimina los restos tisulares y reduce en gran parte el número de microorganismos remanentes en el conducto.<sup>1</sup>

Los avances científicos de los últimos años, han permitido lograr este objetivo de manera más eficiente, mejorando así el éxito a largo plazo del tratamiento endodóntico. El uso de limas rotatorias de níquel titanio (NiTi) durante la instrumentación, ha ganado popularidad debido a su mayor flexibilidad y capacidad de mantener la configuración original de los canales curvos con paredes delgadas.

Además, existe evidencia de que estos sistemas reducen las fallas relacionadas con la instrumentación y permiten una conformación de conicidad adecuada con gran velocidad y efectividad. A pesar de presentar estas ventajas en comparación con la instrumentación manual realizada con limas de acero inoxidable, para algunos clínicos resulta difícil seleccionar el sistema rotatorio de limas NiTi más apropiado, debido a la numerosa cantidad de instrumentos que conforman los diferentes sistemas existentes en el mercado.<sup>1,12-14</sup>

Durante la conformación de los conductos deben realizarse frecuentes y copiosas irrigaciones. La limpieza de los conductos se consigue con medios químicos (sustancias irrigadoras), medios físicos (irrigación y aspiración) y medios mecánicos (instrumentación); todo de modo simultáneo. La secuencia es: instrumentación, recapitulación con un instrumento muy fino para evitar la acumulación de barro dentinario y mantener el conducto permeable, e irrigación.

En el complejo sistema de conductos radiculares existen lugares inaccesibles a los instrumentos, los líquidos de irrigación son los encargados de limpiarlos y desinfectarlos. Las sustancias irrigadoras cumplen importantes funciones físicas y biológicas:

- 1- Arrastrar mecánicamente el contenido del conducto.
- 2- Eliminar la materia orgánica o inorgánica.
- 3- Limpiar, desinfectar y neutralizar los antígenos.
- 4- Lubricar el conducto.<sup>1</sup>

La capa de barro dentinario o smear layer queda adherida a las paredes de la dentina y en ella puede haber bacterias, por lo que debe eliminarse para que puedan

penetrar los materiales de obturación en los conductos laterales, incluso en los conductillos dentinarios limpios y permeables. La sustancia más eficaz para disolver el barro dentinario es el EDTA al 17%,<sup>1,12</sup>

### 1.2.3 Obturación del sistema de conductos

La obturación hermética del conducto, preparado y seco, con un material biocompatible, es imprescindible para evitar que reaparezcan irritantes, metabolitos, microorganismos y demás factores que puedan alterar los tejidos periapicales induciendo una recidiva de la lesión. Conseguir esto no es fácil por la gran complejidad del sistema de conductos: presencia de curvaturas, ramificaciones y deltas apicales.<sup>13,14</sup>

Cohen<sup>1</sup> menciona que los objetivos de la obturación del espacio del canal radicular preparado pueden resumirse en:

- 1- Eliminar todas las filtraciones provenientes de la cavidad oral o de los tejidos perirradiculares en el sistema del canal radicular.
- 2- Sellar dentro del sistema todos los agentes irritantes que no puedan eliminarse por completo durante el procedimiento de limpieza y conformación del conducto. (Fig. 3)



Fig.3. Tratamiento de conductos. A) Primer molar inferior izquierdo, B) Primer premolar inferior derecho.  
Fuente: directa

### 1.2.4 Gutapercha

La gutapercha es el material preferido como relleno sólido para la obturación del conducto.<sup>1,15</sup>

Desde el punto de vista molecular, la gutapercha es el isómero trans del poliisopropeno y se encuentra en forma cristalina en aproximadamente un 60%. El isómero cis es una goma natural de forma amorfa. (Fig.4)

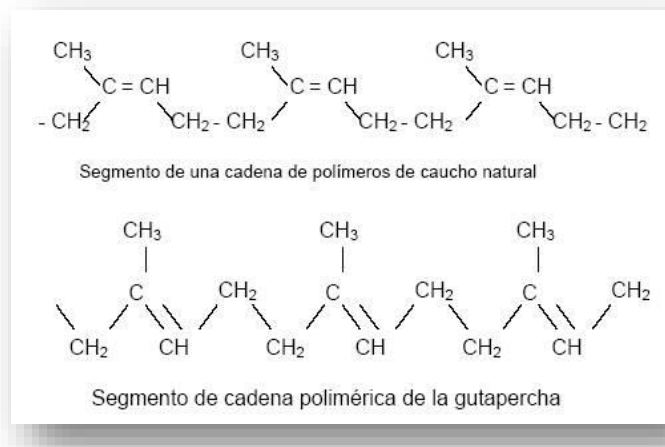


Fig.4 Composición química de la gutapercha.

Fuente: [http://www.eis.uva.es/~macromol/curso03-04/automovil/paginas/El\\_caucho.htm](http://www.eis.uva.es/~macromol/curso03-04/automovil/paginas/El_caucho.htm)

La gutapercha químicamente pura, se presenta en dos formas cristalinas completamente diferentes: alfa y beta. La mayor parte de la gutapercha comercial es la beta. No existen diferencias físicas entre ambas formas, sólo una diferencia en la red cristalina relacionada con diferentes niveles de enfriamiento a partir del punto de fusión. La forma que se utiliza en la práctica dental, es la beta, que tiene punto de fusión de 64 grados centígrados. La gutapercha se expande un poco al ser calentada, característica deseable para un material de obturación endodóntico.

Los conos de gutapercha contienen aproximadamente un 20% de gutapercha, 65% óxido de zinc, 10% sustancias radiopacas y un 5% de plastificadores.<sup>1</sup> Es importante

mencionar que los conos de gutapercha por sí mismos no poseen efectos antimicrobianos.<sup>16</sup>

Existen algunas ventajas de este material:

- ∂ Compresibilidad: la gutapercha se adapta perfectamente a las paredes de los conductos preparados cuando se utiliza la técnica de compresión, en realidad este material no es compresible sino compactable.
- ∂ Inerte: la gutapercha es el material menos reactivo de todos los empleados en odontología clínica, considerablemente menos que la plata y el oro.
- ∂ Estabilidad dimensional: la gutapercha apenas presenta cambios dimensionales después de endurecida, a pesar de las modificaciones de la temperatura.
- ∂ Tolerancia hística: la gutapercha es tolerada por los tejidos periapicales.
- ∂ Opacidad radiográfica.
- ∂ Plastificación al calor: el calentamiento de la gutapercha permite su compactación.
- ∂ Se disuelve con facilidad: se disuelve con sustancias solventes generalmente cloroformo y xilol. Esta propiedad constituye una ventaja importante respecto a otros materiales de obturación. El cloroformo disuelve por completo la gutapercha.<sup>1</sup>

Existen algunas desventajas de este material:

- ∂ Falta de rigidez: la gutapercha se dobla con facilidad cuando se comprime lateralmente, lo cual dificulta su aplicación en conductos de tamaño pequeño.
- ∂ Falta de control longitudinal: cuando se comprime lateralmente, lo cual dificulta su aplicación en conductos de tamaño pequeño, la gutapercha puede deformarse verticalmente por distensión.<sup>17</sup>



### 1.3 Nanotecnología

Durante las últimas décadas, la investigación en ciencia y tecnología se ha centrado en la fabricación de estructuras atómicas y materiales a escalas nanométricas (1 nm =  $10^{-9}$  m), lo que comúnmente se conoce como “Nanotecnología”. Esta nueva ciencia multidisciplinar proporciona productos con nuevas propiedades fisicoquímicas diferentes a las de las moléculas individuales o sólidos de la misma composición.<sup>18</sup>

La segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales realizada por la Comisión Europea en el 2012, define nanomaterial como “un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas, o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm.”<sup>19</sup>

El primero en hablar sobre esta tecnología fue Richard P. Feynman en 1959, ganador del primer Nobel de Física; quien auguró una asombrosa cantidad de descubrimientos que tendrían un gran impacto en la ciencia por ser asociados a nuevas tecnologías y que permitirían la manipulación de estructuras en la escala atómica y/o molecular. Hubo que esperar aproximadamente 20 años para que se desarrollaran técnicas experimentales que permitieran analizar estructuras a escala nanométrica, como la microscopía de fuerza atómica (MFA) y microscopía de efecto túnel (MTS). Estas técnicas permiten “observar” y además manipular materiales a escala atómica o molecular.<sup>19,20-24</sup>

Las características de los materiales tradicionales dependen de cómo se comportan los electrones y de cómo están ordenados los átomos en la materia. Esto también ocurre en el caso de los nanomateriales, pero además es importante considerar las características particulares que surgen de las dimensiones del propio material y de la elevada proporción de la superficie de los átomos. Es por ello que éstos presentan propiedades físicas y químicas novedosas que pueden ser utilizadas en diferentes aplicaciones nanotecnológicas.<sup>25,26</sup>

### 1.3.1 Tipos de síntesis

La síntesis de nanopartículas de plata (Nps-Ag) se lleva a cabo a partir de dos procedimientos totalmente opuestos: las llamadas “técnicas descendentes” (top-down), en las que se va reduciendo el tamaño de las partículas hasta alcanzar una escala nanométrica, y las llamadas “ascendentes” (bottom-up), en las que a partir de átomos individuales en diversas soluciones se van formando ensambles cuyos tamaños son controlables con precisión.<sup>27</sup>

En general, la síntesis de nanopartículas (Nps) metálicas en disolución se lleva a cabo mediante el empleo de los siguientes componentes: 1) precursor metálico, 2) agente reductor y 3) agente estabilizante. El mecanismo de formación de las disoluciones coloidales a partir de la reducción de iones plata consta de dos etapas diferentes: nucleación y crecimiento. El proceso de nucleación requiere una alta energía de activación mientras que el proceso de crecimiento requiere una baja energía de activación.<sup>19,28,29</sup>

El tamaño y forma de las nanopartículas dependerá de las velocidades relativas de estos procesos, que pueden ser controladas a través de la modificación de los parámetros de reacción (concentración, temperatura, pH, poder reductor, etc.).<sup>19</sup>

De acuerdo a la técnica utilizada, las Nps metálicas se forman a través de métodos físicos, químicos y biológicos. En el caso de los métodos químicos, se utiliza la reducción química, técnicas electroquímicas y fotoquímicas, siendo la primera la estrategia más empleada en el caso de NPs-Ag, ya que se obtienen dispersiones coloidales estables de forma y tamaño deseados, tanto en medio acuoso como orgánico.<sup>18,30,31</sup>

En la reducción de sales de plata para la síntesis de Nps se requieren compuestos como el borohidruro de sodio, hidracina, hipofosfito, así como los agentes de terminación como el alcohol de polivinilo, que son utilizados para proteger la agregación de las Nps; este tipo de reactivos por lo general son ecológicamente no compatibles, requieren un manejo especial y las altas temperaturas aumentan el costo de producción.<sup>27,32-34</sup>

En contraste, la biosíntesis de Nps también denominada “síntesis verde” ha permitido la formación de nanoestructuras metálicas a partir del uso de bacterias, hongos, plantas o sus extractos; por lo que esta forma de síntesis representa una alternativa no tóxica y amigable con el medio ambiente; su uso en algunas ocasiones iguala o sobrepasa las expectativas de las Nps sintetizadas por métodos físicos y químicos en cuanto a costo y características.<sup>27</sup>

Los extractos verdes contienen moléculas que llevan alcohol en sus grupos funcionales, principalmente del tipo fenólico, que pueden ser explotados para la reducción, así como la formación de complejos estables con las Nps metálicas.<sup>18,28</sup>

### **1.3.2 Nanopartículas de plata**

Las nanopartículas metálicas (Nps), más promisorias como agentes bactericidas son las de plata (Nps-Ag); existen antecedentes que se remontan a la época del Imperio romano, donde se empleaba plata para potabilizar el agua.<sup>35</sup> En el siglo XIX se usaba nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) para permitir la epitelización y promover la cicatrización de heridas.<sup>36</sup>

Durante los años cuarentas, en pleno auge de la penicilina, se introdujo el uso de la plata para el tratamiento de infecciones bacterianas.<sup>36</sup> En los años sesenta, Moyer<sup>37</sup> introdujo el uso de  $\text{AgNO}_3$  para el tratamiento de quemaduras, indicaba que la solución no interfería en la proliferación del tejido epidérmico y poseía propiedades antibacterianas contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. En 1968, el  $\text{AgNO}_3$  fue combinado con sulfamida para formar una crema de sulfazida de plata ( $\text{Ag}^+$ ), la cual sirve como agente antibacteriano contra *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella spp* y *Pseudomonas spp*.<sup>38</sup>

### **1.3.3 Propiedades y mecanismo de acción.**

La plata se define como "oligodinámica" por su capacidad para producir efecto bactericida a concentraciones muy bajas. Los iones  $\text{Ag}^+$  poseen gran reactividad frente a sustancias como proteínas, enzimas, ADN y ARN, debido a las interacciones que se producen frente a grupos funcionales de tipo tiol, carboxilato,

fosfato, hidroxilo, imidazol, indol o amina. Esta interacción se puede producir de manera sencilla o combinada, lo que puede provocar una serie de eventos que interfieren en los procesos microbianos.

La capacidad microbicida de las Nps-Ag se ha evaluado en una amplia variedad de microorganismos. Una de las características que hace más atractiva su aplicación, es la baja probabilidad de desarrollar resistencia por parte de los microorganismos en comparación con los antibióticos.<sup>24,39</sup> (Fig. 5)

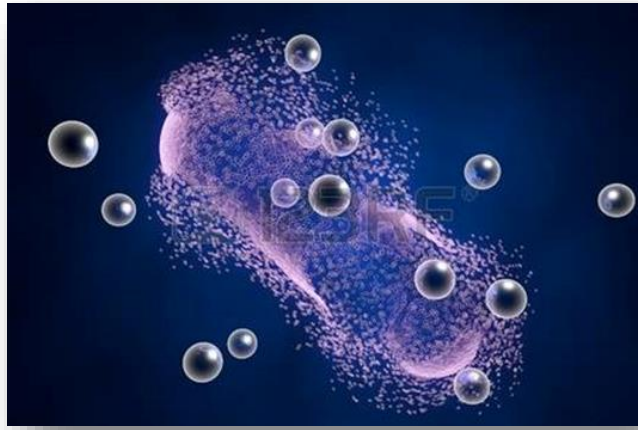


Fig.5 Destrucción de una bacteria por nanopartículas de plata, ilustración 3D.  
Fuente: <http://es.123rf.com/imagenes-de-archivo/bacterias.html>

Por tal motivo, se ha propuesto implementar su uso sobre distintos dispositivos de uso médico, modificando las superficies para inhibir la formación del biofilm bacteriano.

Por otro lado, se menciona que al ser de tamaño tan pequeño pueden penetrar en el interior de la bacteria dañando compuestos que poseen grupos funcionales basados en azufre o fósforo, como por ejemplo el ADN.

Con respecto a la toxicidad, se ha observado la aparición de argiria en heridas abiertas tratadas con concentraciones excesivas de Ag<sup>+</sup>. Sin embargo, en ciertos estudios se sugiere que, por su tamaño y propiedades microbicidas, las Nps-Ag pueden generar daños en el medioambiente debido a su acumulación.<sup>40</sup>

De acuerdo a diversos estudios que involucran células eucariotas, como células hepáticas humanas y fibroblastos,<sup>41</sup> se considera que las NPs-Ag son tóxicas, ya que provocan daños en la respiración celular y ciclos de división celular. Sin embargo, la variabilidad en concentración, tiempo de exposición, tamaño y forma de las NPs-Ag, este tema continúa en debate.<sup>42-44</sup>

### **1.3.4 Técnicas de caracterización**

La caracterización de estas las Nps involucra el registro del perfil de resonancia de plasmones superficiales en espectrofotometría de UV-vis; la relación entre la efectividad de estabilización y el poder antibacteriano tiene un vínculo en la medida de que los aglomerados de partículas provenientes de fenómenos de desestabilización pueden tener menor efecto antibacteriano por una disminución en el área superficial, limitando su capacidad de penetrar la membrana celular.<sup>18,45</sup>

Por otro lado, la determinación de la distribución del tamaño de la partícula se realiza mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz; el estudio de su morfología mediante microscopia electrónica de barrido y microscopia electrónica de transmisión.<sup>30-34</sup>

Respecto a su estabilidad, las Nps-Ag han mostrado en algunos casos ser estables durante dos meses en dispersión acuosa; esta evaluación se registra por la medición del potencial zeta de acuerdo con su movilidad electroforética que puede ser registrada por la técnica de velocimetría de láser Doppler.<sup>28,39,46-48</sup>

#### **a) Espectroscopía de absorción de luz ultravioleta y visible (UV-vis)**

La espectroscopía de absorción de luz ultravioleta-visible es una de las técnicas más empleadas en el análisis químico. Las medidas en el rango de longitud de onda entre el visible y el ultravioleta poseen una amplia aplicación en la caracterización de materiales, ya que brindan información cualitativa y cuantitativa acerca de una gran variedad de especies inorgánicas y orgánicas.<sup>49</sup>

Para que una sustancia sea activa en el visible (longitudes de onda  $\lambda$  entre 380 y 780 nm, aproximadamente), ésta debe ser coloreada, es decir absorber a ciertas  $\lambda$  del espectro visible y transmitir la luz a las restantes longitudes de onda. Por ejemplo, una solución es amarilla debido a que dentro de la región visible absorbe radiación en el rango de 435 a 480 nm. En este rango de longitud de onda se encuentra el color azul del visible, por lo tanto esta sustancia absorbe el color azul y transmite los colores complementarios que dan origen al color amarillo de la solución que se observa a simple vista. La Figura 6 muestra el espectro de radiación electromagnética en la región visible.<sup>30,49</sup>

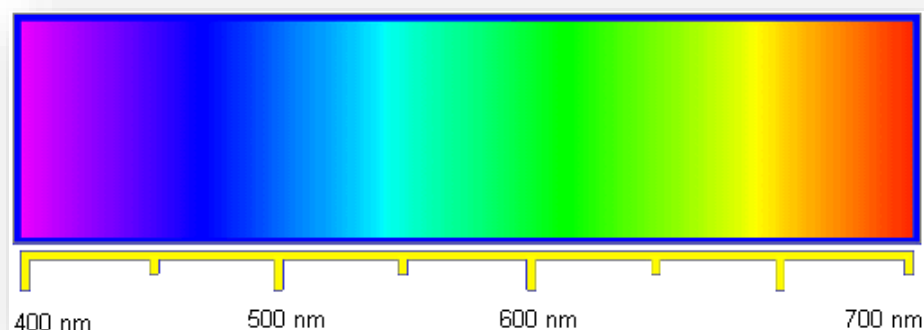


Fig.6 Esquema del espectro de luz visible.  
Fuente <http://www.monografias.com/trabajos10/lalu/lalu.shtml>

El principio de la espectroscopía de UV-vis involucra la absorción de radiación ultravioleta-visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado. La longitud de onda está comprendida entre 190 y 800 nm. Cuando una radiación de cierta  $\lambda$  incide sobre una muestra, se produce la absorción parcial de la misma, produciendo una transición en los niveles energéticos de la especie Y (ya sea un átomo, molécula o ión) y pasando ésta a un estado excitado ( $Y^*$ ).<sup>49</sup>

Es posible analizar la sustancia y relacionarlo con la cantidad de especie activa presente en la muestra. Las bandas que aparecen en un espectro UV-visible son anchas, ya que se superponen transiciones vibracionales y electrónicas.<sup>50</sup>

Por otra parte, la excitación corresponde a los electrones de enlace; en consecuencia, los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de

enlaces. Este hecho da validez a la espectroscopía de UV-vis como técnica de identificación de grupos funcionales de una molécula.<sup>50,51</sup>

En cuanto a las medidas cualitativas, estas son útiles para identificar la presencia de ciertos grupos funcionales que actúan como cromóforos; en las medidas cuantitativas se aplica la ley de Lambert-Beer para determinar la concentración de la sustancia que absorbe a través de la cantidad de radiación transmitida o absorbida.<sup>52,53</sup>

### **b) Microscopía Electrónica de Barrido-EDS**

El microscopio electrónico de barrido (MEB o SEM, por Scanning Electron Microscope), es una técnica de microscopía electrónica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia.<sup>54</sup> (Fig.7)



Fig. 7 Microscopio electrónico de barrido.

Fuente: [http://www.upct.es/sait/sit/recursos\\_micro\\_barrido.html](http://www.upct.es/sait/sit/recursos_micro_barrido.html)

Utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen.<sup>54, 55</sup> Cuando este colisiona con los electrones de las capas más internas de los átomos de la muestra, saca un electrón de su sitio, creando un espacio, que es ocupado por un electrón de las capas más externas. La transición de la capa externa a una interna, genera radiación X. Sí la transición se produce en las capas cercanas a la interna se llama radiación de tipo K y sus correspondientes. Sí la transición ocurre en las capas más externas a la capa interna, se llama transición L, M, N, etc.

y tienen las mismas subdivisiones de K. Para que se originen todas estas transiciones, los átomos deben tener electrones suficientes para producir todas las capas necesarias de electrones.<sup>56</sup>

El detector de rayos X de dispersión de energías recoge un único espectro emitido por todos los elementos de la muestra a la vez; pero genera un impulso eléctrico para cada fotón de rayos X incidente, cuya altura es equivalente a la energía del fotón. Cada impulso eléctrico generado es separado y almacenado de acuerdo a su valor mediante un analizador multicanal de alturas de impulsos.<sup>55-57</sup>

Típicamente se realizan análisis cualitativos de los constituyentes mayoritarios de las áreas de interés (1mm). No obstante, en muestras pulidas es posible hacer análisis cuantitativos, comparando la intensidad de los rayos X obtenida con la intensidad producida por una muestra patrón de composición conocida. Los análisis cuantitativos tienen una precisión de  $\pm 2\%$ , con límites de detección de 100 ppm aproximadamente en análisis rutinarios.<sup>57</sup>

Así, el análisis EDS es un procedimiento estándar para identificar y cuantificar la composición elemental de áreas de muestra hasta con tamaño tan pequeño como de algunos micrómetros cúbicos. El material de muestra es bombardeado con electrones de un SEM y los rayos X producidos son medidos con un espectroscopio de rayos X. Cada elemento tiene una longitud de onda característica y puede ser identificado por éste.<sup>58</sup>

### **c) Microscopía Electrónica de Transmisión**

El un microscopio electrónico de transmisión (TEM) tiene un haz de electrones que es acelerado y enfocado sobre una muestra, de manera tal, que al impactar con la misma genera señales directamente relacionadas con la estructura y morfología de la muestra observada. La interacción entre el haz incidente y los átomos de la muestra, produce, entre otros, electrones dispersados, los cuales son captados por un detector para construir una imagen en dos dimensiones.<sup>56,59</sup> (Fig. 8)





Fig. 8 Microscopio electrónico de transmisión.  
Fuente: <http://www.upv.es/entidades/SME/info/755565normalc.html>

El proceso de formación de una imagen de TEM involucra electrones que se transmiten a través de la muestra sobre la que se hizo incidir un haz de electrones coherentes. De acuerdo a la interacción que se produzca entre el haz de electrones y la muestra al atravesar ésta los electrones se pueden clasificar en electrones no desviados, electrones desviados elásticamente y electrones inelásticos.<sup>58</sup>

Los electrones no desviados y desviados elásticamente son los responsables de la formación de la imagen en TEM, mientras que una fracción de electrones inelásticos, los cuales ceden energía a la muestra al incidir sobre ella, provocan el ruido de fondo presente en las imágenes de TEM. Mediante esta microscopía se puede obtener información acerca del patrón de difracción de electrones de la muestra. Esto se debe a que se producen interferencias en el frente de las ondas transmitidas por la muestra, las cuales son refractadas por una lente en el plano focal posterior originando una imagen de difracción.<sup>60,61</sup>

El TEM presenta dos ventajas con respecto a otras microscopías: posee un factor de magnificación de 50 a 106 y la capacidad de proporcionar una imagen e información acerca del patrón de difracción de la muestra en una misma medida.<sup>62</sup> Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) se construyen mediante el contraste de fase de la onda de los electrones.<sup>63</sup>

Este es producido por la interferencia de las fases de las ondas de los electrones incidentes cuando son transmitidos a través de la estructura cristalográfica de la muestra. Lamentablemente no se puede medir la fase de onda pero sí la modulación resultante de esta interferencia causada por los electrones, ya que lleva información acerca de la muestra y puede generar un contraste en la imagen. La resolución del microscopio alcanza valores de 0,2 nm.<sup>64</sup>

Los datos que proporciona la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (en inglés, High-resolution transmission electron microscopy, o HRTEM HRTEM) son complementarios a los datos de difracción de electrones, brindando información cristalográfica de una muestra a escala atómica. Mediante esta técnica se puede obtener información cualitativa acerca del ordenamiento y la estructura atómica de la muestra, lo que resulta muy útil para el estudio de nanoestructuras.<sup>61-64</sup>

### c) Potencial Z

El potencial zeta es una medida utilizada frecuentemente en la química coloidal. Esta nos indica el potencial necesario para poder penetrar la capa iónica que se encuentra alrededor de una partícula, con la finalidad de desestabilizarla. Así, podemos decir, que el potencial zeta es considerado una potencia electrostática que hay entre las capas que se encuentran situadas en torno a la partícula.<sup>65-67</sup> (Fig. 9)

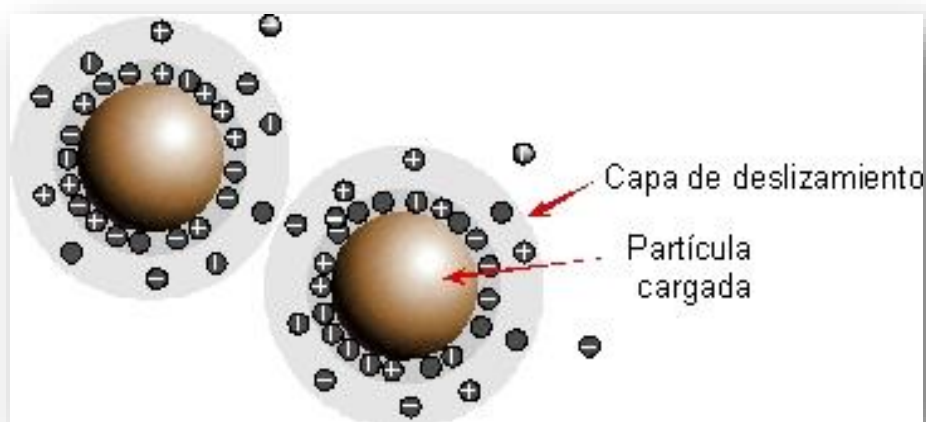


Fig. 9 Diferencia de potencial eléctrico existente entre el plano de cizallamiento y el centro de la solución  
Fuente: <http://www.iesmat.com/tecnologias-potencialz.htm>

El potencial zeta, se expresa bajo la letra  $\zeta$ , se utiliza también, en la electroforesis, que se encarga de medir el movimiento que realizan las partículas en un coloide, cuando se encuentran bajo la influencia de un campo magnético bajo.<sup>65</sup>

En el modelo de doble capa, se conoce como potencial zeta, al punto donde se unen las dos capas, la capa difusa y la capa Stern. Debido a que en dicho modelo no podemos medir la carga superficial, ni tampoco el potencial, utilizamos el potencial zeta como medio útil y efectivo de medida para controlar al coloide en cuestión, pues consigue indicar los posibles cambios que se producen en el potencial de la superficie, así como en las fuerzas de repulsión existente entre los coloides.<sup>65,68</sup>

Existe una relación destacable entre el potencial zeta y el potencial de superficie, que depende de la cantidad de iones presentes en la solución. Así, por ejemplo, en el caso del agua, la doble capa provoca que el potencial zeta tenga una aproximación aceptable del potencial de superficie.

La capa Stern, en el modelo de la doble capa, hace referencia a la atracción que sufre el coloide negativo de la solución, la cual inicialmente provoca que algunos iones positivos se dispongan conformando una capa rígida, la cual se sitúa rodeando la superficie del coloide. Dicha capa rígida es lo que conocemos como capa Stern.<sup>66-69</sup>

El modelo de doble capa se utiliza frecuentemente, para visualizar el entorno o atmósfera iónica que se encuentra en las proximidades de un coloide cargado, además de explicar el funcionamiento de las fuerzas de repulsión eléctricas. El modelo de doble capa se entiende como una serie de etapas que tienen lugar en torno al coloide negativo, cuando los iones que se encuentran neutralizando las cargas, son separados improvisadamente.<sup>68</sup>

Hay iones positivos que se encuentran atraídos por el coloide negativo, pero que a la vez son rechazados por la capa Stern, al mismo tiempo que otros iones con igual carga, intenta acercarse al nombrado coloide, hecho que crea un cierto equilibrio dinámico. Este equilibrio existe como resultado de la formación de una capa, conocida como difusa, de contraiones (iones que acompañan a los iones con la

finalidad de mantener la neutralidad en sus cargas), los cuales tienen una presencia alta en la superficie, concentración que va disminuyendo a medida que se agranda la distancia, hasta conseguir de nuevo un equilibrio.<sup>65-69</sup>

### **3.5 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar**

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Estas pruebas se realizan sobre la superficie de una placa de agar Müller-Hinton (medio de cultivo rico, diseñado especialmente para hacer ensayos de sensibilidad) donde se inocula una cantidad estandarizada de bacterias, sembrándolas de forma uniforme para obtener después de la inoculación un "césped" bacteriano. A continuación se colocan discos de papel de filtro impregnados con concentraciones conocidas de los diferentes antibióticos.<sup>70</sup>

La elección de los antibióticos a probar depende del germen y del foco de infección. El antibiótico se difundirá desde el papel filtro al agar de forma radial. La placa durante 18-24 horas a 37 °C (respetar este parámetro, porque temperaturas menores pueden disminuir la velocidad de crecimiento del germen y la difusión del antibiótico, dando formando irregulares difíciles de medir), y luego se miden los halos de inhibición de desarrollo, interpretándose de acuerdo a tablas confeccionadas previamente.<sup>70-72</sup>

## 1. Planteamiento del problema

Los microorganismos son los principales agentes etiológicos de las enfermedades pulpares y periapicales. La persistencia de bacterias en el sistema de conductos y su influencia en el resultado del tratamiento tienen un papel importante en la permanencia de periodontitis apical después del tratamiento endodóntico. Estas bacterias, presentes al momento de la obturación radicular, pueden sobrevivir en el conducto tratado, induciendo la inflamación del tejido periapical.<sup>1</sup>

Durante varios años se han empleado diferentes materiales para la obturación endodóntica. La gutapercha es uno de los más utilizados durante más de un siglo, a pesar de poseer óxido de zinc en sus componentes, no presenta propiedades antibacterianas.<sup>2</sup> Si bien, la destrucción de los patógenos microbianos son la clave del éxito en endodoncia, los materiales de obturación deben tener idealmente un efecto antibacteriano adecuado.

En los últimos años, la plata ha generado mucho interés debido a su buena conductividad, estabilidad química, actividad catalítica y antibacteriana. Las nanopartículas de plata (NPsAg) se han catalogado dentro de los productos de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología.

Por lo tanto, la incorporación de nanopartículas bactericidas, como las NPsAg a la gutapercha, podrían disminuir la cantidad de bacterias localizadas en los conductos radiculares, prevenir la recolonización bacteriana, recontaminación de conductos, así como evitar el crecimiento de bacterias residuales.

De lo anterior surge la siguiente pregunta de investigación: ¿La biosíntesis de nanopartículas de plata con *syzygium aromaticum* en gutapercha endodóntica, tiene propiedades antibacterianas sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y antifúngicas contra *Candida albicans*?

## 2. Justificación

El éxito de la terapia endodóntica depende, en primer término, de la limpieza y conformación del sistema de conductos radiculares, y esto se lleva a cabo mediante el procedimiento conocido como preparación biomecánica.

La obturación hermética del conducto, preparado y seco, con un material biocompatible, bien tolerado por los tejidos perirradiculares y con un efecto antimicrobiano importante, es imprescindible para evitar que reaparezcan irritantes, metabolitos, microorganismos y demás factores que puedan alterar los tejidos periapicales induciendo una recidiva de la lesión. Conseguir esto no es fácil, debido a la gran complejidad del sistema de conductos: presencia de curvaturas, ramificaciones y deltas apicales.<sup>1</sup>

Los microorganismos remanentes después del tratamiento endodóntico o por recolonización del conducto obturado, son la principal causa de fracasos endodóntico.<sup>21</sup>

Por otro lado, la plata ha sido utilizada desde la antigüedad para combatir infecciones, debido a sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales. Las nanopartículas de plata también se han utilizado en forma de apósitos para heridas, recubrimientos para dispositivos médicos, textiles, etc. En consecuencia, el área endodóntica puede beneficiarse de este campo de la investigación.

La aplicación de agentes bacteriostáticos a la gutapercha, como son las nanopartículas de plata, podría ayudar a evitar el fracaso endodóntico debido a bacterias residuales en los conductos radiculares y con ello mejorar el pronóstico del tratamiento.

### 3. Hipótesis

Hipótesis de trabajo: La biosíntesis de nanopartículas de plata con *Syzygium aromaticum* en gutapercha endodóntica, tiene propiedades antimicrobianas sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y antifúngicas contra *Candida albicans*.

Hipótesis nula: La biosíntesis de nanopartículas de plata con *Syzygium aromaticum* en gutapercha endodóntica, no tiene propiedades antimicrobianas sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y antifúngicas contra *Candida albicans*.

## 4. Objetivos

### Objetivo General:

Determinar las propiedades antimicrobianas de la biosíntesis de nanopartículas de plata con *Syzygium aromaticum* en gutapercha endodóntica, sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y antifúngicas contra *Candida albicans*.

### Objetivos específicos.

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata empleando diferentes agentes reductores.
- Ajustar tiempos de inmersión y reducción que mejoren la saturación de plata de en gutapercha endodóntica.
- Evaluar la cantidad impregnada de nanopartículas de plata en la superficie de la gutapercha endodóntica mediante el análisis elemental con microscopio electrónico de barrido.
- Establecer la actividad antimicrobiana de la gutapercha en medios de cultivo específicos para *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y antifúngicas contra *Candida albicans*.

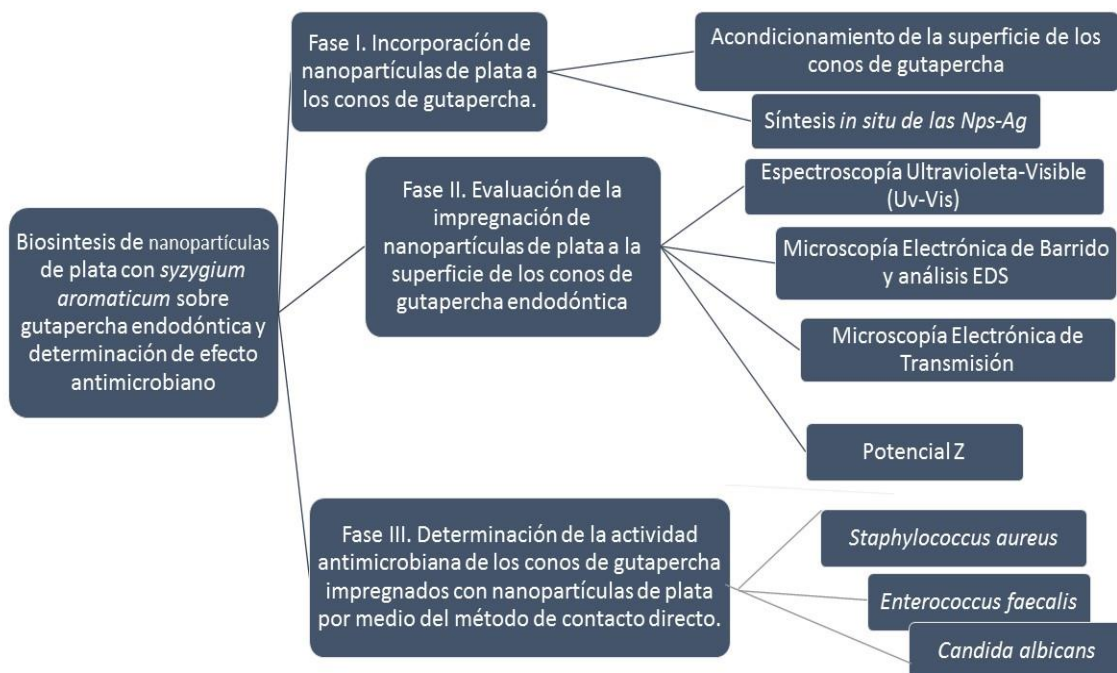


## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Diseño de estudio

Fue un estudio experimental, se realizó un muestreo por conveniencia.

A continuación se muestra un esquema para visualizar cómo se realizó la metodología de la presente investigación.



## 6.2 Operacionalización de las variables

Tabla 1. Definición conceptual y operacionalización de las variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
<b>DEPENDIENTE</b>				
<b>Efecto de las antimicrobiano de nanopartículas de plata sobre <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Enterococcus faecalis</i> y antifúngicas contra <i>Candida albicans</i>.</b>	Mecanismo de acción de las nanopartículas de plata, las cuales ejercen un efecto antimicrobiano sobre Gram positivos y Gram negativos, produciendo lisis en los péptidos de la membrana de los microorganismos	Medición de los milímetros que abarca la zona de inhibición en las cajas Petri producidas por las nanopartículas de plata	Cuantitativa, continua.	Razón.
<b>INDEPENDIENTE</b>				
<b>Conos de gutapercha.</b>	Materiales de obturación endodóntico semisólido	Puntas de gutapercha	No aplica	No aplica

## 6.3 Equipo y materiales.

- Balanza analítica (Explorer Pro Model EP213C, OHAUS Co)
- Parrillas electromagnéticas. (Thermo Scientific Cimarec)
- Sonicador (Branson Ultrasonic Cleaner 2510)
- Sales de nitrato de plata  $AgNO_3$  (Silver nitrate - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU)
- Hidróxido de sodio NaOH (Silver nitrate - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU)
- 1 gr de clavo molido (Terana, Especies selectas, Ciudad de México, México)
- Matraz aforado de 100 mL
- Loquetas de papel
- Espátulas metálicas y de teflón
- Agua bidestilada
- Alcohol etílico

- Alcohol isopropílico
- Vaso de precipitado
- Matraz Kitazato
- Papel filtro Whatman No. 5
- Pipetas de 10mL
- Perilla
- Tubos de diluciones de 10mL
- Conos de gutapercha endodóntica (ProTaper, Dentsply, Maillefer, Suiza)
- Espectrofotómetro (CARY 5000 Conc UV-Vis spectrophotometer, Varian, Inc., Palo Alto, California)
- Microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6510LV at 20 kV, Tokyo, Japan)
- Microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-2100 microscope, Tokyo, Japan)
- Zetasizer 2000 (Malvern Instruments Ltd®, Worcestershire, UK)
- Celdas de cuarzo (Precision Cells Hellma® 2-100-0S 10mm)
- Guantes
- Cubrebocas
- Jeringas desechables de 2mL BD (Becton Dickinson®, Ciudad de México, México)
- Cinta Cobre Conductor 3M® (Minnesota Mining and Manufacturing Co.)
- Cabina de flujo laminar
- Cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* proporcionadas por el laboratorio de microbiología de la UNAM
- Agar dextrosa sabouraud, BD-Difco® (Dublín, Irlanda)
- Agar eosin azul de metileno, BD-Difco® (Dublín, Irlanda)
- Agar sal y manitol, BD-Difco® (Dublín, Irlanda)
- Agar cerebro-corazón infusión BD-Difco® (Dublín, Irlanda)
- Agar Muller Hinton, BD-Difco® (Dublín, Irlanda)
- Matraz 500mL

- Cajas de Petri; cristal 10 cm
- Tubos estériles y tubos de centrifuga
- Asas de platino
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Hisopos estériles 3M® (Minnesota Mining and Manufacturing Co.)
- Bolsas de esterilización
- Pinzas de curación
- Espátulas
- Gradillas
- Algodón
- Cinta termolábil (para verificar esterilización)
- Pinzas portatubos
- Papel de aluminio
- Mechero Bunsen
- Cerillos
- Discos de papel filtro estériles
  
- Micropipeta 1 -10µl (Boeco®, Germany)

### **Fase I. Incorporación de nanopartículas de plata a los conos de gutapercha.**

Se prepararon 10 gr de hidróxido de sodio con 100 ml de agua deionizada y 0.1698 gr de nitrato de plata a una concentración de  $10^{-2}$  como se describe en la figura 10. Posteriormente se elaboró el extracto de *Syzygium aromaticum* (clavo), incorporando 1mg de clavo molido a 100 ml de agua en ebullición durante cinco minutos. Se dejó enfriar y por último se filtró en un matraz kitasato con papel filtro Whatman no. 5. (Fig.11)

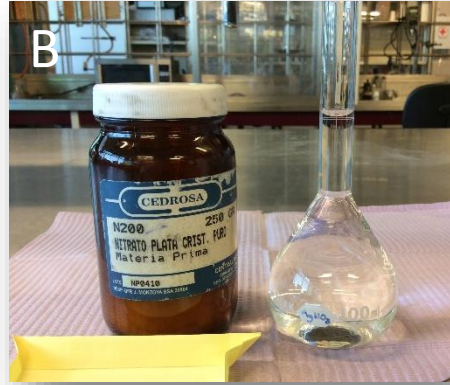
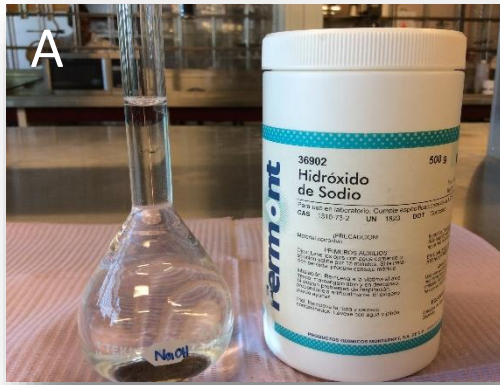


Fig.10 Preparación de: A) Hidróxido de sodio, B) Nitrato de plata.  
Fuente: directa.

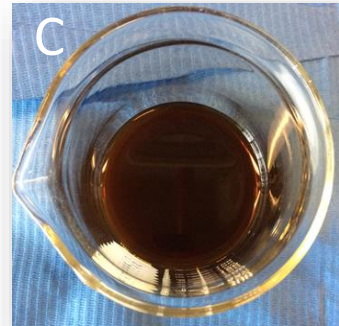
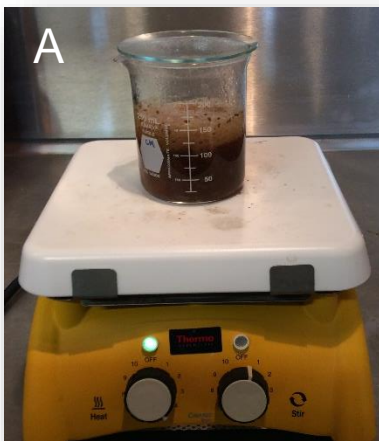


Fig.11 Elaboración de extracto de clavo: A) Ebullición por 5 minutos de clavo molido en 100mL de agua, B) Filtración, C) Extracto.  
Fuente: directa.

Una vez concluido el ciclo de sonicado se eliminó el NaOH del tubo y enjuagó cada uno de los conos de gutapercha 3 veces con agua deionizada (Fig.12). Se agregaron 8 ml de  $\text{AgNO}_3$  a cada vial y 2 ml de extracto de clavo, dejando que se llevara a cabo el proceso de bioreducción por 6 horas.



Fig.12 A) Alcohol isopropílico, B) Sonicado, C) Hidróxido de sodio, D) Sonicado.  
Fuente: directa.

Se dejaron secar los conos de gutapercha a temperatura ambiens

## **Fase II. Evaluación de la impregnación de nanopartículas de plata a la superficie de los conos de gutapercha endodóntica.**

### a) Espectroscopía Ultravioleta-Visible (Uv-Vis)

La cinética de formación de las Nps-Ag, se determinó a través de un análisis de espectrofotometría de luz ultravioleta-visible (Uv-Vis), que consistió en hacer pasar un haz de luz a través de la celda de cuarzo cada cinco minutos durante seis horas, en la que se encontraban contenidas las soluciones con Nps-Ag observándose la formación del plasmón (punto máximo).

#### b) Microscopía Electrónica de Barrido y análisis EDS

La distribución y análisis elemental tanto de los conos de gutapercha impregnados como de la solución con Nps-Ag se evaluaron mediante microscopio electrónico de barrido. Se colocó una gota de la suspensión sobre la cinta, dejándose secar a temperatura ambiente. Se adhirió una muestra de los conos de gutapercha impregnados a cinta conductora revestida de carbono y se observó al microscopio. Al mismo tiempo, se desarrolló el análisis de dispersión de energía de rayos X (EDS).

#### c) Microscopía Electrónica de Transmisión

El tamaño y forma se identificó por microscopía electrónica de transmisión, colocando una gota de la suspensión en una rejilla de cobre revestida con una película de carbono y dejándola secar a temperatura ambiente.

#### d) Potencial Z

La muestra se preparó inyectando aproximadamente 2 ml de solución en la célula. El voltaje aplicado para conducir los electrodos de la célula fue de 150V.

Ambas etapas fueron realizadas en el Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable (CCIQS) de la UAEM-UNAM. (Fig.13)



Fig.13 A) Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable, B) Laboratorio de nanotecnología  
Fuente: directa.

### **Fase III. Determinación de la actividad antimicrobiana de los conos de gutapercha impregnados con nanopartículas de plata por medio del método de contacto directo.**

Las cepas gram positivo (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*), gram negativo (*Escherichia coli*), y levadura (*Candida albicans*) fueron proporcionadas por el Laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

A cada microorganismo se le realizaron pruebas de tinción gram y siembras en agares selectivos para confirmarlas.

Las pruebas sobre actividad antimicrobiana se llevaron a cabo según lo prescrito por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio.<sup>71,72</sup>

Las propiedades antibacterianas de la solución de nanopartículas de plata y clavo, se midieron mediante el método de difusión sobre *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

Los inóculos se prepararon diluyendo las colonias con NaCl al 0,9% a 0.5 según la escala de McFarland; se aplicaron a las placas de agar Muller Hinton usando hisopos de algodón estériles. Se colocaron cinco discos impregnados con Nps-Ag cada caja; disco uno, 24 horas después de la síntesis, disco dos 7 días después de la síntesis, disco tres 14 días después de la síntesis y disco cuatro 21 días, y un disco impregnado con extracto de clavo como control positivo. (Fig. 14)



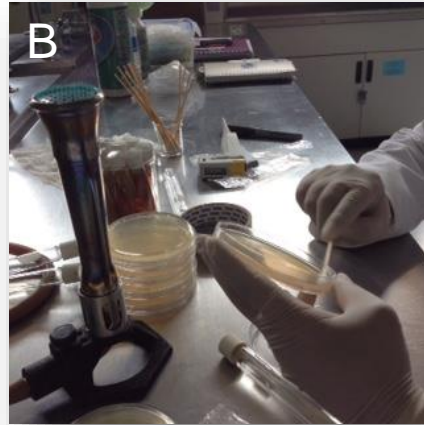
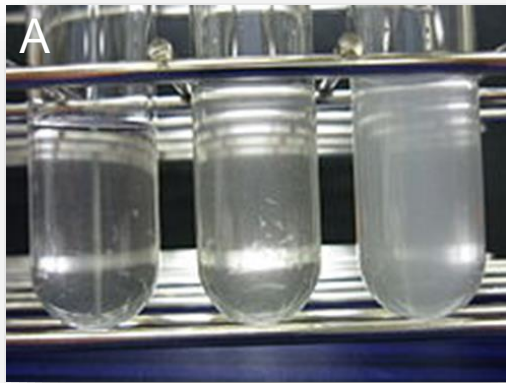


Fig.14 Determinación de actividad antimicrobiana: A) Escala 0.05 McFarland, B) Siembra con hisopos estériles  
Fuente: directa.

Para los conos de gutapercha, se llevó a cabo el mismo procedimiento sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, colocándose tres puntas en cada caja, dos con Nps y una control, un disco impregnado con nanopartículas de plata y un control positivo con solución fisiológica estéril.

Después de 24 y 48 horas de incubación a 37°C, la susceptibilidad microbiana fue determinada por las zonas de inhibición. Los ensayos se realizaron por triplicado.<sup>71</sup> (Fig. 15)

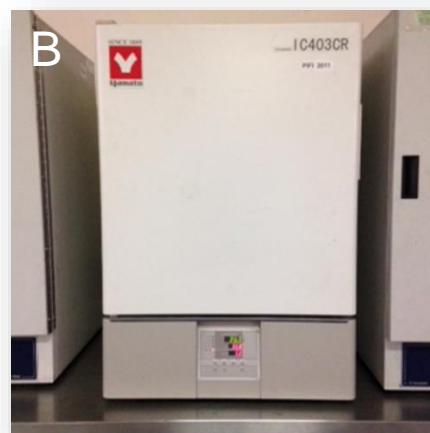
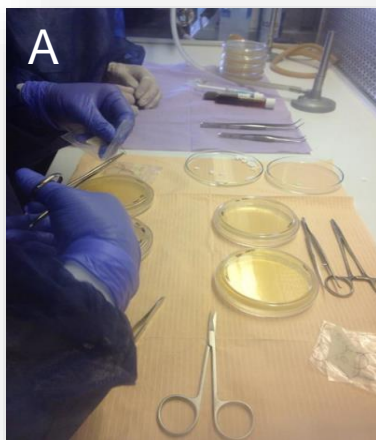


Fig.15 Determinación de actividad antimicrobiana: A) Colocación de muestra, B) Incubación  
Fuente: directa

## **Consideraciones éticas**

De acuerdo a los principios de la declaración De Helsinki de la Asociación Médica Mundial (en su 48° Asamblea general de Octubre del 2000) y vertidos en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación, capítulo II: De la investigación farmacéutica, artículo 65: actividades científicas tendientes al estudio de medicamentos y productos biológicos para uso en humanos, respecto de los cuales no se tenga experiencia previa en el país, que no hayan sido registrados por la Secretaría y, por lo tanto, no sean distribuidos en forma comercial, así como los medicamentos registrados y aprobados para su venta, cuando se investigue su caso con modalidades, indicaciones, dosis o vías de administración diferentes de las establecidas, incluyendo en empleo en combinaciones. Título cuarto: de la Bioseguridad de las Investigaciones, capítulo I: De la Investigación con Microorganismos Patógenos o Material Biológico que pueda Contenerlos, en su artículo 75: instalaciones, equipo, adiestramiento, manual de procedimientos, vigilancia del área para el manejo de microorganismos patógenos; artículo 76: laboratorio de microbiología y artículo 77: seguridad del personal, disposiciones de desechos, manejo y mantenimiento de instalaciones; artículo 79 y 80: grupo de riesgo II con riesgo moderado para el individuo y limitado para la comunidad, laboratorio básico de microbiología.

## 7. Resultados

### 7.1 Acuse de envío

---

Elsevier Editorial System(tm) for  
Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Green synthesis and antibacterial effects of silver nanoparticles in microorganisms presents in oral cavity using *Syzygium aromaticum*

Article Type: Original Article

Keywords: Keywords: Biosynthesis, silver nanoparticles, *Syzygium aromaticum*, oral microorganisms

Corresponding Author: Dr. RAUL ALBERTO MORALES LUCKIE, Dr.

Corresponding Author's Institution: UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO

First Author: Erika A Jardón-Romeroa, DDS, Endodontic Specialist

Order of Authors: Erika A Jardón-Romeroa, DDS, Endodontic Specialist; Edith Lara-Carrillo, DDS, MDSc., Ph.D; RAUL ALBERTO MORALES LUCKIE, Dr.; Sarai López-González, DDS, MDSc; Silvia C Manzúr-Quiroga, DDS, MDSc., Ph.D; Carlo E Medina-Solis, DDS, MDSc

Abstract: *Syzygium aromaticum* (clove) has been used as a dental analgesic, an anesthetic, and a reducing and capping element in the formation of metallic nanoparticles. The main objective of this study was to evaluate the antimicrobial effect of the biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) with aqueous extract of clove in oral microorganisms. This procedure was characterized by UV-visible SEM, TEM and Z Potential, while its antimicrobial effect was corroborated against oral microorganisms such as those that were gram-positive and gram-negative, as well as yeast that is commonly present in the oral cavity. The AgNPs showed absorption peaks at 400 and 500 nm in the UV-vis spectrum, had an average size of 4-16 nm as observed by the HRTEM. The antimicrobial susceptibility test showed inhibition zones of 2-4 mm in diameter. Our results suggest that AgNPs synthesized with clove can be used as effective growth inhibitors in several oral microorganisms.

## 7.2 Artículo enviado

### **Green synthesis and antibacterial effects of silver nanoparticles in microorganisms presents in oral cavity using *Syzygium aromaticum***

Erika Alejandra Jardón-Romero, Edith Lara-Carrillo, Raúl A. Morales-Luckie\*, Saraí López-González, Carlo Eduardo Medina-Solis, Silvia Cristina Manzúr- Quiroga.

Erika Alejandra Jardón-Romero<sup>a</sup> DDS, Endodontic Specialist. Autonomous University of State of Mexico (UAEMex), Center for Research and Advanced Studies in Dentistry. Paseo Tollocan esquina con Jesús Carranza Colonia Universidad, ZC 50130, Toluca, State of Mexico. México.  
erika\_abisma@hotmail.com

Edith Lara-Carrillo<sup>b</sup> DDS, MDSc., Ph.D. Autonomous University of State of Mexico (UAEMex), Center for Research and Advanced Studies in Dentistry. Paseo Tollocan esquina con Jesús Carranza Colonia Universidad, ZC 50130, Toluca, State of Mexico. México. laracaedith@hotmail.com

Raúl A. Morales-Luckie<sup>c</sup> Ch., Ph.D. Department of Material Science, Join Center Research in Sustentable Chemistry (CCIQS), Autonomous University State of Mexico (UAEMex), KM 14.5, Carr. Toluca-Atlacomulco, ZC 50200, Toluca, State of Mexico. México. ramluckie@gmail.com

Saraí López-González<sup>d</sup> DDS, MDSc. Autonomous University of State of Mexico (UAEMex), Center for Research and Advanced Studies in Dentistry. Paseo Tollocan esquina con Jesús Carranza Colonia Universidad, ZC 50130, Toluca, State of Mexico. México. sarailogo@hotmail.com

Carlo Eduardo Medina-Solis<sup>e</sup> DDS, MDSc. Academic Area of Dentistry, Institute of Health Science. Autonomous University State of Hidalgo. Carr.

Pachuca-Actopan km. 4.5. Colonia Campo de Tiro; ZC. 43039. México.  
cemedinas@yahoo.com

Silvia Cristina Manzúr-Quirogaf DDS, MDSc., Ph.D. Autonomous University of State of Mexico (UAEMex), School of Dentistry. Paseo Tollocan esquina con Jesús Carranza Colonia Universidad, ZC 50130, Toluca, State of Mexico. México. manzqui@hotmail.com

Corresponding author: Raúl Alberto Morales-Luckie

Phone number: +52 2722 2 76 66 10

E-mail address: ramluckie@gmail.com

Address: Department of Material Science, Join Center Research in Sustentable Chemistry (CCIQS), Autonomous University State of Mexico (UAEMex), KM 14.5, Carr. Toluca-Atlacomulco, ZC 50200, Toluca, State of Mexico. México.

Abstract words: 150

Body words: 3112

Number of figures: 5

Number of references: 59

Special thanks to the National Council of Science and Technology (CONACYT)

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## **Abstract**

*Syzygium aromaticum* (clove) has been used as a dental analgesic, an anesthetic, and a reducing and capping element in the formation of metallic nanoparticles. The main objective of this study was to evaluate the antimicrobial effect of the biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) with aqueous extract of clove in oral microorganisms. This procedure was characterized by UV-visible SEM (Scanning Electron Microscopy-EDS), TEM (Transmission Electron Microscopy), and Z Potential, while its antimicrobial effect was corroborated against oral microorganisms such as those that were gram-positive and gram-negative, as well as yeast that is commonly present in the oral cavity. The AgNPs showed absorption peaks at 400 and 500 nm in the UV-vis spectrum, had an average size of 4-16 nm as observed by the HRTEM, and were of a crystalline nature and quasi-spherical form. The antimicrobial susceptibility test showed inhibition zones of 2-4 mm in diameter. Our results suggest that AgNPs synthesized with clove can be used as effective growth inhibitors in several oral microorganisms.

**Keywords:** Biosynthesis, silver nanoparticles, *Syzygium aromaticum*, oral microorganisms

## **Background**

The ideal properties of an antibacterial coating include prolonged activity, high levels of bactericidal and bacteriostatic activity, ability to act against a wide spectrum of bacteria, biocompatibility, and low in vivo toxicity.<sup>1-5</sup>

Historically, silver compounds and ions have been extensively used for hygienic and healing purposes. However, over time, their application as an anti-infection agent has dwindled due to the advent of antibiotics and other disinfectants.<sup>3-6</sup> Recently, there has been renewed interest in manufactured silver nanomaterials, thanks to their unusually strong physicochemical and biological properties activities compared to their bulk parent materials.<sup>1-3</sup> They are now deployed in a wide range

of consumer products, ranging from disinfecting medical devices and home appliances to water treatment systems.<sup>7-9</sup>

Depending on the technique used, their synthesis can be divided into: chemical methods involving the reduction or precipitation of metals in the presence of stabilizing agents; physical methods such as thermolysis, photochemical, and sonochemistry; and finally, biological methods.<sup>10-16</sup>

The method of AgNP preparation involves the reduction of silver ions in solution or at high temperatures in gaseous environments. However, the reducing agents used, such as sodium borohydride, hydrazine, and hypophosphite, may increase the environmental toxicity or biological hazards. In addition, capping agents, such as polyvinyl alcohol, must be used to prevent the AgNPs from aggregating. Another issue is that the high temperature may also increase the production cost.<sup>3,7,10,17</sup>

Fortunately, the biological synthesis of nanoparticles (NPs), also known as “green synthesis,” has allowed the formation of metallic nanostructures from the use of bacteria, fungi, plants, or their extracts, meaning that this approach to synthesis is a non-toxic and environmentally friendly alternative. Sometimes, the deployment of this synthesis equals or exceeds the expectations of NPs synthesized by physical and chemical methods, in terms of cost and characteristics.<sup>17-23</sup>

Green extracts contain molecules that carry hydroxyl radicals in their functional groups, mainly of the phenolic type, which can be used for the reduction and formation of stable complexes with metallic NPs.<sup>1</sup>

The AgNPs show efficient antimicrobial properties compared to other metallic NPs, due to their large surface area, which provides better contact with microorganisms and has the ability to anchor to and subsequently penetrate the bacterial cell wall, consequently causing structural changes and cell death.<sup>2</sup>

The formation of free radicals by the AgNPs may be considered another mechanism by which cells die. Diverse studies in which electron spin resonance

spectroscopy was used suggest that free radicals form when the NPs come into contact with the bacteria; these radicals are able to damage the cell membrane, rendering it porous, which can ultimately lead to death.<sup>5,6,19</sup>

It is also true that the interaction of the AgNPs with the sulfur and phosphorus major components of DNA can lead to problems in the DNA's replication of bacteria.<sup>2</sup>

That said, when it comes to microbial flora, the oral cavity is one of the most densely populated sites of the human body. Over 700 bacterial species or phylotypes have been detected in this location, of which more than half have not been cultivated.<sup>23</sup> This means that microorganisms of the oral community should display extensive interactions when forming biofilm structures, carrying out physiological functions, and inducing pathogenesis.<sup>23-25</sup>

Silver compounds and NPs have already been used as dental restorative material, endodontic retrofill cements, dental implants, and caries inhibitory solutions. Despite the effectiveness shown by AgNPs in dental practice, controversy remains over their toxicity in biological and ecological systems.<sup>26</sup>

The *Syzygium aromaticum* (clove) is employed in medicine Indian ayurvedic, Chinese medicine, and western herbalism, while in dentistry, its essential oil is used as an anodyne (painkiller) for emergencies. Clove oil is a pale yellow liquid with a characteristic odor and taste. It consists of 81-95% phenols (eugenol with about 3% of acetyl eugenol), sesquiterpenes (a- and b-calyophyllenes), and small quantities of esters, alcohols, and ketones.<sup>17-33</sup>

The high level of eugenol present in clove oil endows it with intense biological and antimicrobial activity, which is why it was explored here as a stabilizing and reducing agent in the synthesis of AgNps.

For the same reason, it is important to develop dental materials with antibacterial activity and superior mechanical properties, which could be manufactured and employed in future clinical applications.<sup>34,35</sup>



The aim of this study was to eliminate toxic chemicals in the obtention of AgNPs from aqueous extracts of *Syzygium aromaticum* (clove) as a reducing and capping agent, taking advantage of its antimicrobial properties and synergy with dental applications that have seen it previously studied as an analgesic and anesthetic. The green-synthesized silver nanoparticles in the *Syzygium aromaticum* extracts were examined by ultraviolet-visible spectrometer (UV-vis), scanning electron microscopy (SEM-EDS), transmission electron microscopy (HR-TEM) and Z potential. Their antibacterial activity against gram-positive and gram-negative microorganisms and yeast were tested by the disc-diffusion method, before the results were finally compared with extract of clove as positive control.

## Methods

### 1.1 Synthesis of NPs

In this experimental study, the salt used was silver nitrate  $\text{AgNO}_3$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU). The silver nanoparticles were directly synthesized with the *Syzygium aromaticum* (Terana, Especies selectas, Ciudad de México, México) extract using a simple green synthesis procedure. Initially, various concentrations were tested until the optimum conditions were established.

A solution consisting of deionized water and 10 mm of salt concentration was prepared; then, 1 gr of minced *Syzygium aromaticum* was incorporated into 100 ml of boiling deionized water for five minutes. The mixture was allowed to cool before being filtered in a vacuum flask using a Buchner funnel and Whatman filter paper no. 5. The extract was mixed at room temperature with varying silver nitrate and bio-reductor proportions; the optimum synthesis conditions were determined by maintaining the concentration of salt at 10 mm.

The resultant mixture was kept undisturbed in a dark place. After a couple of hours, the color of the solution changed due to the formation of silver nanoparticles. Finally, to attain the best concentration, it was placed in a tube with silver nitrate and a reducing agent at a ratio of 3:1. The process of biosynthesis was carried out

under ambient environmental conditions (that is, at room temperature and under atmospheric pressure); the reaction was completed within a few minutes.

## 1.2 Characterization

### **Ultraviolet-Visible Spectroscopy (UV-VIS)**

The UV-Vis analysis was performed using a spectrophotometer (CARY 5000 Conc UV-Vis spectrophotometer, Varian, Inc., Palo Alto, California), which was operated at a resolution of 1nm at room temperature. The spectral range was 300-800 nm. In this way, the kinetics of the reduction were followed until stable NPs were obtained.

### **Scanning Electron Microscopy-EDS (SEM-EDS)**

The final product was sonicated for 30 minutes to break up larger nanoparticle agglomerates; then, the particles were dried in a vacuum at room temperature (20 °C) prior to analysis. The NPs were attached to aluminum stubs with conductive tape, coated with carbon, and observed under SEM (JEOL, JSM-6510LV at 20 kV, Tokyo, Japan) with secondary electrons at  $\times 100$ ,  $\times 500$ , and  $\times 3,000$  magnification that was operating at 20 kV. Energy-dispersive X-ray (EDS) analysis was developed.

### **Transmission Electron Microscopy (TEM)**

TEM was obtained via a JEOL JEM-2100 microscope (Tokyo, Japan). Samples for the TEM examination were prepared by placing a drop of the simple suspension on a copper grid (300 mesh) coated with carbon film, and allowing it to dry under ambient conditions.

### **Z Potential**

Zeta potential measurements were determined using the Zetasizer 2000 (Malvem Instruments Ltd, Worcestershire, UK). The voltage applied to drive the electrodes of the cell was 150V capillary electrophoresis. The sample was prepared by injecting approximately 2 ml solution into the cell.

### 1.3 Antimicrobial activity

The bacterial strains used in this study were obtained from the stock culture collection of the Biochemistry laboratory at the School of Dentistry within the National Autonomous University of Mexico (UNAM). The strains were originally collected from central Mexico; each one was characterized via a battery of cultural and biochemical tests. They included gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*) and gram-negative microorganisms (*Escherichia coli*), and yeast (*Candida albicans*), which is commonly present in the oral cavity.

The experiments into antimicrobial activity were carried out as proscribed by the Clinical and Laboratory Standards Institute.<sup>36</sup>

The nanoparticles' antibacterial properties were measured by the Kirby-Bauer disc diffusion method against the gram-positive and gram-negative microorganisms and yeast.<sup>37</sup> The inocula were prepared by diluting the colonies with 0.9% of NaCl to 0.5 according to the McFarland scale, before they were applied to Muller Hinton agar plates using sterile cotton swabs. The sterile paper discs were saturated with 10  $\mu$ L of AgNPs that had been prepared 24 hours previously. In addition, three tubes with AgNPS that had been prepared 7, 14, and 21 days before the antimicrobial tests were used to saturate the paper discs and placed on agar plates. The disc impregnated with extract of clove was used as a positive control. After 24 and 48 hours of incubation at 37 °C, the microbial susceptibility was determined by the zones of inhibition. The assays were performed in triplicate.<sup>38</sup>

The research protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of the Center for Research and Advanced Studies in Dentistry.

## **Results**

### ***Synthesis of Silver Nanoparticles***

The reduction of silver ions and formation of silver nanoparticles occurred after the silver nitrate solution had been mixed with the clove extract, immediately followed by the change of color of the suspension.

This process was carried out under ambient environmental conditions. It is to be noted that no stabilizing and capping agent was used.

### ***Optical Observation***

The reduction of Ag ions to Ag metallic nanoparticles was corroborated by the starting materials changing color from colorless to brown. This observation was confirmed by (UV-vis) and TEM.

### ***UV-Vis Spectroscopy***

The spectra were recorded when both the color and absorption intensity of the colloidal samples remained constant, as is evidenced in Figure 1. Each SPR's (surface plasmon resonance) position was located in the range of 431-447 nm. In addition, no surface plasmon resonance was observed at more than 500 nm, indicating that most of the AgNPs obtained were of small size and similar shape. As time goes on, NPs become more stable and increase in size

### ***SEM and EDS Analysis***

The characterization technique was consistent with the EDS analysis of elemental chemical mapping. Metallic silver nanoparticles generally showed absorption peaks at approximately 3keV (see Figure 2).

## **TEM**

TEM was employed to characterize the size, shape, and morphology of the synthesized AgNPs, which were seen to be nearly spherical and ranging in size from 4-16 nm, with a standard deviation of 4.27 nm (see Figure 3).

## **Z Potential**

The electrostatic stabilization of the AgNPs was estimated by measuring their zeta potential values, which were found to be in the range of -15.7 to -16.2mV.

## **Antimicrobial Susceptibility Test**

The clove extracts with silver nanoparticles were tested for antimicrobial activities against gram-positive and gram-negative microorganisms and yeast, presenting similar inhibition zones in all cultivars. The inhibition zones produced by the silver nanoparticles displayed halos of 2-4 mm in diameter.

The control group (clove extract) did not show any antimicrobial effect (see Figure 4).

## **Discussion**

Clove (*Syzygium aromaticum*), one of the most valuable of all spices, has been used for centuries as a food preservative and for medicinal purposes, as an analgesic and antispasmodic, with eugenol being the main compound responsible for this activity.<sup>39</sup> This plant represents one of the richest sources of phenolic compounds such as eugenol, eugenol acetate, and gallic acid (75-77%).<sup>39-42</sup>

Several authors<sup>39,41,43,44</sup> have studied the antimicrobial effects of clove extract. For example, Duhan<sup>42</sup> used various plant extracts with high concentration of eugenol, including *Syzygium aromaticum*, and compared them with 3% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*. Meanwhile, Mansourian<sup>45</sup> and Rana<sup>33</sup> used clove extract against *C. albicans* and compared it to nystatin. In both cases, good results were obtained.

The most probable pathway for AgNPs biosynthesis are the flavonoids from the clove buds, which possess good reductive capacity when they come into contact with Ag<sup>+</sup> ions. The electrons are transferred and the reduction process occurs, leading to the formation of AgNPs. It is well known that flavonoids also prevent agglomeration and stabilize the AgNPs in aqueous solution.<sup>13-16,46</sup> This makes a strong case for the involvement of flavonoids in rapid biosynthesis and for the stability of metallic nanoparticles in the aqueous medium.<sup>9,47</sup> Upon storage of the bio-functionalized AgNPs that were synthesized using macerated clove solution, it was observed that the colloidal solution maintained its stability and uniformity.

The biosynthesis reaction accelerated the kinetics formation, while the intensity of the solution's color increased rapidly. The process of biosynthesis in this study was carried out under ambient environmental conditions, with the total reaction being completed within a few minutes.

Qian Sun,<sup>48</sup> Deshpande<sup>49</sup>, and Bajpai<sup>40</sup> performed different studies to generate silver nanoparticles using a similar green synthesis approach, obtaining antibacterial properties such as those in our study under the same conditions. In addition, Jeevika<sup>50</sup> produced silver nanowires via biosynthesis using clove oil.

It is well known that AgNPs show a yellowish-brown color in aqueous solution; this color is a result of the excitation of surface plasmon vibrations in the metal nanoparticles.<sup>49,50</sup>

In the Uv-Vis spectroscopy, in the first 20 minutes of reduction, there was an incipient reduction in which the plasmon peak could already be observed. This may be attributed to the high disponibility of eugenol in the aqueous extract.

During the next six hours of reduction, the plasmon peak was clearly observed at 447 nm, indicating the formation of AgNPs. The plasmon displacement may be explained by the capping agent, as well as the interaction of the aqueous medium with the AgNPs.

After six hours of reduction, the maximum increase in the size of the nanoparticles was noted. Measurements were made approximately once every five minutes to verify the silver nanoparticles' kinetics formation. The formation of larger nanoparticles could be explained by the fact that Ag ions were reduced in the absence of any stabilizer.

It is highly important to point out that the appearance of the spectrum demonstrated extremely similar sizes and shapes between the nanoparticles, making our method distinct from other bio-reducers; this was corroborated by the TEM micrographs.

The EDS analysis of the AgNPs was confirmed for the Ag spectrum in the typical position, according to the reference.<sup>51,52</sup>

The particle size distribution histogram was determined using the TEM. The micrograph showed that the silver nanoparticles prepared using *Sizygium aromaticum* extract were poly-dispersed and almost spherical. Their size was in the range of 4-16 nm, with a standard deviation of 4.2 nm (see Figure 2A).

The HR-TEM image in Figure 3B shows Ag nanoparticles of 8-10 nm in diameter. This image possesses atomic resolution; therefore, several crystalline planes are distinguishable and the interplanar distances can be measured. The interplanar distances shown in the micrograph were measured from the Fourier transform (FFT) of these nanoparticles, wherein the corresponding crystalline planes were specified. The interplanar distances and their corresponding crystalline planes matched those of metallic Ag (FCC). The measured interplanar distance was 2.4 Å, which corresponded to the plane (111).

Generally, a suspension that exhibits an absolute zeta potential of 0-100 mV is ubiquitous on the threshold of agglomeration, and the stability of the particles from the solution will be increased with higher values of approximately -100mV.<sup>53,54</sup> In this study, the zeta potential of AgNPs was in the range of -15.7 and -16 mV,

corroborating the agglomeration and acceptable stability from the AgNPs' suspension.

The oral cavity is a complex ecosystem that is inhabited by more than 300 bacterial species. Some of these have been implicated in oral diseases such as caries and periodontitis, which are among the most common bacterial infections in humans.<sup>23,55</sup>

The bacteria colonize the teeth in a reasonably predictable sequence. The first or primary colonizers tend to be aerobic (especially *streptococci*, which constitute 47-85% of the cultivable cells found during the first four hours after professional tooth cleaning); as plaque oxygen levels fall, the proportions of gram-negative microorganisms tend to increase.<sup>56</sup>

The microorganisms selected in this study for microbiological tests are part of the normal and pathogenic microflora of the oral cavity. *Streptococcus mutans*, the main causal agent of tooth decay and periodontitis, is found in 70-90% of the population. *Staphylococcus aureus*, meanwhile, is found in patients with bacterial endocarditis and cellulite. *Enterococcus faecalis* is present in most failed root canal treatments. *Escherichia coli* has been isolated from salivary gland infections, while *Candida albicans* is found in one of every 1,000 patients attending dental consultation and stomatitis associated with the use of dental prostheses. Taken together, these bacteria are responsible for various opportunistic infections in immunocompromised patients.<sup>57,58</sup>

In this study, the antibacterial activity of AgNPs against four types of bacteria and one yeast was investigated. The inhibition zones were similar in all the cultivates. Biological tests of AgNPs against test strains showed that they have a significant effect on the growth of gram-positive and gram-negative bacteria. The latter have a layer of lipopolysaccharides at the exterior, while underneath lies a thin layer of peptidoglycan.<sup>59</sup>



Several studies indicate<sup>1-3,5,15,19,22</sup> the antibacterial activity of AgNPs by attachment to the bacterial cell wall, or the formation of free radicals. In addition, the silver ions released from AgNPs may play a vital role in the antibacterial activity, due to their interaction with the thiol groups of enzymes.

Although the lipopolysaccharides are composed of covalently linked lipids and polysaccharides, they have a lack of strength and rigidity. The negative charges on them are attracted toward the weak positive charge available on AgNPs.<sup>59</sup> This indicates that Ag NPs have great potential to be used in biomedical applications.

This research provides helpful insight into the development of new antimicrobial agents for dental or medical use. To elucidate the mechanism of this synergistic effect, more elaborate experimental evidence will be required, and we are currently working toward this goal.

## References

1. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. *Trends Biotechnol* 2010;28(11):580-8.
2. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 2004;275:177–182.
3. Seil JT, Webster TJ. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *Int J Nanomedicine* 2012;7:2767–2781.
4. Siva Kumar V, Nagaraja BM, Shashikala V, Padmasri AH, Madhavendra SS, Raju BD, et al. Highly efficient Ag/C catalyst prepared by electro-chemical deposition method in controlling microorganisms in water. *J Mol Catal A Chem* 2004;223:313–319.
5. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 2009;27(1):76-83.
6. McShan D, Ray PC, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J Food Drug Anal* 2014;22(1):116-27

7. Iravani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem* 2011;3:2638–2650.
8. Amooaghaie R, Saeri MR, Azizi M. Synthesis, characterization and biocompatibility of silver nanoparticles synthesized from *Nigella sativa* leaf extract in comparison with chemical silver nanoparticles. *Ecotoxicol Environ Saf* 2015;120:400-8.
9. Pani A, Lee JH, Yun SI. Autoclave mediated one-pot-one-minute synthesis of AgNPs and Au-Ag nanocomposite from *Melia azedarach* bark extract with antimicrobial activity against food pathogens. *Chem Cent J* 2016;10:15.
10. Jagtap UB, Bapat VA. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* Lam. seed extract and its antibacterial activity. *Ind Crop Prod* 2013;46:132–137.
11. Tan Y, Wang Y, Jiang L, Zhu D. Thiosalicylic acid-functionalized silver nanoparticles synthesized in one-phase system. *J Colloid Interface Sci* 2002;249(2):336–345.
12. Devaux X, Laurent C, Rousset A. Chemical synthesis of metal nanoparticles dispersed in alumina. *Nanostruct Mater* 1993;2(4):339–346.
13. Amooaghaie R, Saeri MR, Azizi M. Synthesis, characterization and biocompatibility of silver nanoparticles synthesized from *Nigella sativa* leaf extract in comparison with chemical silver nanoparticles. *Ecotoxicol Environ Saf* 2015;120:400-8.
14. Nagajyothi PC, Sreekanth TV, Lee JI, Lee KD. Mycosynthesis: antibacterial, antioxidant and antiproliferative activities of silver nanoparticles synthesized from *Inonotus obliquus* (Chaga mushroom) extract. *J Photochem Photobiol B* 2014;130:299-304.
15. Kumar DA, Palanichamy V, Roopan SM. Green synthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera dentata* leaf extract at room temperature and their antimicrobial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014;127:168-71.
16. Morales-Luckie RA, Sanchez-Mendieta V, Arenas-Alatorre JA, López-Castañares R, Perez-Mazariego JL, Marquina-Fabrega V, Wayne GR. One-

- step aqueous synthesis of stoichiometric Fe–Cu nanoalloy. *Mater Lett* 2008;62:4195–4197.
17. Tolaymat TM, El Badawy AM, Genaidy A, Scheckel KG, Luxton TP, Suidan M. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci Total Environ* 2010;408:999-1006.
  18. Mystrioti C, Xanthopoulou TD, Papassiopi N, Xenidis A. Comparative evaluation of five plant extracts and juices for nanoiron synthesis and application for hexavalent chromium reduction. *Sci Total Environ* 2016;539:105-13.
  19. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005;16:2346–2353.
  20. Mandal D, Kumar Dash S, Das B, Chattopadhyay S, Ghosh T, Das D, Roy S. Bio-fabricated silver nanoparticles preferentially targets Gram positive depending on cell surface charge. *Biomed Pharmacother* 2016;83:548-558.
  21. Kokila T, Ramesh PS, Geetha D. Biosynthesis of AgNPs using *Carica Papaya* peel extract and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activities. *Ecotoxicol Environ Saf* 2016;134(Pt 2):467-473.
  22. Yee MS, Khiew PS, Chiu WS, Tan YF, Kok YY, Leong CO. Green synthesis of graphene-silver nanocomposites and its application as a potent marine antifouling agent. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016;148:392-401.
  23. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005 Nov;43(11):5721-32.
  24. Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Bio Rev* 2007; 71: 653-670.
  25. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33:248-255.
  26. García-Contreras R, Argueta-Figueroa L, Mejía-Rubalcava C, Jiménez-Martínez R, Cuevas-Guajardo S, Sánchez-Reyna PA, Mendieta-Zeron H.

- Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *Int Dent J* 2011;61(6):297-301.
27. Uju DE, Obioma NP. Anticariogenic potentials of clove, tobacco and bitter kola. *Asian Pac J Trop Med* 2011;4(10):814-8.
  28. Jeevika A, Ravi Shankaran D. Seed-free synthesis of 1D silver nanowires ink using clove oil (*Syzygium Aromaticum*) at room temperature. *J Colloid Interface Sci* 2015;458:155-9.
  29. Raghunandan D, Bedre MD, Basavaraja S, Sawle B, Manjunath SY, Venkataraman A. Rapid biosynthesis of irregular shaped gold nanoparticles from macerated aqueous extracellular dried clove buds (*Syzygium aromaticum*) solution *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;79(1):235-40.
  30. Revati S, Bipin C, Chitra PB, Minakshi B. In vitro antibacterial activity of seven Indian spices against high level gentamicin resistant strains of enterococci. *Arch Med Sci* 2015;11(4):863-8.
  31. Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine* 2010;6(1):103-9.
  32. Al-Mariri A, Safi M. In Vitro Antibacterial Activity of Several Plant Extracts and Oils against Some Gram-Negative Bacteria. *Iran J Med Sci* 2014;39(1):36-43.
  33. Rana IS, Rana AS, Rajak RC. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. *Braz J Microbiol* 2011;42(4):1269-77.
  34. Argueta FL, Morales LRA, Scougall VRJ, Olea MOF. Synthesis, characterization and antibacterial activity of copper nickel and. *Prog Nat Sci: Mat Int* 2014;24:321-8.
  35. Eshed M, Lellouche J, Matalon S, Gedanken A, Banin E. Sonochemical coatings of ZnO and CuO nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* biofilm formation on teeth model. *Langmuir* 2012;28:12288-95.
  36. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI 2006.

37. Biemer JJ. Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Ann Clin Lab Sci* 1973;3(2):135-40.
38. M. Levine, *J Infect. Dis.* 23 (1918) 43–47/ O.G. Gold, H.V. Jordan, J. Van Houte, *Arch. Oral Biol.* 18 (1973)1357–1364.
39. Cortés-Rojas DF, de Souza CR, Oliveira WP. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014;4(2):90-6.
40. Bajpai SK, Kumari M. A green approach to prepare silver nanoparticles loaded gum acacia/poly(acrylate) hydrogels. *Int J Biol Macromol* 2015;80:177-88.
41. Shayamapda Mandal, Manisha DebMandal, Krishnendu Saha, Nishith Kumar Pal. In Vitro Antibacterial Activity of three Indian Spices Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Oman Med J* 2011;26(5):319–323.
42. Gupta A, Duhan J, Tewari S, Sangwan P, Yadav A, Singh G, Juneja R, Saini H. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of *Syzygium aromaticum*, *Ocimum sanctum* and *Cinnamomum zeylanicum* plant extracts against *Enterococcus faecalis*: a preliminary study. *Int Endod J* 2013;46(8):775-83.
43. Mandal S, Manisha DebMandal, Saha K, Pal NK. In Vitro Antibacterial Activity of three Indian Spices Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Oman Med J* 2011;26(5):319-23.
44. Al-Mariri A, Safi M. In Vitro Antibacterial Activity of Several Plant Extracts and Oils against Some Gram-Negative Bacteria. *Iran J Med* 2014;39(1):36-43.
45. Mansourian A, Boojarpour N, Ashnagar S, Momen Beitollahi J, Shamshiri AR. The comparative study of antifungal activity of *Syzygium aromaticum*, *Punica granatum* and nystatin on *Candida albicans*; an in vitro study. *J Mycol Med* 2014;24(4):e163-8.
46. Chaudhari AN, Ingale AG. *Syzygium aromaticum* extract mediated, rapid and facile biogenic synthesis of shape-controlled (3D) silver nanocubes. *Bioprocess Biosyst Eng* 2016;39(6):883-91.
47. Morales-Luckie RA, Lopezfuentes-Ruiz AA, Olea-Mejía OF, Liliana AF, Sanchez-Mendieta V, Brostow W, Hinstroza JP. Synthesis of silver nanoparticles using aqueous extracts of *Heterotheca inuloides* as reducing

- agent and natural fibers as templates: Agave lechuguilla and silk. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2016;69:429-36.
48. Sun Q, Caia X, Lia J, Zheng M, Chenb Z, Yua CP. Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp 2014;444:226-231.
49. Raghunandan D, Bedre MD, Basavaraja S, Sawle B, Manjunath SY, Venkataraman A. Rapid biosynthesis of irregular shaped gold nanoparticles from macerated aqueous extracellular dried clove buds (*Syzygium aromaticum*) solution. Colloids Surf B Biointerfaces 2010;79(1):235-40.
50. Jeevika A, Ravi Shankaran D. Seed-free synthesis of 1D silver nanowires ink using clove oil (*Syzygium Aromaticum*) at room temperature. J Colloid Interface Sci 2015;458:155-9.
51. Patra JK, Baek KH. Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of silky hairs of corn and investigation of its antibacterial and anticandidal synergistic activity and antioxidant potential. IET Nanobiotechnol 2016;10(5):326-333.
52. Hema JA, Malaka R, Muthukumarasamy NP, Sambandam A, Subramanian S, Sevanan M. Green synthesis of silver nanoparticles using *Zea mays* and exploration of its biological applications. IET Nanobiotechnol 2016;10(5):288-294.
53. El Badawy AM<sup>1</sup>, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. Environ Sci Technol 2010;44(4):1260-6.
54. El Badawy AM, Scheckel KG, Suidan M, Tolaymat T. The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles. Sci Total Environ 2012;429:325-31.
55. Smiech-Slomkowska G, Jablonska-Zrobek J. The effect of oral health education on dental plaque development and the level of caries-related *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. Eur J Orthod 2007;29(2):157-60.

56. Harris NO, Segura A. The Developing Carious Lesion. Gracia-Godoy F, editor. Primary Preventive Dentistry. 6<sup>o</sup> ed. New Jersey: Pearson Education; 2004. p. 45-72.
57. Liebana UJ. Oral microbiology. 2<sup>o</sup> ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España; 2002.
58. Siqueira JF, Rocas IN. Microbiology and treatment of endodontic infections. Berman LH, editor. Cohen's Pathways of the Pulp. 10<sup>o</sup> ed. Barcelona: Elsevier Mosby; 2011. p. 559-600.
59. Sui ZM, Chen X, Wang LY, Xu LM, Zhuang WC, Chai YC, et al. Capping effect of CTAB on positively charged Ag nanoparticles. Physica E 2006;33:308-14.

### 7.3 Resultados adicionales

#### Fase I. Incorporación de nanopartículas de plata a los conos de gutapercha.

La reducción de los iones de plata y la formación de nanopartículas de plata se produjo después de que la solución de nitrato de plata se mezcló con el extracto de clavo en cada uno de los tubos con los conos de gutapercha acondicionados, seguido inmediatamente por el cambio de color de la suspensión. (Fig. 16)

Este proceso se llevó a cabo bajo condiciones ambientales. Es importante resaltar que no se utilizó ningún agente estabilizante y capeante.

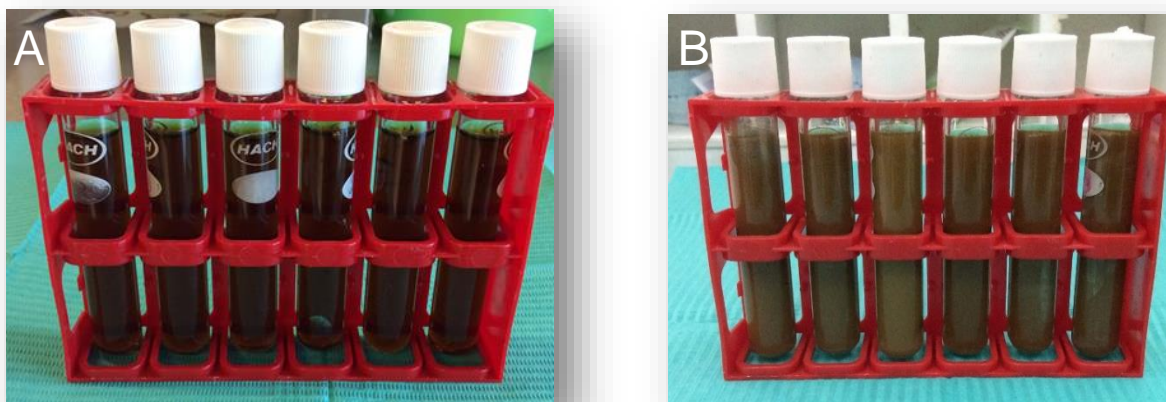


Fig.16 Cambio de color de la suspensión, indicando la formación de nanopartículas: A) Inicio, B) 6 horas después  
Fuente: directa.

#### Fase II. Evaluación de la impregnación de nanopartículas de plata a la superficie de los conos de gutapercha endodóntica.

Durante este proceso, de acuerdo la técnica de caracterización, se analizaron tanto los conos de gutapercha como las nanopartículas en suspensión.

##### a) Espectroscopia Ultravioleta-Visible (Uv-Vis)

Los espectros se registraron cuando el color y la intensidad de absorción de las muestras coloidales permanecieron constantes, como se evidencia en la figura 17. La posición de cada plasmón (punto máximo de la curva) se situó en el intervalo de 431 - 447nm, lo que nos indica la presencia inequívoca de plata bajo las condiciones



específicas de síntesis. Además, ningún plasmón se ubicó a más de 500 nm, lo que indica que la mayoría de las NPs-Ag obtenidas eran de tamaño pequeño y forma similar. A medida que pasó el tiempo, las NPs se volvieron más estables y aumentaron de tamaño.

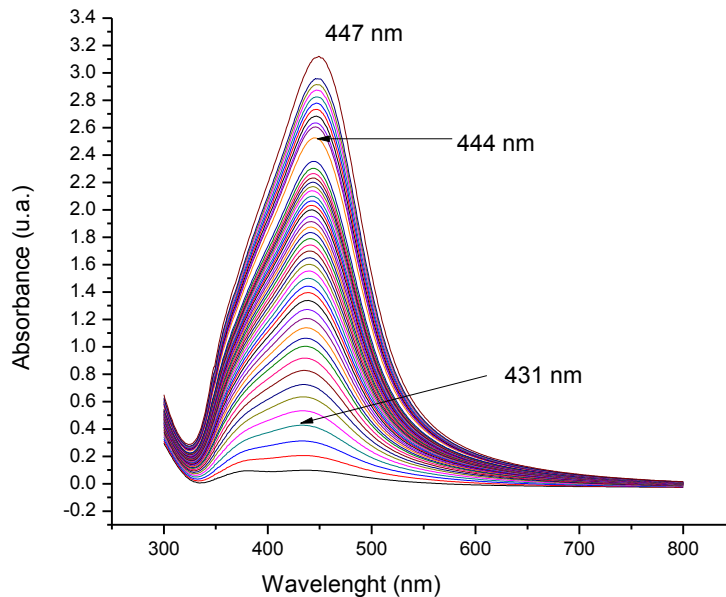


Fig.17 Espectro de absorción UV-vis de las NPs-Ag sintetizadas con extracto de *S.aromaticum* a diferentes intervalos de tiempo. Fuente: directa.

#### b) Microscopia Electrónica de Barrido y análisis EDS

La técnica de caracterización fue consistente con el análisis de mapeo químico elemental de la suspensión de nanopartículas; mostrando picos de absorción aproximadamente a 3 keV. (Fig. 18)

La figura 19, muestra micrografías realizadas a los conos de gutapercha impregnados con Nps-Ag por medio del MEB, observándose puntos radiolúcidos sobre la superficie. El mapeo químico (figura 19D) permite ver la distribución de los diferentes elementos que componen la gutapercha endodóntica, tales como zinc, sílice, y bario; así como la plata adherida a la superficie.

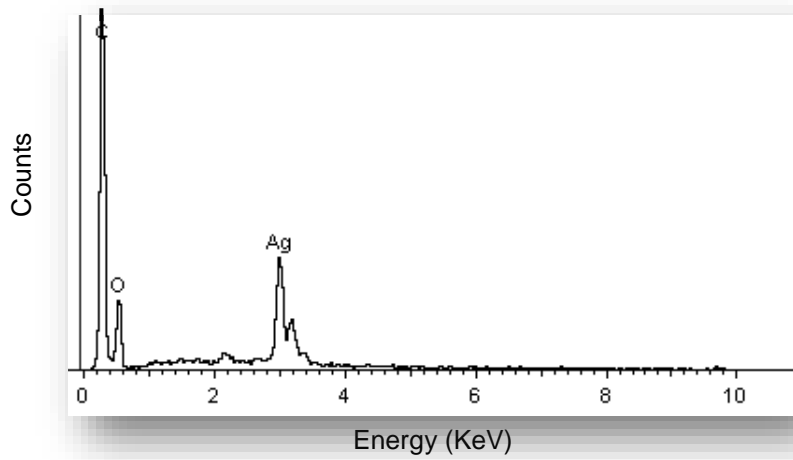


Fig.18 Análisis EDS de la suspensión con nanopartículas sintetizadas con clavo.  
Fuente: directa.

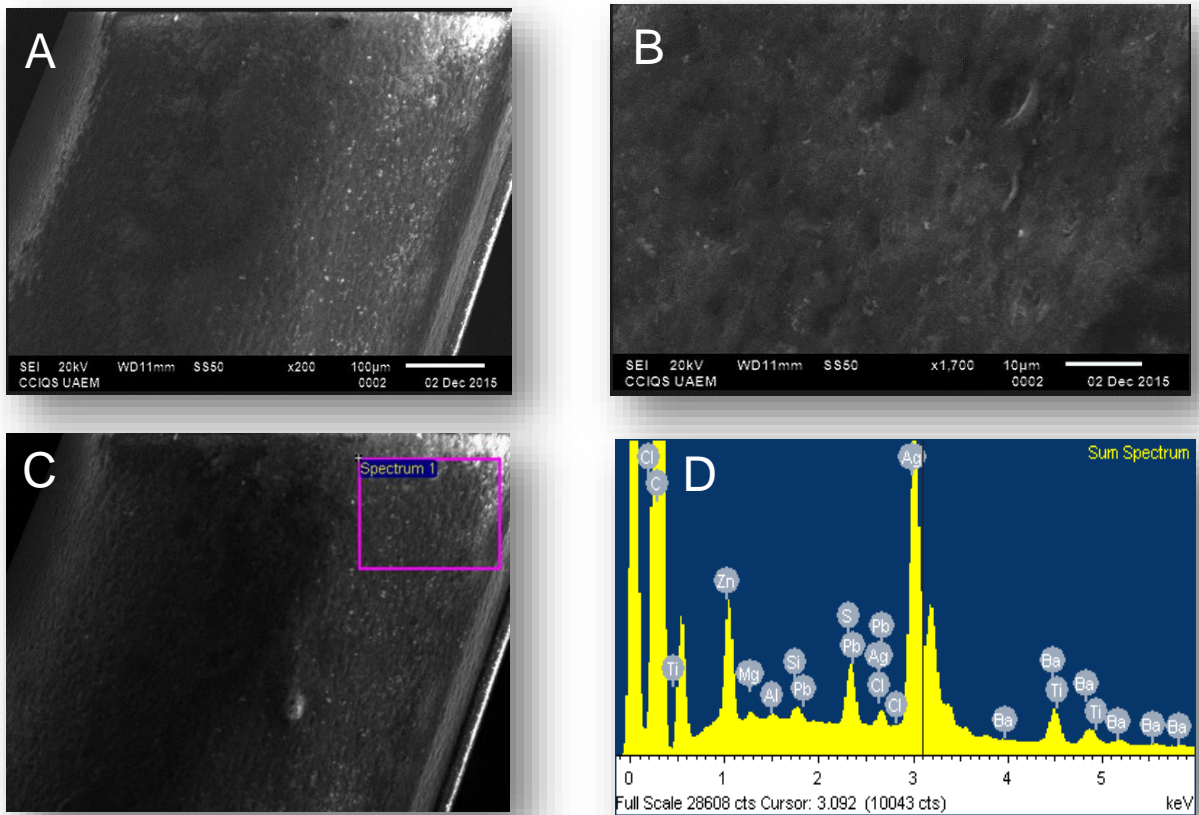


Fig.19 Microscopia electrónica de barrido de los conos de gutapercha: A, B, C) Micrografías de conos de gutapercha endodóntica impregnada con Nps-Ag, D) Análisis EDS. Fuente: directa.

### c) Microscopía Electrónica de Transmisión

El MET, se empleó para caracterizar el tamaño, tamaño y morfología de las NPs-Ag sintetizadas, observándose casi esféricas, un tamaño de 4-16nm, y desviación estándar de 4,27 nm. (Fig.20)

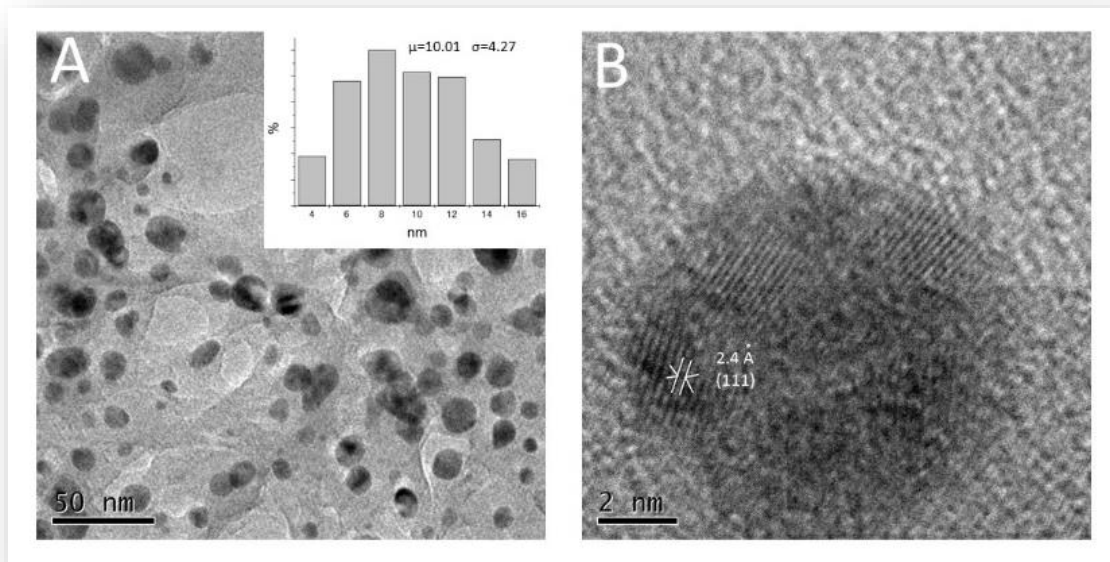


Fig.20 Caracterización de NPs-Ag con clavo de olor: A) Micrografía de TEM, histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas, B) Micrografía HR-TEM. Fuente: directa.

### d) Potencial Z

La estabilización electrostática de las NPs-Ag se estimó midiendo los valores de potencial zeta, que se encontraron en el intervalo de -15,7 a -16,2 mV.

### Fase III. Determinación de la actividad antimicrobiana de los conos de gutapercha plata por medio del método de contacto directo.

La solución de nanopartículas de plata sintetizadas con clavo de olor se probaron contra microorganismos grampositivos, gramnegativos y levaduras, presentando zonas de inhibición similares en todos los cultivos. Las zonas de inhibición producidas por las nanopartículas de plata mostraban halos de 2-4 mm de diámetro.

El grupo control (extracto de clavo de olor) no mostró ningún efecto antimicrobiano. (Fig. 21)

Los halos inhibitorios obtenidos mediante la evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano en cuanto a los conos de gutapercha, mostraron un excelente inhibición del crecimiento microbiano en comparación con el cono control, con un diámetro entre 2 y 3mm. (Fig. 22)

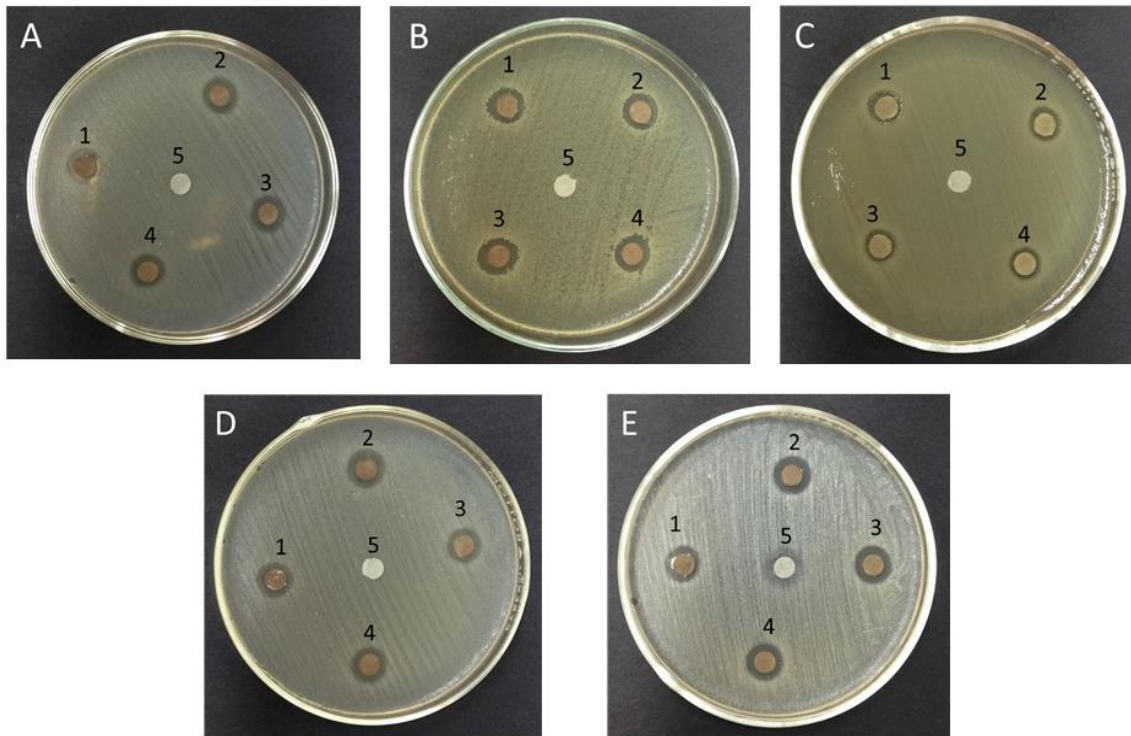


Fig.21 Actividad antimicrobiana de la solución de Nps-Ag y *Sizigium aromaticum*: A) *Streptococcus mutans*, B) *Staphylococcus aureus*, C) *Escherichia coli*, D) *Enterococcus faecalis*, E) *Candida albicans*. 1. 24hrs, 2. 7 días después de la síntesis, 3. 14 días, 4. 21 días, 5. control (clavo). Fuente: directa.

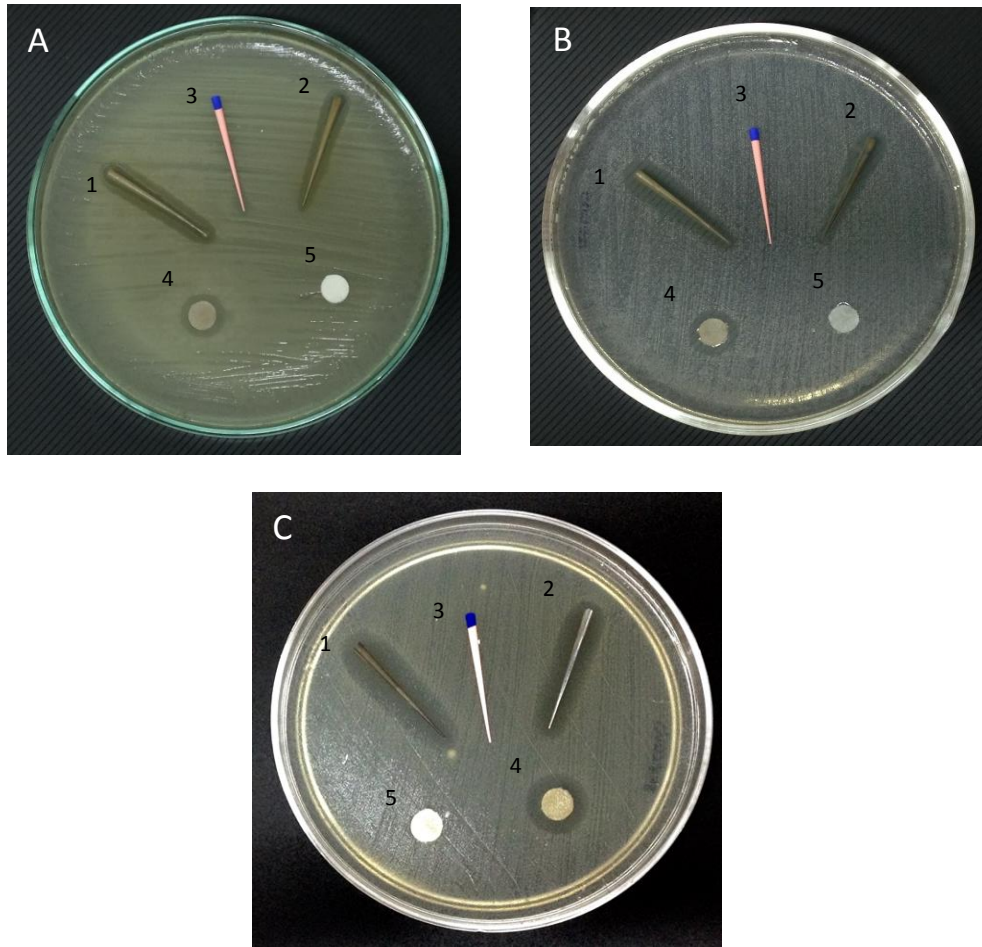


Fig. 22 Actividad antimicrobiana de los conos de gutapercha impregnados de Nps-Ag: A) *Enterococcus faecalis*, B) *Candida albicans* C) *Staphylococcus aureus* 1 y 2 conos de gutapercha endodóntica impregnados con Nps-Ag, 3 cono de gutapercha endodóntica sin Nps-Ag, 4 disco impregnado con Nps-Ag, 5 disco control impregnado con solución fisiológica estéril. Fuente: directa.

## 8. Discusión

El clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), es una de las especias más valiosas. Se ha utilizado durante siglos para conservar alimentos y con fines medicinales, como analgésico y antiespasmódico, siendo el eugenol el responsable de esta actividad. Es una de las fuentes más ricas en compuestos fenólicos como el eugenol, el acetato de eugenol y el ácido gálico (75-77%).<sup>73-76</sup>

Varios autores<sup>73,75-78</sup> han estudiado los efectos antimicrobianos del extracto de clavo de olor. Por ejemplo, Gupta<sup>76</sup> utilizó extractos de diferentes plantas con alta concentración de eugenol, incluyendo *Syzygium aromaticum*, y los comparó con hipoclorito de sodio al 3% contra *Enterococcus faecalis*. Mientras tanto, Mansourian<sup>79</sup> y Rana<sup>80</sup> utilizaron extracto de clavo de olor contra *C. albicans* y lo compararon contra nistatina. En ambos casos se obtuvieron buenos resultados.

La vía más probable para la biosíntesis de los Nps-Ag son los flavonoides presentes en el clavo, que poseen una buena capacidad reductora cuando entran en contacto con los iones plata. Los electrones son transferidos y el proceso de reducción se produce, dando lugar a la formación de Nps-Ag. Es bien sabido que los flavonoides también previenen la aglomeración y estabilizan las Nps-Ag en solución acuosa.<sup>27,28,39,48</sup> Esto se corroboró en nuestro estudio, ya que al almacenar tanto la solución como los conos de gutapercha con las Nps sintetizadas, se observó que mantuvieron su estabilidad y uniformidad.

La reacción de biosíntesis aceleró la cinética de formación, mientras que la intensidad del color de la solución aumentó rápidamente. Este proceso se llevó a cabo bajo condiciones ambientales y la reacción total se completó en pocos minutos.

Qian Sun,<sup>81</sup> Raghunandan<sup>82</sup> y Bajpai<sup>74</sup> realizaron diferentes estudios para generar Nps-Ag utilizando un enfoque similar de síntesis verde, obteniendo propiedades antibacterianas como las de nuestro estudio bajo las mismas condiciones. Además, Jeevika<sup>83</sup> produjo nano hilos de plata a través de la biosíntesis con aceite de clavo de olor.

En la espectroscopia Uv-Vis, durante los primeros 20 minutos, hubo una reducción incipiente en la que ya fue evidente la formación del plasmón. Esto puede atribuirse a la alta disponibilidad de eugenol en el extracto acuoso. Así, durante las siguientes seis horas de reducción, el pico del plasmón se midió claramente a 447 nm, indicando la formación de Nps-Ag.

Después de seis horas de reducción, se observó el aumento máximo en el tamaño de las nanopartículas. Las mediciones se hicieron aproximadamente cada cinco minutos para verificar la cinética de formación.

Es importante señalar que la aparición del espectro mostró tamaños y formas extremadamente similares entre las nanopartículas, haciendo que nuestro método se distinga de otros bio-reductores. Esto fue corroborado por las micrografías de TEM.

De acuerdo a las micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido, se observó una adecuada distribución de las Nps a lo largo de toda la superficie de la gutapercha. Al mismo tiempo en el análisis EDS, se confirmó el espectro de 3 Kev, posición típica para la plata, de acuerdo a los valores establecidos por el fabricante, además de los compuestos propios de la gutapercha endodóntica, tales como zinc, sílice, y bario.<sup>84,85</sup>

El histograma de distribución de tamaño de partícula se determinó usando el TEM. La micrografía mostró que las Nps-Ag preparadas utilizando el extracto de *Syzygium aromaticum* eran poli-dispersas y casi esféricas. Su tamaño estaba en el intervalo de 4-16 nm, con una desviación estándar de 4,2 nm.

La imagen de HR-TEM muestra nanopartículas de Ag de 8-10 nm de diámetro. Esta imagen posee resolución atómica; por lo tanto, varios planos cristalinos son distinguibles y las distancias interplanares pudieron ser medidas a partir de la transformación Fourier. La distancia interplanar calculada fue de 2.4 Å, que correspondía al plano (111) de la plata.

Generalmente, una suspensión que exhibe un potencial zeta absoluto de 0-100 mV está ubicada en el umbral de aglomeración y la estabilidad de las partículas de la

solución se incrementará con valores mayores de aproximadamente -100 mV.<sup>53,54</sup> En este experimento, el potencial zeta de las Nps-Ag estaba en el rango de -15,7 y -16 mV, corroborando la aglomeración y estabilidad aceptable de la suspensión de AgNPs.

Se analizó también la actividad antibacteriana de los conos de gutapercha con Nps-Ag contra dos tipos de bacterias (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*), y una levadura (*Candida albicans*). Las zonas de inhibición fueron similares en todos los cultivos. Los ensayos biológicos de Nps-Ag contra las cepas de ensayo mostraron que tienen un efecto significativo en el crecimiento de los tres microorganismos.

Varios estudios indican<sup>18-20,24,27</sup> que la actividad antibacteriana de las Nps radica en la unión de estas a la pared celular bacteriana, o la formación de radicales libres. Además, los iones de plata liberados por las Nps pueden desempeñar un papel vital, debido a su interacción con los grupos tiol de las enzimas.

Dentro del campo de la nanotecnología en endodoncia, se han realizados diferentes esfuerzos por mejorar la calidad de los tratamientos y disminuir el índice de fracasos. Shantiaee y cols,<sup>86</sup> evaluaron la microfilmación de bacterias en conductos obturados con gutapercha estándar y gutapercha revestida con Nps-Ag, obteniendo filtración en el 84% de los dientes obturados con gutapercha estándar y 76% en los dientes obturados con gutapercha revestida de Nps. Sin embargo, no describen la técnica de síntesis y especificaciones en cuanto a la caracterización de éstas.

Por otro lado, Abbaszadegan y cols,<sup>87</sup> compararon el efecto como irrigante de tres soluciones, hipoclorito de sodio, clorhexidina y Nps-Ag obtenidas por método químico, sobre *Enterococcus faecalis* en estado plactónico obteniendo excelentes resultados como bactericida y menor efecto citotóxico en comparación con las otras soluciones.

Por todo lo anterior, resulta evidente la importancia y efectividad del campo de la nanotecnología en la Odontología; los resultados de esta investigación amplían y ofrecen una opción prometedora para el tratamiento de conductos radiculares,



proporcionando información útil sobre el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos para uso dental o médico. Sin embargo, se requiere evidencia experimental más específica para dilucidar el mecanismo de este efecto sinérgico.

## 9. Conclusiones

- ∂ El clavo, rico en compuestos fenólicos, demostró en este estudio tener excelentes propiedades como agente capeante y reductor, ya que se obtuvieron Nps-Ag polidispersas de tamaño y morfología uniforme.
- ∂ El método desarrollado, permitió observar que la síntesis por contacto directo de Nps-Ags, logró incluir de manera sencilla y efectiva Nps a la superficie de los conos; ya que se observaron halos estables y bien definidos en las pruebas microbiológicas por contacto directo.
- ∂ De acuerdo a nuestro estudio, la síntesis de Nps-Ag utilizando *Sizygium aromaticum* como bioreductor, demostró en nuestro estudio tener gran potencial para el desarrollo de diversos productos médicos y odontológicos.
- ∂ La funcionalidad convencional de los conos de gutapercha con Nps-Ag, puede aumentar la tasa de éxito de los tratamientos de endodoncia, ya que contribuye a la eliminación de microorganismos residuales y a prevenir la reinfección del sistema de conductos radiculares.

## 10. Referencias

1. Johnson WT, Kulild JC. Obturación del sistema de conductos radiculares limpios y conformados. En: Berman LH, editor. Cohen vías de la pulpa. 10ª ed. Barcelona: Elsevier Mosby; 2011. p. 349-6.
2. Moorer WR, Genet JM. Evidence for antibacterial activity of endodontic gutta-percha cones. *Oral Surg.* 1982;53:503-7.
3. Leyva GG. Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Inv disc.* 2013;2(1):18-22.
4. Kim JS, Kuk E, Yu KN et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine.* 2007;3(1): 95 –101.
5. Abbaszadegan A, Nabavizadeh M, Gholami A, Aleyasin ZS, Dorostkar S, Saliminasab M, Ghasemi Y, Hemmateenejad B, Sharghi H. Positively charged imidazolium-based ionic liquid-protected silver nanoparticles: a promising disinfectant in root canal treatment. *Int Endod J.* 2014;67:503-509.
6. Siqueira JF, Rças IN. Microbiología y tratamiento de las infecciones endodónticas. En: Berman LH, editor. Cohen vías de la pulpa. 10ª ed. Barcelona: Elsevier Mosby; 2011. p. 559-600.
7. Rôças IN, Siqueira JF. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol.* 2008;46(11):3599-606.
8. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Molecular detection and identification of *Synergistes* phylotypes in primary endodontic infections. *Oral Dis.* 2007;13(4):398-401.
9. Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(4):275-81.
10. Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(5):579-86.
11. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2001;34(6):429-34.

12. Greenfeld SR, Cambruzzi UJ. Complexities of endodontic treatment of maxillary lateral incisors with anomalous root formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1986;62:82-88.
13. Jiménez OJL, Del Rio CTM. Rotary Instrumentation in Endodontics: Clinical Cases Report. *Int. J. Odontostomatol.* 2012;6(1):89-95.
14. Beurklein S, Beorjes E, Schafer E. Comparison of preparation of curved root canals with Hyflex CM and Revo-S rotary nickel–titanium instruments. *Int Endod J.* 2013;46:1-7.
15. Schilder H. Filling root Canals in three dimensions. *J Endod.* 2006; 33(4):281-290.
16. Jhamb A, Chaurasia VR, Masamatti VK, Agarwal JH, Tiwari S, Nair. In vitro evaluation of antimicrobial activity of different Guttapercha points and calcium hydroxide pastes. *DJ Int Soc Prev Community Dent.* 2014;4(2):92-5.
17. Morales WGR. Materiales de obturación endodóntica. Disponible en: <http://win.endoroot.com/articulos/04.03.materialesdeobturacionenendodoncia.html>. Fecha de consulta: 31 de enero 2015.
18. Chaloupa K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 2010;28(11):580-8.
19. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K., Kouri JB, Ramírez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005;16(10): 2346–53.
20. Evanoff DD, Chumanov G. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. *Chemphyschem.* 2005;6(7):1221-31.
21. Svensater G, Bergenholtz G. Biofilm in endodontic infections. *Endodontic Topics.* 2004;9:27-36.
22. Medina, C, Santos-Martínez, MJ, Radomski, A, Corrigan, OI y Radomski MW. 2007. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol.* 150: 552- 558.
23. Seil JT, Webster TJ. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:2767–2781.

24. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv.* 2009;27(1):76-83.
25. Pani A, Lee JH, Yun SI. Autoclave mediated one-pot-one-minute synthesis of AgNPs and Au-Ag nanocomposite from *Melia azedarach* bark extract with antimicrobial activity against food pathogens. *Chem Cent J.* 2016;10:15.
26. Tolaymat TM, El Badawy AM, Genaidy A, Scheckel KG, Luxton TP, Suidan M. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci Total Environ.* 2010;408:999-1006.
27. Kumar DA, Palanichamy V, Roopan SM. Green synthesis of silver nanoparticles using *alternanthera dentata* leaf extract at room temperature and their antimicrobial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014;127:168-71.
28. Morales-Luckie RA, Sanchez-Mendieta V, Arenas-Alatorre JA, López-Castañares R, Perez-Mazariego JL, Marquina-Fabrega V, Wayne GR. One-step aqueous synthesis of stoichiometric Fe-Cu nanoalloy. *Mater Lett.* 2008;62:4195-4197.
29. Mystrioti C, Xanthopoulou TD, Papassiopi N, Xenidis A. Comparative evaluation of five plant extracts and juices for nanoiron synthesis and application for hexavalent chromium reduction. *Sci Total Environ.* 2016;539:105-13.
30. Panacek A1, Kvítek L, Pucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizúrova N, Sharma VK, Nevecna T, Zboril R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B.* 2006;110(33):16248-53.
31. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(6):1712-20.
32. McShan D, Ray PC, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J Food Drug Anal.* 2014;22(1):116-27
33. Iravani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.* 2011;3:2638-2650.

34. Jagtap UB, Bapat VA. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* Lam. seed extract and its antibacterial activity. *Ind Crop Prod.* 2013;46:132-137.
35. Richard JW, Spencer BA, McCoy LF, Carina E, Washington J, Edgar P. Acticoat versus silverlon: The truth. *J Burns Surg Wound Care.* 2002;1:11-20.
36. Hiro ME, Pierpont YN, Ko F, Wright TE, Robson MC, Payne WG. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings on in vitro and in vivo processes of wound healing. *Eplasty.* 2012;12:e48.
37. Moyer CA, Brentano I, Gravens DL, Margraf HW, Monafa WW jr. Treatment of large human burns with 0.5 per cent silver nitrate solution. *Arch Surg.* 1965;90:812-67.
38. Fox CL Jr, Modak SM. Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 1974;5(6):582-8.
39. Nagajyothi PC, Sreekanth TV, Lee JI, Lee KD. Mycosynthesis: antibacterial, antioxidant and antiproliferative activities of silver nanoparticles synthesized from *Inonotus obliquus* (Chaga mushroom) extract. *J Photochem Photobiol B.* 2014;130:299-304.
40. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci.* 2005;88(2):412-9.
41. Kim S, Choi JE, Choi J, Chung KH, Park K, Yi J, Ryu DY. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro.* 2009;23(6):1076-84. 7.
42. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The presence and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine* 2007; 3: 20-31.
43. Miura N, Shinohara Y. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(3):733-7.
44. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;236(3):310-8.

45. Link S, El-Sayed MA. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annu Rev Phys Chem.* 2003;54:331-66.
46. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*; 2016;17(9):1-34.
47. Silva SK, Barbosa AM, Pereira da Costa L, Pinheiro MS, Oliveira MB, Ferreira Padilha F. Silver Nanocomposite Biosynthesis: Antibacterial Activity against Multidrug-Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Molecules.* 2016;21(9): E1255.
48. Amooaghaie R, Saeri MR, Azizi M. Synthesis, characterization and biocompatibility of silver nanoparticles synthesized from *Nigella sativa* leaf extract in comparison with chemical silver nanoparticles. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015;120:400-8.
49. Magonov SN, Whangbo MH. Surface Analysis with STM and AFM: Experimental and Theoretical Aspects of Image Analysis. En: Sergei N. 5° ed. Alemania: Wiley; 2008. p. 87-98.
50. Owen T. Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy. Agilent Technologies, Alemania; 2000.
51. Skoog DA, Crouch SR, Holler FJ. Principles of Instrumental Analysis, 2008, Cengage Learning Editores.
52. Shevchenko KG, Cherkasov VR, Tregubov AA, Nikitin PI, Nikitin MP. Surface plasmon resonance as a tool for investigation of non-covalent nanoparticle interactions in heterogeneous self-assembly & disassembly systems. *Biosens Bioelectron.* 2016; 63(26):17-4.
53. Schneider CS, Bhargav AG, Perez JG, Wadajkar AS, Winkles JA, Woodworth GF, Kim AJ. Surface plasmon resonance as a high throughput method to evaluate specific and non-specific binding of nanotherapeutics. *J Control Release.* 2015; 219:331-44.
54. Drouin D, Couture AR, Joly D, Tastet X, Aimez V, Gauvin R. CASINO V2.42: a fast and easy-to-use modeling tool for scanning electron microscopy and microanalysis users. *Scanning.* 2007;29(3):92-101.

55. Rashidi M, Müllegger S, Roithner M, Schöffberger W, Koch R. Spectroscopic scanning tunneling microscopy studies of single surface-supported free-base corroles. *J Am Chem Soc.* 2012;134(1):91-4.
56. Coene W, Janssen G, Op de Beeck M, Van Dyck D. Phase retrieval through focus variation for ultra-resolution in field-emission transmission electron microscopy. *Phys Rev Lett.* 1992;69(26):3743-3746.
57. Pawley J. The development of field-emission scanning electron microscopy for imaging biological surfaces. *Scanning.* 1997;19(5):324-36.
58. Ichinokawa T. Analytical scanning electron microscopy for solid surface. *J Electron Microsc Tech.* 1989;12(3):219-27.
59. Wang ZL. Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies. *J Phys Chem B.* 2000;104(6):153–1175.
60. Bradby JE, Williams JS, Wong-Leung J, Swain MV, Munroe P. Transmission electron microscopy observation of deformation microstructure under spherical indentation in silicon. *Appl Phys Lett.* 2000;77:3749.
61. Liu Y, Hudak NS, Huber DL, Limmer SJ, Sullivan JP, Huang JY. In Situ Transmission Electron Microscopy Observation of Pulverization of Aluminum Nanowires and Evolution of the Thin Surface Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Layers during Lithiation–Delithiation Cycles. *Nano Lett.* 2011;11(10):4188–4194.
62. Yang P, Zheng J, Xu Y, Zhang Q, Jiang L. Colloidal Synthesis and Applications of Plasmonic Metal Nanoparticles. *Adv Mater.* 2016;5(3):455-466.
63. Park J, Elmlund H, Ercius P, Yuk JM, Limmer DT, Chen Q, Kim K, Han SH, Weitz DA, Zettl A, Alivisatos AP. Nanoparticle imaging. 3D structure of individual nanocrystals in solution by electron microscopy. *Science.* 2015;17;349(6245):290-5.
64. Van Aert S, Batenburg KJ, Rossell MD, Erni R, Van Tendeloo G. Three-dimensional atomic imaging of crystalline nanoparticles. *Nature.* 2011;470(7334):374-7.
65. Ahmad R, Royle G, Lourenço A, Schwarz M, Fracchiolla F, Ricketts K. Investigation into the effects of high-Z nano materials in proton therapy. *Phys Med Biol.* 2016;61(12):4537-50.



66. Saini P, Saha SK, Roy P, Chowdhury P, Sinha Babu SP. Evidence of reactive oxygen species (ROS) mediated apoptosis in *Setaria cervi* induced by green silver nanoparticles from *Acacia auriculiformis* at a very low dose. *Exp Parasitol*. 2016;160:39-48.
67. Yamada M, Foote M, Prow TW. Therapeutic gold, silver, and platinum nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2015;7(3):428-45.
68. Ahmad R, Royle G, Lourenço A, Schwarz M, Fracchiolla F, Ricketts K. Investigation into the effects of high-Z nano materials in proton therapy. *Phys Med Biol*. 2016;61(12):4537-50.
69. Orza A, Yang Y, Feng T, Wang X, Wu H, Li Y, Yang L, Tang X, Mao H. A nanocomposite of Au-AgI core/shell dimer as a dual-modality contrast agent for x-ray computed tomography and photoacoustic imaging. *Med Phys*. 2016;43(1):589.
70. Wang TH, Hsia SM, Wu CH, Ko SY, Chen MY, Shih YH, Shieh TM, Chuang LC, Wu CY. Evaluation of the Antibacterial Potential of Liquid and Vapor Phase Phenolic Essential Oil Compounds against Oral Microorganisms. *PLoS One* 2016 Sep 28;11(9)
71. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI 2006. Biemer JJ. Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Ann Clin Lab Sci* 1973;3(2):135-40.
72. Cortés-Rojas DF, de Souza CR, Oliveira WP. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014;4(2):90-6.
73. Bajpai SK, Kumari M. A green approach to prepare silver nanoparticles loaded gum acacia/poly(acrylate) hydrogels. *Int J Biol Macromol*. 2015;80:177-88.
74. Shayamapda Mandal, Manisha DebMandal, Krishnendu Saha, Nishith Kumar Pal. In Vitro Antibacterial Activity of three Indian Spices Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Oman Med J*. 2011;26(5):319–323.
75. Gupta A, Duhan J, Tewari S, Sangwan P, Yadav A, Singh G, Juneja R, Saini H. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of *Syzygium aromaticum*,

- Ocimum sanctum and Cinnamomum zeylanicum plant extracts against Enterococcus faecalis: a preliminary study. Int Endod J. 2013;46(8):775-83.
76. Mandal S, Manisha DebMandal, Saha K, Pal NK. In Vitro Antibacterial Activity of three Indian Spices Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Oman Med J. 2011;26(5):319-23.
77. Al-Mariri A, Safi M. In Vitro Antibacterial Activity of Several Plant Extracts and Oils against Some Gram-Negative Bacteria. Iran J Med. 2014;39(1):36-43.
78. Mansourian A, Boojarpour N, Ashnagar S, Momen Beitollahi J, Shamshiri AR. The comparative study of antifungal activity of Syzygium aromaticum, Punica granatum and nystatin on Candida albicans; an in vitro study. J Mycol Med. 2014;24(4):e163-8.
79. Rana IS, Rana AS, Rajak RC. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the Syzygium aromaticum (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. Braz J Microbiol. 2011;42(4):1269-77.
80. Sun Q, Caia X, Lia J, Zheng M, Chenb Z, Yua CP. Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp. 2014;444:226-231.
81. Raghunandan D, Bedre MD, Basavaraja S, Sawle B, Manjunath SY, Venkataraman A. Rapid biosynthesis of irregular shaped gold nanoparticles from macerated aqueous extracellular dried clove buds (Syzygium aromaticum) solution. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010;79(1):235-40.
82. Jeevika A, Ravi Shankaran D. Seed-free synthesis of 1D silver nanowires ink using clove oil (Syzygium Aromaticum) at room temperature. J Colloid Interface Sci. 2015;458:155-9.
83. Patra JK, Baek KH. Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of silky hairs of corn and investigation of its antibacterial and anticandidal synergistic activity and antioxidant potential. IET Nanobiotechnol. 2016;10(5):326-333
84. Hema JA, Malaka R, Muthukumarasamy NP, Sambandam A, Subramanian S, Sevanan M. Green synthesis of silver nanoparticles using *Zea mays* and

exploration of its biological applications. *IET Nanobiotechnol.* 2016;10(5):288-294.

85. Shantiaee Y1, Maziar F, Dianat O, Mahjour F. Comparing microleakage in root canals obturated with nanosilver coated gutta-percha to standard gutta-percha by two different methods. *Iran Endod J.* 2011;6(4):140-5.
86. Abbaszadegan A, Nabavizadeh M, Gholami A, Aleyasin ZS, Dorostkar S, Saliminasab M, Ghasemi Y, Hemmateenejad B, Sharghi H. Positively charged imidazolium-based ionic liquid-protected silver nanoparticles: a promising disinfectant in root canal treatment. *Int Endod J.* 2015;48(8):790-800.

## 11. Anexos



La Universidad Autónoma del Estado de México a través de la  
Facultad de Odontología,  
el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología y el Cuerpo Académico Salud - Enfermedad Bucal  
otorga la presente

# Constancia

A: Erika Alejandra Jardón Romero, Edith Lara Carrillo, Raúl Alberto Morales Luckie, Sarai López González, Silvia Cristina Manzur Quiroga

Por la presentación del trabajo en modalidad maestría  
"Biosíntesis de nanopartículas de plata con *Syzygium aromaticum* para uso potencial en microorganismos orales"  
Durante el VII COLOQUIO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD BUCAL, celebrado en este organismo académico.

## VII Coloquio Nacional Salud • Enfermedad Bucal

Toluca, Estado de México 8 de Febrero de 2016.

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO  
"2016, Año del 60 Aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México"



M. en C. S. Julio B. Robles Navarro  
Director  
Facultad de Odontología



INSTITUTO DE ODONTOLOGÍA



Dr. en O. Rogelio J. Scougall Vichis  
Coordinador  
CIEAO



CIEAO  
Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología y Estudios Interdisciplinarios  
"Odontología De Avanzada Salud"



CASEB  
Cuerpo Académico  
Salud • Enfermedad Bucal





La Universidad Autónoma del Estado de México a través de la  
Facultad de Odontología,  
el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología y el Cuerpo Académico Salud • Enfermedad Bucal

otorga el presente

## RECONOCIMIENTO

A: Erika Alejandra Jardón Romero, Edith Lara Carrillo, Raúl Alberto Morales Luckie, Sarai López González, Silvia Cristina Manzur Quiroga

Por haber obtenido el **PRIMER LUGAR** en la modalidad **MAESTRÍA** con el trabajo titulado  
"Biosíntesis de nanopartículas de plata con *Syzygium aromaticum* para uso potencial en microorganismos  
orales".

Durante el **VII COLOQUIO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD BUCAL**, celebrado en  
este organismo académico.

Toluca, Estado de México 8 de Febrero de 2016.

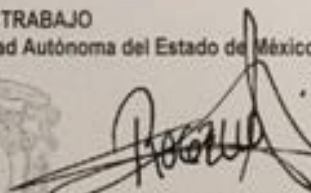
### VII Coloquio Nacional Salud • Enfermedad Bucal

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2016, Año del 60 Aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México"



M. en C. S. Julio B. Robles Navarro  
Director  
Facultad de Odontología



Dr. en O. Rogelio J. Scougall Vilchis  
Coordinador  
CIEAO

CIEAO  
Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología y el Cuerpo Académico Salud • Enfermedad Bucal

CASEB  
Cuerpo Académico Salud • Enfermedad Bucal





Universidad Nacional Autónoma de México  
 Facultad de Odontología  
 Federación Mexicana de Facultades  
 y Escuelas de Odontología



Otorgan el presente

# Reconocimiento

A

**ERIKA ALEJANDRA JARDÓN ROMERO**

y los coautores

EDITH LABA CARRILLO MAÚL ALBERTO MORALES LUCIOE SARAI LÓPEZ GONZÁLEZ SILVIA CRISTINA MANZUR QUIRÓGA

Por su Participación Académica en la exposición de carteles del

**Encuentro Estudiantil de Facultades y Escuelas de Odontología del País**

Celebrado el 7 de mayo de 2016 en el WTC de la Ciudad de México.

con el trabajo

**BIOSINTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON SYZYGIUM AROMATICUM PARA USO POTENCIAL EN MICROORGANISMOS ORALES**

Mtro. José Arturo Fernández Pedrero  
 Director  
 Facultad de Odontología

Comparto Microorganismos de la Facultad de Odontología UNAM-AMBC 2016  
 Perfil de Impresión de este Documento: Fecha: 07/05/2016 Hora: 15:03:13

C.D. E. E. Alejandro Alcántar Enriquez  
 Vicepresidente  
 FMFEO

ID: 2016-00076-3



**UASLP**  
Universidad Autónoma  
de San Luis Potosí



FACULTAD DE  
**ESTOMATOLOGÍA**



La **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**  
a través de la de la **Facultad de Estomatología** y  
la **Sociedad Nacional de Investigadores en Odontología A.C.**  
otorgan el presente

## **RECONOCIMIENTO**

A: **Erika Alejandra Jardón Romero**, Edith Lara Carrillo, Raúl Alberto Morales Luckie,  
Saraí López González, Carlo Eduardo Medina Solís, Silvia Cristina Manzur Quiroga

Por la presentación del trabajo:

**“SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON SYZYGIUM  
AROMATICUM Y SU EFECTO CONTRA MICROORGANISMOS PRESENTES  
EN CAVIDAD ORAL”**

En el **XXIV Encuentro Nacional y XV Iberoamericano de Investigación en Odontología**,  
realizado en San Luis Potosí, S.L.P., los días 9,10,11 de noviembre de 2016.

**“Siempre Autónoma. Por mi Patria Educaré”**  
San Luis Potosí, S.L.P. Noviembre de 2016

**Dr. Ricardo Martínez Rider**  
Director de la Facultad de  
Estomatología

**Dr. Jorge Alanis Tavira**  
Presidente de la Sociedad Nacional de  
Investigadores en Odontología