

## Recubrimiento, evaluación antimicrobiana y caracterización AFM de nanopartículas de plata sobre Brackets estudio in vitro.

Pérez-Hernández Julieta, Gonzalez-Pedroza Maria G, Ortiz-Sánchez David, Serrano Díaz Paloma Netzayeli, Acosta-Torres L.S.

### Resumen

En ortodoncia, al tener aparatología fija los tejidos se vuelven más susceptibles a que se genere biofilm, manchas blancas, caries dental y puede llevar a presentar enfermedad periodontal, debido a la dificultad de limpiar con el cepillo dental, lo que da como resultado la acumulación de residuos de comida o de placa dental. Por ello el control de la placa dentobacteriana es especialmente importante durante el tratamiento. El objetivo de la presente investigación fue recubrir brackets metálicos con nanopartículas de plata, mediante el método electroquímico y el método químico, para brindar efecto antimicrobiano. Se utilizaron mediciones de microscopía de fuerza atómica (AFM) para proporcionar información sobre la superficie y rugosidad de los brackets, y se realizó la evaluación del efecto antibacteriano frente a cultivos de *S. mutans*, por ser una de las bacterias que causan con frecuencia los problemas clínicos mencionados. Los resultados mostraron que la propuesta es altamente efectiva, debido a que con el uso de las nanopartículas de plata se obtuvieron resultados sumamente favorables, posicionando los resultados como referente para futuras investigaciones.

Palabras clave: brackets metálicos, *S. mutans*, efecto antibacteriano.

### Abstract

In orthodontics, having fixed appliances the tissues become more susceptible to the generation of biofilm, white spots, tooth decay are generated and can lead to periodontal disease, due to the difficulty of cleaning with a toothbrush, which results in the accumulation of residues of food or dental plaque. The control of dental plaque is especially important during treatment. The objective of this research was to coat metal brackets with silver nanoparticles, using the electrochemical method and the chemical method, to provide an antimicrobial effect. Atomic Force Microscopy (AFM) measurements were used to provide information on the surface and roughness of the brackets, and the antibacterial effect was evaluated against *S. mutans* cultures, as it is one of the bacteria that causes frequently mentioned clinical problems. The results showed that the proposal is highly effective, because with the use of silver nanoparticles, extremely favorable results were obtained, positioning the results as a reference for future research.

Keywords: metallic brackets, *S. mutans*, antibacterial effect.

\*Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México.  
Correspondencia: Laura Susana Acosta Torres. e-mail: lacosta@enes.unam.mx

### Introducción

El biofilm, caries dental, las manchas blancas y una higiene oral deficiente son un efecto probable en los pacientes portadores de aparatología fija. La cavidad oral provee condiciones especiales para la colonización de microorganismos, el aumento en las áreas de acumulación y retención de placa coloca al paciente en mayor riesgo.<sup>1</sup> Los brackets y los alambres son un factor importante en la formación de biofilm debido a que esta aparatología está presente durante todo el periodo de tratamiento de ortodoncia. La morfología de los brackets y su superficie irregular proporcionan un entorno que impide el acceso adecuado a las superficies de los dientes para su limpieza de acuerdo con los procedimientos convencionales de higiene oral.<sup>2,3</sup>

La desmineralización dental que puede presentarse varía desde ningún cambio perceptible hasta manchas blancas en el esmalte, que es el primer signo clínico de desmineralización hasta la cavitación. Estas áreas pueden requerir un tratamiento adicional después de la

terapia de ortodoncia para eliminar los procesos de caries.<sup>3,4,5</sup> *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* en la saliva y el biofilm de pacientes, han sido identificados como los principales patógenos bucales que aumentan el riesgo de descalcificación.<sup>6</sup> La literatura menciona que cuando los pacientes de ortodoncia utilizan un enjuague bucal con flúor y cepillado dental con pasta fluorada disminuye el biofilm bacteriano y por ende las manchas blancas, sin embargo, también depende de la cooperación del paciente.<sup>7</sup>

Actualmente la plata se ha utilizado en tamaño nanométrico debido a las capacidades biocidas o antiadherentes que presenta<sup>8</sup> y también se emplean en diversas aplicaciones biomédicas, generando una gran cantidad de investigaciones publicadas que justifican las características antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias.<sup>9,10,11</sup>

Se han implementado e investigado las nanopartículas de plata en diversas áreas de la odontología; se han adicionado a los adhesivos o cementos en ortodoncia para mostrar la actividad antimicrobiana como control de la biopelícula oral y reducir la desmineralización alrededor de los brackets.<sup>12,13</sup> Es importante considerar que las nanopartículas de plata no alteren las propiedades físicas y químicas de los materiales.<sup>8</sup>

Un estudio previo evaluó la biocompatibilidad de los brackets recubiertos con nanopartículas de plata, así como las propiedades antibacterianas y la liberación de iones de los brackets recubiertos con nanopartículas de plata comparados con los brackets convencionales. Midió la cantidad de iones de nanoplatina en sangre y saliva; realizaron una evaluación microbiológica para *Streptococcus Mutans*. Concluyeron que los brackets con nanopartículas son efectivos en la inhibición de *S. Mutans*, las cantidades de nanoplatina en las muestras de saliva y suero fueron significativamente más altas en el grupo de estudio el día 7.<sup>12</sup>

En otro estudio evaluaron el efecto antibacteriano de los brackets de acero inoxidable recubiertos con nanopartículas de plata. Recubrieron con partículas de Ag utilizando un método de galvanoplastia concluyeron que los brackets recubiertos exhibieron propiedades antibacterianas cuando se colocaron en contacto directo con *S. Mutans*. Y el efecto antibacteriano persistió durante 30 días después del contacto con la bacteria.<sup>13</sup> Se han investigado los alambres de ortodoncia antimicrobianos recubiertos con nanopartículas de plata mediante la síntesis hidrotermal, concluyen que los alambres obtenidos por este proceso fueron capaces de prevenir la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas por *S. Aureus* y *S. Mutans*;<sup>14</sup> también se ha encontrado amplio efecto antiadherente y antibacteriano del acero inoxidable y los alambres NiTi ortodónticos modificados con plata contra *Lactobacillus acidophilus*,<sup>15</sup> sin embargo, falta realizar más investigación para ampliar la evidencia y poder implementarlos en la consulta clínica diaria. El objetivo de esta investigación fue realizar un recubrimiento de brackets con nanopartículas de plata para estudiar in vitro la rugosidad de superficie y el efecto antimicrobiano en cultivos de *Streptococcus Mutans*.

## Materiales y Métodos

**Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs):** Se utilizó la técnica de síntesis de nanopartículas de plata reportada por Acosta-Torres et al., en 2012,<sup>16</sup> mediante la que se obtienen partículas con tamaño de 20-50 nm con morfología esférica. La síntesis se realizó utilizando como precursor nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>; Sigma, México), y una infusión de geranio (*Geranium maculatum*) filtrada. La infusión obtenida se filtró usando papel filtro de 0.2 µm. Se colocaron 20 mL de etilenglicol en un matraz y se llevó a ebullición a 185°C, para posteriormente adicionar 5 mL de infusión y mantener la reacción en agitación por 5 min. Posteriormente se incorporó la solución de AgNO<sub>3</sub> una gota cada 2 min hasta obtener un cambio en la solución a amarillo ámbar.

**Recubrimiento de brackets con nanopartículas de plata:** Se utilizaron 5 brackets de incisivos centrales superiores derechos (Gemini bracket MBT™ Rx) para ser recubiertos mediante dos técnicas: a) modificación química y b) modificación electroquímica. Con la finalidad de remover impurezas superficiales en los brackets se sonicaron en etanol durante 10 minutos y se lavaron con agua destilada para remover el excedente de alcohol. Para la modificación química, los brackets se sumergieron en ácido sulfúrico durante 2 min para generar sitios activos, posteriormente se enjuagaron en agua desionizada durante 2 min para remover el excedente de ácido y finalmente se mantuvieron 10 min en una solución con nanopartículas de plata, para su adherencia. La modificación electroquímica se llevó a cabo en una celda de 3 electrodos, teniendo como electrodo de referencia un alambre de acero inoxidable, como contraelectrodo una malla de platino de 2x2 cm y como electrodo de trabajo los brackets, utilizando como medio electrolítico 1M KNO<sub>3</sub>, 0.3M HNO<sub>3</sub>, 0.1M AgNO<sub>3</sub>, mediante voltamperometría cíclica en el intervalo de -0.5 a 0.5 V a una velocidad de barrido de 50 mV/s, durante 3 ciclos. Se tuvo un grupo control de 5 brackets sin recubrir.

**Análisis de rugosidad mediante Microscopía de Fuerza Atómica:** Todos los brackets antes y después de ser recubiertos con nanopartículas de plata fueron analizados mediante AFM para obtener el valor de rugosidad de superficie. Se utilizó un

microscopio de fuerza atómica (AFM Nanosurf Flex Liestal, Switzerland) conformado en regiones de 40x40 micrómetros de 10X ampliaciones. Los resultados se analizaron en un software WSxM 5.0.

Evaluación de efecto antimicrobiano: Mediante el ensayo de difusión en agar basado en la metodología de la CLSI/M02 (Clinical and Laboratory Standards Institute) se realizó la prueba antimicrobiana de los brackets modificados con AgNPs sobre *S. Mutans* ATCC 35668.

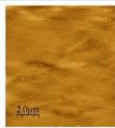
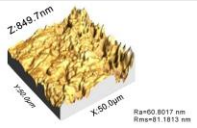

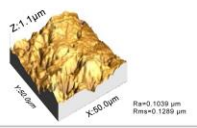
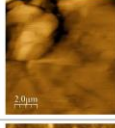
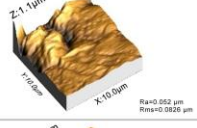
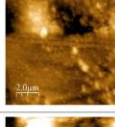
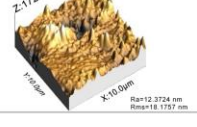
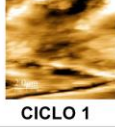

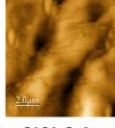
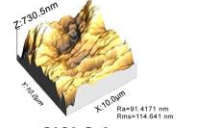
Se preparó agar Muller Hinton (Oxoid LTD) disolviendo 3.8 g de agar por cada 100 mL de agua y se esterilizó en autoclave a 121°C a 2 atm de presión. A partir de un cultivo de 24 h con un asa se tomó un inóculo de *S. Mutans* y se ajustó la solución al patrón de turbidez McFarland de 0.5 (equivalente a 1x10<sup>8</sup> UFC/mL). Se inocularon 200 µL de la solución de *S. Mutans* en cada caja petri. Los brackets modificados con AgNPs por ambas técnicas y sin AgNPs se colocaron en contacto con el agar y se incubaron a 37°C por 24 h (n=3). A las 24 h se realizaron mediciones de las zonas de inhibición. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Se obtuvieron promedios y desviación estándar.

### Resultados

Los brackets metálicos con y sin recubrimiento de nanopartículas de plata fueron caracterizado mediante Microscopia de Fuerza Atómica, como se observa en la Figura 1, donde se pueden distinguir las diferencias existentes antes y después del recubrimiento de nanopartículas bajo los dos diferentes métodos (químico y electroquímico).

Es evidente que la superficie del bracket ha sido modificada, esto se puede observar al comparar las dos muestras representativas del grupo control en la Figura 1 (a1, a2, a3 y a4), respecto de los dos tratamientos de modificación de superficie químico y electroquímico (b y c). En el grupo control (a) en el inciso 1) y 3) se puede observar en las imágenes 2D cierta rugosidad característica de superficies,<sup>17</sup> que se corroboran con la imagen en 3D (a2 y a4) de ambos brackets. También el tratamiento de modificación de superficie mediante la técnica química demuestra un cambio evidente respecto al control, como se observa en las figuras b, en los

**Figura 1.** Caracterización de los brackets de estudio mediante Microscopia de Fuerza Atómica. a) brackets sin recubrimiento, b) Brackets recubiertos con AgNPs mediante el método químico y c) Brackets recubiertos mediante el método electroquímico.

Tratamiento	2D	3D
a) Control - Bracket sin AgNPs	1) 	2) 
	3) 	4) 
b) Bracket modificado con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +AgNPs (Síntesis química)	1) 	2) 
	3) 	4) 
c) Bracket modificado con EQ (Síntesis Electroquímica)	1) 	2) 
	3) 	4) 

ejemplos representativos 1) y 3), observándose una mayor rugosidad, debido a la presencia de AgNPs en la superficie, además de identificar una evidente modificación de la superficie como se muestra en las imágenes 3D del mismo tratamiento 2) y 4), finalmente también se logran identificar diferencias en el tratamiento c, donde también se observa cierta rugosidad, debido al recubrimiento con nanopartículas con un método electroquímico con el cual se realizaron dos ciclos de tratamiento, mostrando diferencias importantes que determinan la eficacia del recubrimiento.

Esto está determinado por los valores de rugosidad media (Ra), en los que se observan cambios evidentes debido a las modificaciones de superficie registradas, todas sujetas a los tratamientos realizados en la superficie de los brackets. En el caso de los brackets control (a2 y a4) se observan valores de 60.80 y 103.90 nm correspondientemente, mientras que cuando se

han modificado las superficies con el tratamiento químico se obtienen valores de 52.00 y 12.37 nm, disminuyendo la rugosidad de la superficie, y por otra parte, se observan los valores de Ra del tratamiento electroquímico de 69.37 nm para el ciclo 1 y para el ciclo 2 de 91.41 nm. Por otro lado, los valores de rugosidad cuadrática media (Rms) son los siguientes; para los brackets control 81.18 y 128.90 nm, así mismo, los valores de Rms para el tratamiento químico son 82.60 y 18.17 nm respectivamente, mientras que para el tratamiento electroquímico corresponde al ciclo 1 un valor de 86.99 nm y 114.64 nm.

Respecto de la actividad antimicrobiana que ofrecen las nanopartículas de plata, se espera que soportadas en los brackets mantengan el efecto. Como anteriormente se describió se utilizaron los tratamientos químico y electroquímico, de los cuales se hicieron pruebas antimicrobianas frente a la bacteria *S. Mutans*. Los resultados claramente muestran en la Figura 2 la eficacia de ambos grupos de tratamientos, además se logra identificar una mayor inhibición con el tratamiento electroquímico que con el tratamiento químico, ya que en la Figura 2 (a2), se obtiene un halo de inhibición de 6.64 mm (tabla 1), mientras que en la Figura 2 (b) tanto en el bracket b2 como en el b3, se logran apreciar zonas de inhibición de 7.85 y 10.53 mm respectivamente.

**Discusión**

En la presente investigación se pudo corroborar la eficiencia de dos métodos sumamente importantes utilizados para recubrir superficies metálicas, uno

**Tabla 1.** Resultados del efecto antimicrobiano de los brackets los tratamientos químico y electroquímico de recubrimiento de nanopartículas de plata bajo la prueba de difusión en agar frente a *S. Mutans*.

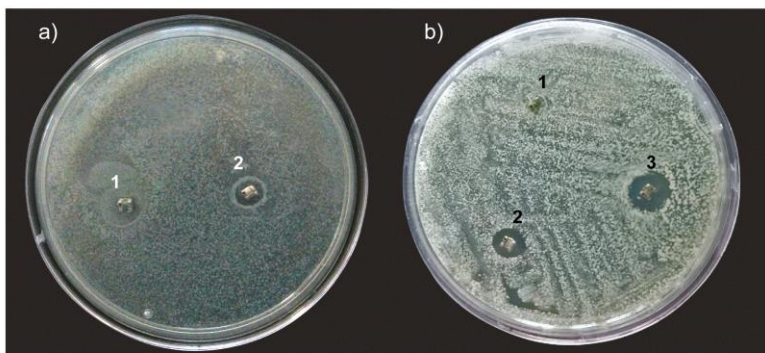
Tratamiento	Zonas de inhibición (mm, promedio ± SD)	
	A	b
Control (Bracket sin recubrir)	SN	SN
Bracket modificado con Síntesis química	6.64±0.54	NA
Bracket modificado con Síntesis electroquímica	NA	(C1) CICLO 1
		(C2) CICLO 2
		7.85±0.39    10.53±0.56

\*SN (Sin crecimiento bacteriano), NA (No aplica)

basado en la síntesis química a partir de una preparación de la superficie modifica con H2SO4, con la finalidad de generar sitios activos, con ayuda de la inmersión de los brackets en soluciones acuosas como el nitrato de plata. Además del tratamiento electroquímico, que, mediante voltamperometría cíclica y soluciones electrolíticas, se llevó a cabo en uno y dos ciclos de inmersión. Es importante reconocer la eficacia de los dos métodos antes mencionados, ya que los resultados obtenidos concuerdan con la eficacia antibacterial esperada, además de observar una mayor eficiencia en un método electroquímico, como se demuestra en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.

La Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) ha sido de utilidad en áreas de la salud, como las ciencias odontológicas y muy específicamente en ortodoncia, debido a la facilidad de poder analizar las superficies de las estructuras que en este caso fueron brackets metálico.<sup>17,18,19</sup> En la Figura 1 se observan diferencias significativas de los brackets sin tratamiento, y los brackets que tienen modificaciones superficiales; topográficamente presentan zonas más marcadas con irregularidades como se observa en las imágenes bidimensionales y tridimensionales. Algunos autores corroboran este comportamiento,<sup>18,20</sup> debido a la modificación de superficies con nanopartículas de plata. En específico las nanopartículas de plata pueden inhibir significativamente la adherencia bacteriana de la cepa de *S. Mutans* en las superficies de los brackets de ortodoncia (Figura 2), y más específicamente con el tratamiento electroquímico que logra formar un mayor halo inhibitorio frente a un tratamiento químico (Tabla 1), esto

**Figura 2.** Efecto antimicrobiano del bracket recubierto con nanopartículas de plata en cultivos de *S. Mutans*. a) Modificación de brackets con síntesis química: 1) Control y 2) Bracket modificado b) Modificación de brackets con síntesis electroquímica: 1) Control; 2) Ciclo 1 y 3) Ciclo 2.



debido a la máxima adherencia de las AgNPs en la superficie de los brackets. Múltiples estudios han demostrado que el recubrimiento de superficies con nanopartículas de plata en la dentina humana puede prevenir la formación de biopelículas en la superficie de la dentina, así como inhibir el crecimiento bacteriano a su alrededor.<sup>21,22,23</sup> Sin embargo, es imperativo mencionar que los tratamientos estipulados en esta investigación, así como como las características microbiológicas particulares del microorganismo (*S. Mutans*), las condiciones físicas y químicas de los aparatos de ortodoncia utilizados, y propiedades fisicoquímicas específicas de los AgNPs, podrían influir en el tratamiento ortodóntico. A partir de los resultados obtenidos en esta investigación, se deben realizar más estudios que determinen el efecto de los AgNPs según el nivel de corrosión, alteraciones topográficas, rugosidad, liberación de iones y otras propiedades importantes de la aparatología fija de ortodoncia en general.

Cabe mencionar que las AgNPs también han sido estudiadas en otro tipo de superficies y especies de microorganismos implicados en las generación de manchas blancas y caries dental.<sup>24,25,26</sup> Nuestros resultados sugieren que los brackets modificados tienen el potencial de ser una excelente alternativa antimicrobiana con propiedades antiadherentes que podrían facilitar la prevención de desmineralizaciones causadas por *S. Mutans*. La modificación de la superficie de los brackets de ortodoncia con nanopartículas de plata es evidente y correspondiente a lo esperado en cada tratamiento, siendo el método electroquímico es el más eficiente debido a la modificación estructural que presenta corroborando los datos registrados por la microscopia de fuerza atómica, más específicamente al segundo ciclo de tratamiento. Respecto al efecto antimicrobiano el tratamiento electroquímico logra corroborar la adherencia de las nanopartículas sobre la superficie ya que nuevamente al segundo ciclo, el recubrimiento de plata logra disminuir más la adhesión de *S. Mutans* a los brackets de ortodoncia, creando un gran halo de inhibición de más de 10 mm, respecto a los demás tratamientos, lo que demuestra que este tratamiento es el más efectivo.

Agregar nanopartículas de plata brindará a los sistemas de ortodoncia un efecto antimicrobiano con lo que se mejorarán las características biológicas de la aparatología ortodóntica con el fin de prevenir el desarrollo de colonización bacteriana, evitando el desarrollo de biofilm bacteriano y caries dental durante el tratamiento de ortodoncia.

## Referencias

- Rosenbloom G, Tinanoff N. Salivary Streptococcus mutans levels in patients before, during, and after orthodontic treatment. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 1999; 100(1): 35-37.
- Scheie A, Arneberg P, Krogstad O. Effect of orthodontic treatment on prevalence of Streptococcus mutans in plaque and saliva. *European Journal of Oral Sciences*. 1984; 92(3): 211-217.
- Mei L, Chieng J, Wong C, Benic G, Farella M. Factors affecting dental biofilm in patients wearing fixed orthodontic appliances. *Progress in Orthodontics*, 2017; 18(1): p. 4.
- Jasso-Ruiz I, Velazquez-Enriquez U, Scougall-Vilchis R, Morales-Luckie R, Sawada T, Yamaguchi R. Silver nanoparticles in orthodontics, a new alternative in bacterial inhibition: in vitro study. *Progress in Orthodontics*. 2020; 21(1): 24.
- Salmerón-Valdés EN, Lara-Carrillo E, Medina-Solis C, Robles-Bermeo N, Scougall-Vilchis R, Casanova-Rosado J, et al. Tooth demineralization and associated factors in patients on fixed orthodontic treatment. *Scientific reports*. 2016; 6(1): p. 1-6.
- Hernández-Gómora AE, Lara-Carrillo E, Robles-Bermeo N, Scougall-Vilchis R, Hernández-Lopez S, Medina Solis C, Morales-Luckie R. Biosynthesis of silver nanoparticles on orthodontic elastomeric modules: evaluation of mechanical and antibacterial properties. *Molecules*. 2017; 22(9): 1407
- Srivastava K, et al. Risk factors and management of white spot lesions in orthodontics. *Journal of orthodontic science*. 2013; 2(2): 43.
- Borzabadi-Farahani A, Borzabadi E, Lynch E. Nanoparticles in orthodontics, a review of antimicrobial and anti-caries applications. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2014; 72(6): 413-7.
- Subramanian AK. The Applications and the Current Status of Silver Nanoparticles in the Field of Orthodontics. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*. 7(2).
- Tahmasbi S, et al. A review on the applications of nanotechnology in orthodontics. *Nanomedicine Journal*. 2019; 6(1):11-8.
- Umalkar DG, Jawale B, Patil S. Application of Nanotechnology in Orthodontics: A Critical Review.
- Metin-Gürsoy G, Taner L, Akca G. Nanosilver coated orthodontic brackets: in vivo antibacterial properties and ion release. *European journal of orthodontics*. 2017; 39(1): 9-16.
- Arash V. Evaluation of antibacterial effects of silver-coated stainless steel orthodontic brackets. *Journal of dentistry (Tehran, Iran)*. 2016; 13(1): 49.
- Gonçalves IS, et al. Antimicrobial Orthodontic Wires Coated with Silver Nanoparticles. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2020; 63.
- Metin-Gürsoy G, Taner L, Barış E. Biocompatibility of nanosilver-coated orthodontic brackets: an in vivo study. *Progress in orthodontics*; 2016; 17(1): 39.
- Acosta-Torres LS, et al. Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *International Journal of Nanomedicine*; 2012; 7: 4777.
- Arash V, et al. The effects of silver coating on friction coefficient and shear bond strength of steel orthodontic brackets. *Scanning*. 2015; 37(4): 294-9.
- Lee GJ, et al. A quantitative AFM analysis of nano-scale surface roughness in various orthodontic brackets. *Micron*; 2010; 41(7): 775-82.
- Ghasemi T, et al. Antimicrobial effect, frictional resistance, and surface roughness of stainless steel orthodontic brackets coated with nanofilms of silver and titanium oxide: a preliminary study. *Microscopy Research and Technique*. 2017; 80(6):599-607.
- Espinosa-Cristóbal LF, et al. Antiadherence and antimicrobial properties of silver nanoparticles against Streptococcus mutans on brackets and wires used for orthodontic treatments. *Journal of Nanomaterials*, 2018; 2018.
- Jasso-Ruiz I, et al. Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles on Orthodontic Brackets: A New Alternative in the Prevention of White Spots. *Coatings*. 2019; 9(8): 480.
- Besinis A, De Peralta T, Handy R. Inhibition of biofilm formation and antibacterial properties of a silver nano-coating on human dentine. *Nanotoxicology*, 2014; 8(7): 745-754.
- Besinis A, et al. Antibacterial activity and biofilm inhibition by surface modified titanium alloy medical implants following application of silver, titanium dioxide and hydroxyapatite nanocoatings. *Nanotoxicology*. 2017; 11(3): 327-338.
- Moreira DM, et al. A novel antimicrobial orthodontic band cement with in situ-generated silver nanoparticles. *Angle Orthodontist*. 2015; 85(2):175-83.
- Ahn SJ, et al. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofilms and silver nanoparticles. *Dental Materials*. 2009; 25(2):206-13.
- Venugopal A, et al. Incorporation of silver nanoparticles on the surface of orthodontic microimplants to achieve antimicrobial properties. *Korean Journal of Orthodontics*. 2017; 47(1):3-10.