



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSTGRADO

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DEL CEMENTO EXPERIMENTAL
PORTLAND ASOCIADO CON
NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN
COMPARACIÓN AL CEMENTO
PORTLAND Y EL BIODENTINE®
FRENTE AL *Enterococcus faecalis*
ATCC 29212 Y *Candida albicans*
ATCC90028**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA

Wiliam Arturo Ramirez Mesias

Lima – Perú

2019

ASESOR

Mg. Esp. Carmen Rosa García Rupaya

Departamento Académico de Medicina y Cirugía Bucomaxilofacial

DEDICATORIA

A mis padres Wiliam y Angélica por sus sabios consejos junto
con su inmenso apoyo en mi pasión por la investigación.

A mi hermano Miguel por su incomparable apoyo.

A mi mejor amiga Claudia por gran apoyo.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por brindarme la vida y dándome tantas gratas experiencias.
- A mis grandes asesoras la Dra. Carmen Rosa García Rupaya y Mg. Dora Maurtua Torres por su gran apoyo en la presente investigación.
- A mis grandes profesores Dra. Leyla Delgado Cotrina, Mg. Roberto León Manco, Dr. Carlos Landauro Saenz y Dr. Justiniano Quispe Marcatoma y Mg. Fred Montalvo Amanca que me apoyaron incondicionalmente y compartirme sus grandes experiencias.
- Además, a mis grandes profesores y amigos Mg. Eduardo Quea Cahuana, Dr. Rafael Morales Badillo, Dra. Maria del Carmen Manrique y la Lic. Marlene Soto por su gran amistad y apoyo en este gran proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	3
II.1. Planteamiento del problema	3
II.2. Justificación	4
III. MARCO REFERENCIAL	5
IV. OBJETIVOS	14
IV.1. Objetivo general	14
IV.2. Objetivos específicos	14
V. HIPÓTESIS	15
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	16
VI.1. Diseño del estudio	16
VI.2. Grupo de estudio	16
VI.3. Muestra	16
VI.4. Criterios de selección	17
VI.4.1. Criterios de inclusión	17
VI.4.2. Criterios de exclusión	17
VI.5. Variables	18
VI.6. Técnicas y procedimientos	19
VI.7. Plan de análisis	27
VI.8. Consideraciones éticas	27
VII. RESULTADOS	28
VIII. DISCUSIÓN	31
IX. CONCLUSIONES	35
X. RECOMENDACIONES	36
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	37
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- **B** : Biodentine
- **MTA** : Agregado de Trióxido Mineral
- **CBSC** : Cemento a base de silicato de calcio
- **CSC** : Cemento silicato de calcio
- **CP** : Cemento Portland
- **Na** : Nanopartículas
- **NaAg** : Nanopartículas de plata
- **CEP/NaAg** : **Cemento** Portland con Nanopartículas de plata.
- **DA** : Difusión en Agar
- **EF** : *Enterococcus faecalis*
- **CA** : *Candida albicans*

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la actividad antimicrobiana del cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata en comparación al cemento Portland y el Biodentine® frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Candida albicans* ATCC 90028. **Materiales y métodos:** Se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica del cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata, el cemento experimental Portland y el Biodentine® mediante la técnica difusión en agar en 40 placas Petri de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, asignándose 20 placas para cada grupo, para la medición de los halos de inhibición de los cementos a las 24 y 48 horas. **Resultados:** Se encontró que el cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata presentó mayor zona de inhibición que el cemento Portland y el Biodentine® a las 24 y 48 horas; el Biodentine en comparación al cemento Portland presentó una mayor zona de inhibición. **Conclusiones:** El cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata presentó un mayor halo de inhibición en la actividad antimicrobiana frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Candida albicans* ATCC 90028 que el cemento Portland y el cemento Biodentine® a las 24 y 48 horas estadísticamente significativo.

PALABRAS CLAVE: Actividad antimicrobiana, cemento Portland, Biodentine, Silicato de calcio, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*.

SUMMARY

Objective: To evaluate the antimicrobial activity of Portland experimental cement associated with silver nanoparticles compared to Portland cement and Biodentine® against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Candida albicans* ATCC 90028.

Materials and methods: The antibacterial and antifungal activity of experimental cement was evaluated Portland associated with silver nanoparticles, the Portland experimental cement and the Biodentine® by the agar diffusion technique in 40 Petri dishes of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, assigning 20 plates for each group, for the measurement of the inhibition zones of the cements at 24 and 48 hours.

Results: Portland experimental cement associated with silver nanoparticles was found to have a greater zone of inhibition than Portland cement and Biodentine® at 24 and 48 hours; Biodentine compared to Portland cement showed a greater zone of inhibition. **Conclusions:** Portland experimental cement associated with silver nanoparticles showed a greater halo of inhibition in antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Candida albicans* ATCC 90028 than Portland cement and Biodentine® cement at 24 and 48 hours statistically significant.

KEY WORDS: Antimicrobial activity, Portland cement, Biodentine, Calcium silicate, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*.

I. INTRODUCCIÓN

El interés por desarrollar nuevos materiales dentales que tengan propiedades ideales siempre ha sido un gran desafío. Los cementos no han sido ajenos a este proceso evolutivo. En 1878, el Dr. White quien publicó el primer reporte de caso en odontología sobre el uso de un cemento a base de silicato de calcio llamado comercialmente cemento Portland para terapias endodónticas como el relleno de perforaciones de los conductos radiculares. Posteriormente, en 1993 el Dr. Torabinejad y su coinventor Dean White en la Universidad Loma Linda (USA), obtuvieron la patente de un material de uso en endodoncia a base de silicato de calcio, lo que llegó a ser conocido como Agregado de Trióxido Mineral (MTA). El MTA® contiene una formulación de cemento Portland (CP) con un polvo radiopaco óxido de bismuto, siendo similar al cemento Biodentine® que cuenta en su composición un cemento a base de silicato de calcio con un polvo radiopaco el óxido de circonio.¹⁻⁴

A partir de allí su empleo se ha extendido en las diferentes especialidades odontológicas ya que cuenta con buenas propiedades biológicas, antimicrobianas, pH alcalino, buena biocompatibilidad y promotor de la regeneración ósea.³⁻⁵

Siendo estos cementos a base de silicato de calcio aplicados en numerosas terapias en endodoncia como el recubrimiento pulpar y pulpotomía, sellado de perforaciones radiculares, resorción interna y externa, apexificación y relleno del extremo radicular en cirugía endodóntica, debido a que son considerados biomateriales activos por su capacidad de inducir una respuesta favorable por parte de los tejidos del huésped.⁵

Actualmente para muchos autores una de las principales desventajas de los cementos a base de silicato de calcio de uso comercial como el MTA® y el Biodentine® es su elevado costo y limitaciones encontradas en relación a su actividad antimicrobiana

frente a bacterias y hongos; a nivel antibacteriano se considera al *Enterococcus faecalis* y a nivel antifúngico la *Candida albicans*, que son considerados microorganismos presentes, con una alta resistencia y responsables de fracasos en los tratamientos endodónticos.²⁻⁴

Diversos autores están tratando de mejorar las propiedades de los cementos a base de silicato de calcio buscando e incorporando nuevos aditivos con el fin de potenciar sus bondades, siendo con mayor énfasis en su actividad antibacteriana y antifúngica.⁵⁻⁷

Las nanopartículas de plata (NaAg) han atraído significativamente el interés entre los nanoproductos emergentes debido a sus propiedades únicas y diversas aplicaciones en nanomedicina debido a su actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral. Siendo considerado actualmente una alternativa viable por su alto potencial para resolver el problema de los microorganismos patógenos resistentes.⁸⁻¹⁰

Teniendo como objetivo del presente estudio el encontrar un material con un buen potencial antimicrobiano; por lo cual se elaboró un cemento experimental Portland asociado a nanopartículas de plata en comparación al cemento Portland y el Biodentine®, frente a cepas del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y la *Candida albicans* ATCC 90028.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

II.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ciencia de los materiales odontológicos está en un gran proceso de evolución por encontrar un cemento dental especialmente en el área de endodoncia, con excelentes propiedades físicas, químicas, biológicas y antimicrobianas en la cavidad bucal.¹⁻⁴

Diversos análisis realizados respecto a la composición química del Agregado de Trióxido Mineral (MTA®) y el cemento Biodentine® demostraron que ambos cuentan principalmente con una matriz de silicato de calcio; además que dicha matriz se encuentra en un gran porcentaje en el cemento Portland que es empleado en el área de la Ingeniería Civil.

En el presente estudio se encontró a un cemento Portland nacional que cuenta con una matriz de silicato de calcio que posteriormente fue asociado con nanopartículas de plata debido a sus buenas propiedades para mejorar su actividad antibacteriana y antifúngica frente al *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* respectivamente, que han demostrado ser los microorganismos más prevalentes, resistentes y responsables de muchos fracasos en los tratamientos endodónticos. Siendo comparado con uno de los cementos comerciales más utilizados el Biodentine® un material que también cuenta con una base de silicato de calcio.⁵⁻⁹

Es por ello que se plantea la siguiente la pregunta de investigación ¿Cuál será la actividad antimicrobiana del cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata en comparación al cemento Portland y el cemento Biodentine® frente a cepas del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y la *Candida albicans* ATCC 90028?

II.2. JUSTIFICACIÓN

El presente estudio es original debido a que obtuvo una contribución en el ámbito del desarrollo, debido a que se elaboró un cemento experimental Portland a base de silicato de calcio asociado con nanopartículas de plata, que llegó a tener una mejor actividad antibacteriana y antifúngica frente al Biodentine® y que actualmente es considerado el material “*gold estándar*” en diversos tratamientos odontológicos a nivel endodóntico.

Es de relevancia científica debido a que se propuso un cemento experimental Portland con nanopartículas de plata que contó con una matriz de silicato de calcio y con buenas propiedades antibacterianas y antifúngicas en comparación al Biodentine®, por lo que puede generar nuevas investigaciones frente a otros microorganismos relacionados a patologías orales.

Posteriormente en conjunto a otras investigaciones, evaluando sus otras propiedades biológicas, físicas y mecánicas de este cemento experimental que cuenta con una base de silicato de calcio que podría generar un posible cemento dental para su utilización en la comunidad odontológica.

III. MARCO REFERENCIAL

Existen diversos patógenos relacionados con las infecciones endodónticas y diversos estudios encuentran microorganismos presentes en las lesiones apicales como la *Porphyromonas spp*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococos Anginosus spp* y *Actinomices spp*, siendo bacterias anaerobias, en condiciones aeróbicas y anaeróbicas facultativas tenemos cepas de *Enterococos*, *Pseudomonas* y otras especies entéricas. Además, se encuentran cepas de hongos pertenecientes al género *Candida*; siendo estos microorganismos relacionadas con la resistencia de infecciones y la presencia de infecciones secundarias.^{10,11}

Se tiene microorganismos con una alta resistencia y una gran capacidad de adaptación a medios no favorables como el *Enterococcus faecalis* que pertenecen al grupo de bacterias Gram-positivas, con forma de cocos o en pares (diplococos), consideradas bacterias anaerobias facultativas que se caracterizan por su capacidad de soportar concentraciones de 6,5% de hipoclorito de sodio (NaCl), debido a su pH alto y capacidad para hidrolizar la bilis esculina.¹²

La prevalencia del grupo de los *Enterococcus faecalis* está en aumento; pudiendo ser debido a la resistencia a los antimicrobianos, el uso de desinfectantes y su capacidad para formar biofilm que aumentan su factor de virulencia.^{10,13} Pueden ser capaces de producir lesiones periapicales, por su capacidad de invadir los túbulos dentinarios, y llegar a poder permanecer en un estado inactivo en condiciones anaerobias.^{13,14}

La *Candida albicans* es considerado un microorganismo oportunista presentes en diversas patologías endodónticas como necrosis pulpar y periodontitis apical. Las especies de *Candida* poseen múltiples factores de virulencia que ayudan a la invasión del tejido huésped e inactiva mecanismos de defensa del huésped. Siendo los principales factores de virulencia de *Candida albicans* sus enzimas proteinasa y

fosfolipasa que provocan la inhibición de la fagocitosis y los procesos de degradación de inmunoglobulinas en su matriz extracelular, además con su interacción hidrofóbica siendo importante en la adherencia de patógenos y su capacidad de estar en condiciones reducidas de oxígeno y anaeróbicas. ¹⁵⁻¹⁷

Debido a su alta prevalencia y resistencia de estos microorganismos se le realizan diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, para poder inhibir y eliminar los patógenos relacionados a las enfermedades endodónticas; por lo que se necesitan el uso de agentes como vehículos y/o cementos que cuenten con una gran capacidad antibacteriana y antifúngica. ¹⁷

Por lo que los cementos a base de silicato de calcio son una alternativa que se viene utilizando en diversos tratamientos de endodoncia, contando con diversas propiedades y particularmente por su buena actividad antimicrobiana.

Los cementos a base de silicato de calcio (CBSC), se clasificaron a partir del Inglés Joseph Aspdin quien fue un fabricante de cemento, que obtuvo la patente del cemento Portland el 21 de octubre de 1824. El primer uso reportado del cemento Portland en literatura dental se remonta a 1878, cuando el Dr. Witte en Alemania publicó un reporte de caso sobre el uso de Cemento Portland para llenar los conductos radiculares.

18-20

Es aquí donde años más tarde se introduce el término cemento silicato de calcio (CSC) donde se refiere a toda la familia de cementos a base de silicato de calcio, basándose en gran medida en los componentes del cemento Portland (silicato de di- y tri-calcio, Al y Fe-silicatos). Teniendo propiedades importantes como la capacidad de fijar y sellar en ambientes húmedos y contaminados con sangre, biocompatibilidad, propiedades físicas, químicas, biológicas y antimicrobianas adecuadas. Además, se utilizan estos cementos a base de silicato comúnmente en procedimientos de

endodoncia que implican la regeneración pulpar y la reparación del tejido duro, tal como recubrimiento de la pulpa, pulpotomía, apexogénesis, apexificación, reparación de perforaciones, y rellenos de raíz. La capacidad del CSC para promover depósito de calcio-fosfato sugiere su uso para la remineralización de la dentina y la regeneración de tejidos.²⁰⁻²³

A partir del uso clínico del cemento Portland, sería una alternativa al Biodentine en procedimientos de endodoncia. Por lo que el cemento Portland tiene un menor costo y es de fácil acceso, que son factores importantes en los países en desarrollo²³ debido a que cuenta con una matriz principal de silicato tricalcico (3CaSiO_2), silicato dicalcico (2CaSiO_2) a diferencia del Biodentine que cuenta con el óxido de circonio como agente radiopacificador y el cloruro de calcio como un agente acelerador.²⁴⁻²⁷

Siendo el cemento Portland un compuesto a base de silicato de calcio, teniendo componentes muy similares a los de MTA, excepto por la presencia del agente radiopacificador óxido de bismuto (Bi_2O_3) y en el Biodentine como agente radiopacificador al óxido de circonio.²⁷ La biocompatibilidad del cemento Portland y Biodentine fue verificado por varios estudios y es básicamente atribuible a la formación de hidróxido de calcio después de su hidratación.^{26,27}

Ambos materiales parecen casi idénticos macroscópicamente y microscópicamente por difracción de rayos X, no se ha mostrado diferencias en los efectos biológicos en varios estudios, sin embargo, ambos materiales no son exactamente lo mismo ya que Biodentine contiene una menor cantidad de sulfato de calcio y está compuesto por partículas más pequeñas y se le incorporo el óxido de circonio para mejorar la radiopacidad.²⁸⁻³⁰

Las nanopartículas son consideradas una alternativa viable al uso de antibióticos por su alto potencial para resolver el problema de la aparición de resistencia a múltiples fármacos.³¹ La plata siempre ha sido ampliamente utilizada contra diversas enfermedades; en el pasado se encontró su uso como un buen antiséptico y antimicrobiano contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y especies de hongos.^{31,32}

Las nanopartículas de plata (NaAg) han atraído un gran interés en los nanoproductos, debido a sus buenas propiedades y su creciente utilización en diversas aplicaciones en nanomedicina.^{32,33} Las nanopartículas de plata se están utilizando como un buen agente antibacteriano, antifúngico y antiviral frente a diversos microorganismos³¹ y siendo consideradas atractivas para su producción por su baja citotoxicidad en bajas concentraciones.

El mecanismo de acción de las nanopartículas de plata sobre los microorganismos aún no es del todo comprendido. Existen reportes que sugieren que la actividad antimicrobiana es debido a una atracción electrostática entre la carga negativa de las células microbianas y la carga positiva de las nanopartículas de plata. Se cree que su alta afinidad por los grupos sulfuros o fosfóricos de la membrana celular es la clave para la propiedad antimicrobiana, seguido además de la liberación de iones plata que contribuye a la actividad antimicrobiana. Las nanopartículas de plata se unen a la superficie de la membrana celular, interfiriendo en sus actividades principales; permeabilidad y respiración. Los microorganismos pierden la capacidad de replicación de su ADN y las proteínas celulares se inactivan. Debido a su nanoestructura que está en íntima relación con su actividad antimicrobiana por la interacción de las nanopartículas de plata con las superficies microbianas llega a provocar la inestabilidad en la membrana celular y previene la replicación del ADN.^{33,34}

Es por tal motivo que se realizó esta investigación, para asociar al cemento experimental Portland que cuenta con una matriz de silicato de calcio que le brinda buenas propiedades antimicrobianas y asociándolo a las nanopartículas de plata que cuentan con excelentes propiedades antibacterianas y antifúngicas por sus iones de plata y tamaño manométrico.

ANTECEDENTES

Guerreiro-Tanomaru et al. (2012), evaluaron la actividad antimicrobiana del cemento Portland por sí solo y en asociación con diferentes materiales radiopacificadores: Óxido bismuto, Óxido de circonio, Tungstato de calcio y cemento óxido de zinc (ZOE), mediante la prueba de difusión en agar usando las siguientes cepas: *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* y después de 24 horas se midieron el halo de inhibición, además analizaron los cambios de pH inducidos 12, 24, 48, y 72 horas usando un medidor de pH. Encontrando que todas las especies microbianas fueron inhibidas por los cementos evaluados y observando que todos los materiales compuestos de CP con agentes radiopacificadores promovieron el aumento del pH similar al cemento Portland puro. ¹⁵

Samiei et al. (2013), determinaron la actividad antimicrobiana del Agregado de Trióxido Mineral blanco (MTA Angelus) y la mezcla de MTA asociado con nanopartículas de plata (NaAg/ 1%), mediante la técnica de difusión en agar contra *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida*

albicans. Encontrando que para *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, y *Pseudomona aeruginosa*, la zona de inhibición microbiana de MTA/NaAg era significativamente mayor que la del MTA, concluyendo que la adición de nanopartículas de plata al MTA mejoró su actividad antimicrobiana.¹⁶

Águila et al. (2014), estudiaron la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata frente al *Enterococcus faecalis* mediante la técnica de Microdilución en miniplacas de 96 pocillos en cultivos de *Enterococcus faecalis* frente a las nanopartículas de plata de 10nm diluidos en 0.02 mg/ml de agua destilada, utilizando como control positivo el hipoclorito de sodio y como control negativo agua destilada. Este estudio encontró que las nanopartículas de plata presentan buena actividad antimicrobiana, siendo mayor a las 48 horas de la incubación.¹⁷

Bahador et al. (2015), evaluaron la actividad antibacteriana del Agregado Trióxido Mineral (MTA) asociado con nanopartículas de plata (NanoAg) en diferentes concentraciones (6.25 ppm, 12.5 ppm y 25 ppm) contra cuatro tipos de patógenos anaeróbicos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, mediante la prueba de difusión en agar (PDA). Los hallazgos de este estudio muestran que las nanopartículas de plata mejoran la actividad antimicrobiana del MTA de manera significativa dependiendo del tipo de bacterias, concluyendo que (MTA/ NanoAg) mostró efecto inhibitorio significativamente mayor que era dependiente del tiempo y de la dosis.¹⁸

Poggio et al. (2015), evaluaron y compararon la actividad antimicrobiana mediante la prueba de difusión en disco de agar con seis materiales diferentes para cubrir la pulpa: Dycal, Calcicur, Calcimol, TheraCal LC, MTA Angelus, Biodentine frente a las cepas de *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mutans* y midieron las zonas de inhibición de los materiales de recubrimiento pulpar, encontrando que los materiales basados en MTA indujeron zonas de inhibición de crecimiento más bajas y que los materiales basados en hidróxido de calcio que presentan una mayor actividad antibacteriana.¹⁹

Bhavana et al. (2015), estudiaron las propiedades antibacterianas y antifúngicas del cemento a base de calcio Biodentine, en comparación al cemento de Ionómero de vidrio (GIC) y el Agregado de Trióxido Mineral (MTA) frente a cuatro cepas microbianas orales: *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, mediante el método de difusión en agar a las de 24 y 72h. Hallando que la actividad antimicrobiana del Biodentine, presento zonas de inhibición mayor en los microorganismos de estudio en comparación al GIC y el MTA a lo largo del tiempo, siendo significativamente mayor para *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, y *Escherichia coli*.²⁰

Özyürek y Demiryürek (2016), compararon la actividad antimicrobiana del Agregado de Trióxido Mineral (MTA) y Biodentine, mediante la prueba de difusión en agar frente a las cepas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecium* a las 24h evaluaron los diámetros de las zonas de inhibición. Teniendo al Biodentine frente al *Escherichia coli* y

Staphylococcus aureus; ellos encontraron que halos de inhibición eran significativamente más grandes que las zonas formadas por MTA-Angelus; sin embargo, las zonas de inhibición formadas por MTA contra *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterococcus faecium* fueron más grandes que las zonas formadas por Biodentine.²¹

Vázquez et al. (2016), estudiaron al Agregado de Trióxido Mineral (MTA) y cemento Portland (CP) asociado con nanopartículas de circonio (NanoZrO₂). En esta investigación, evaluaron la radiopacidad, el tiempo de fraguado, el pH, la resistencia a la compresión y la solubilidad y para la actividad antibacteriana realizaron la prueba de contacto directo contra un biofilm de *Enterococcus faecalis* inducida en dentina de raíz bovina durante 14 días; teniendo los siguientes grupos: 1.MTA, 2. PC 70% + ZrO₂ 30%, 3. MTA + NanoAg. Los resultados de este estudio mostraron que la adición de NanoAg al MTA aumentó el pH, disminuyó la solubilidad y los tiempos de fraguado inicial y final. La adición de NanoAg/ ZrO₂ al CP mantuvo el pH, disminuyó la solubilidad y aumentó el tiempo de fraguado y la resistencia a la compresión. Hallando que la adición de AgNPs promovió un aumento en la actividad antibacteriana para los cementos de silicato de calcio y favoreció las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de los materiales.²²

Jonaidi-Jafari et al. (2017), estudiaron la actividad antimicrobiana de la adición de las nanopartículas de plata (NanoAg) con el Agregado de Trióxido Mineral (MTA) y la mezcla enriquecida con calcio (CEM), frente a cinco microorganismos *Escherichia coli*, *Actinomyces*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*,

durante las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Encontrando que el MTA y CEM tuvieron actividad antibacteriana en todas las cepas de microorganismos, a excepción del *Enterococcus faecalis*, pero en la combinación de la NanoAg con los cementos presentaron una mejor actividad antimicrobiana significativamente.²³

Zand et al. (2017), evaluaron la reacción tisular y biocompatibilidad del Agregado de Trióxido Mineral (MTA) con/sin nanopartículas de plata (NanoAg) en tubos de polietileno en tejidos subcutáneos de ratas a los 7, 15, 30, 60 y 90 días, encontrando que la incorporación de 1% de nanopartículas de plata al MTA no afecta la reacción inflamatoria del tejido subcutáneo en modelos de rata.²⁴

Samiei et al. (2018), determinaron la genotoxicidad del Agregado de Trióxido Mineral (MTA), asociado con nanopartículas de plata e hidrogeno fosfato disódico en diferentes concentraciones. Para la evaluación de la mutagenicidad de los materiales experimentales, encontrando que los materiales ensayados mejoraron la asociación del Agregado de Trióxido Mineral fue mejor con las nanopartículas de plata, seguido del hidrógeno fosfato disódico en relación a su bioconpatiobilidad y mutagenicidad.²⁵

IV. OBJETIVOS

IV.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana del cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata en comparación al cemento Portland y el Biodentine® frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Candida albicans* ATCC 90028.

IV.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar y comparar la actividad antibacteriana del cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata, cemento Portland y Biodentine® a las 24 y 48 horas frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
2. Determinar y comparar la actividad antifúngica del cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata, cemento Portland y Biodentine® a las 24 y 48 horas frente a *Candida albicans* ATCC 90028.

V. HIPÓTESIS

La actividad antimicrobiana del cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata presentara un halo de inhibición mayor que el cemento Portland y el cemento Biodentine®.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio fue de tipo experimental *in vitro*.

VI.2. MUESTRA

Para calcular el tamaño de la muestra se realizó una prueba piloto, usando el 10% del tamaño de muestra del artículo base Guerreiro-Tanomaru⁹ resultando 3 placas Petri por grupo para evaluar la actividad antimicrobiana con los tres cementos de estudios. Después de realizar la prueba piloto se aplicó la fórmula estadística para la comparación de dos medias y con ello se determinó el tamaño definitivo del grupo de estudio experimental.

$$n = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 * S^2}{d^2}$$

Dónde:

n = especímenes necesarios en las muestras.

Z α = valor Z correspondiente al riesgo deseado.

Z β = valor Z correspondiente a la potencia de la prueba.

S² = varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo de referencia.

d = valor mínimo de la diferencia que se desea detectar (datos cuantitativos).

Nivel de confianza del 95%, poder estadístico de 90%, varianza de 0.50, nivel de significancia de 0.05 y precisión (d) de 1.

Se determinó que se necesitaba una muestra de 10 placas petri (ajustada a las pérdidas) para cada grupo experimental, siendo un total de 40 placas petri.

Las muestras fueron divididas en cuatro grupos:

- Cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata
- Cemento Portland
- Cemento control positivo: Cemento Biodentine®
- Control Negativo: Agua destilada

VI.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN

VI.3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Placas petri identificadas con cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- Placas petri identificadas con cepas de *Candida albicans* ATCC 90028.

VI.3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Placas petri con cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 contaminadas.
- Placas petri con cepas de *Candida albicans* ATCC 90028 contaminadas.

VI.5. VARIABLES (ANEXO 1)

VARIABLE DEPENDIENTE

Actividad antimicrobiana: Capacidad de las sustancias de inhibir e suprimir el crecimiento los microorganismos. Variable con dos dimensiones: actividad antibacteriana y actividad antifúngica, tipo cuantitativa, continúa medida escala de razón, unidad de medida será el diámetro del halo de inhibición en milímetros (mm).

VARIABLE INDEPENDIENTE

Cementos a base de silicato de calcio: Cementos de relleno que cuentan con una matriz principal a base de silicato di-calcico y tri-calcico. Variable de tipo cualitativa, medida en escala nominal politómica, los indicadores serán: 1. Cemento Portland Blanco 2. Cemento Agregado de trióxido mineral ®.

COVARIABLE

Tiempo: Es el tiempo transcurrido desde la incubación microbiológica de los cementos experimentales que fueron previamente inoculado en las placas petri a las 24 y 48 horas. El indicador es el tiempo transcurrido. Es de tipo cualitativa, de escala ordinal y los valores la medida de los halos de inhibición con el uso de un pie de rey digital, la primera toma fue a las 24 horas y la segunda toma a las 48 horas.

VI.6. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

MÉTODO:

El método a seguir fue la técnica de difusión en agar para evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica; en donde se observó los cambios en el diámetro del halo de inhibición del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Candida albicans* ATCC 90028 frente a los cementos a base de silicato de calcio.

AUTORIZACIONES Y COORDINACIONES:

Se realizaron los procedimientos para la elaboración y caracterización química de los cementos a base de silicato de calcio: Cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata, cemento Portland y el Biodentine® se realizó en el laboratorio de física de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. (Anexo 2)

Para los procedimientos de la actividad antibacteriana y actividad antifúngica de los cementos a base de silicato de calcio, se realizaron en el Laboratorio Análisis Microbiológicos y con apoyo de la Universidad de San Martín de Porres. (Anexo 2)

CAPACITACIÓN AL INVESTIGADOR

Se realizó un entrenamiento en el sembrado de las cepas en placas petri (medios de cultivo selectivos para bacterias y hongos). Todo el procedimiento estuvo bajo la supervisión de un especialista encargado del laboratorio de Microbiología. Debido a que se midieron los halos de inhibición que muestran la actividad antimicrobiana de los cementos a base de silicato de calcio (variable cuantitativa) y para que no existan diferencias entre las mediciones del microbiólogo y del investigador se realizó el

coeficiente Kappa, obteniendo un coeficiente de 0.9 en la medición de los halos de inhibición, siendo previamente realizada antes de la ejecución del trabajo.

INSTRUMENTOS

Se utilizó las fichas de recolección de datos; en donde se anotaron cambios en el diámetro del halo de inhibición del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y la *Candida albicans* ATCC 90028 frente los cementos experimentales: cemento experimental Portland asociados con nanopartículas de plata, como grupo comparativo el cemento Portland, el grupo utilizado como comparativo e control positivo al Biodentine y como un control negativo fue el agua destilada. La lectura de las medidas de los halos de inhibición se realizó con un pie de rey digital: Absolute Digimatic- Mitutoyo. (Anexo 3)

ADQUISICIÓN Y ELABORACIÓN DE LOS CEMENTOS A BASE DE SILICATO DE CALCIO

Para la elaboración del cemento experimental Portland fue con la obtención del cemento Portland blanco por (Comacsa® S.A., Perú); para el proceso de selección y almacenamiento de sus compuestos químicos se realizó en condiciones estériles y bioseguridad en el laboratorio de física de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

En cuanto a la elaboración del cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata. Primeramente, se obtuvo el cemento Portland blanco por (Comacsa® S.A., Perú) y las nanopartículas de plata por (Sigma Aldrich®, USA), posteriormente se realizó el proceso de asociación de los compuestos con su respectiva

concentración en una balanza analítica de precisión (Cemento experimental Portland 99% -Nanopartículas de plata 1%), basándonos esta concentración de compuestos según estudios realizados por Samiei.⁵ (Anexo 4)

ANÁLISIS DE QUÍMICO ELEMENTAL DE LOS CEMENTOS A BASE DE SILICATO DE CALCIO CON DIFRACCIÓN DE RAYOS X.

El análisis de los compuestos químicos se realizó usando la técnica de Análisis Químico Elemental por medio del equipo de Difracción de Rayos X.

Los cementos de estudio fueron: 1. Cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata. 2. Cemento Portland. 3. Cemento Biodentine, se colocaron un 1gr de su componente polvo en un disco de titanio, posteriormente se llevó al equipo de Difracción de Rayos X (BrukerASX X-ray) del Laboratorio de Física de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la evaluación de sus compuestos químicos presentes. (Anexo 5)

En el análisis de compuesto químico por medio del equipo de Difracción de Rayos X de los cementos de estudio, se encontró que el cemento Portland puro está compuesto principalmente por Alite o silicato de calcio en un 83.5%, carbonato de calcio magnesio con 10.2%; el cemento experimental Portland asociado con Nanopartículas de plata teniendo en su composición Alite con un 80.3%, carbonato calcio cloruro magnesio con 14.6% y nanopartículas de plata un 1% y el cemento Biodentine compuesto por Alite 60.3%, carbonato de calcio 30.4% y óxido de circonio en un 9.3%.

Se observó que los cementos de estudio: el cemento Portland, cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata y el cemento Biodentine; cuentan con una matriz de silicato de calcio en común. (Anexo 6 (Gráficos 1-2; Cuadro 1)

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Las cepas de los microorganismos ATCC de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y de *Candida Albicans* ATCC 90028, se adquirieron por Gen Lab® que fueron transportadas al laboratorio de Microbiología de Análisis Microbiológico para su reactivación. (Anexo 7)

REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS

Para reactivar la cepa del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 se realizó por el medio de cultivo utilizado fue el Agar Bilis Esculina, incubándose a 37°C por 72 horas en condiciones de aeróbicas. De igual manera se realizó la reactivación de *Candida albicans* ATCC 90028 en agar Sabouraud, con 48 horas de incubación a 37°C en el laboratorio de Microbiología de Análisis Microbiológicos.

Replicación de las cepas

La cepa del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, se preparó el medio Agar tripticasa soya (TSA) colocándose en las placas petri y se procedió a incubar por 24 horas a 37°C para realizar la prueba de esterilidad del medio de cultivo para la observación de ausencia de microorganismos. Luego se procedió a obtener una muestra de colonias *Enterococcus faecalis* con una asa de siembra y finalmente se sembró en el medio TSA y dejándolo a incubar por 24 horas a 37°C para su crecimiento.

La cepa de *Candida albicans* ATCC 90028, se preparó el medio Agar Sabouraud (AS) colocándose en las placas petri y se procedió a incubar por 24 horas a 37°C para realizar la prueba de esterilidad del medio de cultivo para la observación de ausencia de microorganismos. Luego se procedió a obtener una muestra de colonias *Candida albicans* con un asa de siembra y finalmente se sembró en el medio AS y dejándolo a incubar por 48 horas a 37°C para su crecimiento. (Anexo 7)

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Candida albicans ATCC 90028, se utilizó las pruebas de confirmación: Medio selectivo CHROMagar-Candida, prueba bioquímica de tubo germinativo con plasma y la coloración Gram. (Anexo 8)

Para la identificación de *Candida albicans* ATCC 90028 por coloración Gram, se utilizó una lámina portaobjeto, para lo cual se colocó una gota de agua destilada junto a una pequeña cantidad de colonias de *Candida albicans* con ayuda del asa de siembra y finalmente se procedió a la coloración GRAM. Se observó al microscopio óptico con objetivo de 40X células levaduriformes ovaladas de 3 a 5 micrómetros.

En la prueba del tubo germinativo, se suspendió un inóculo de la cepa pura de *Candida albicans* en 0.5ml de suero de conejo. Se incubó a 37C por 3 horas, pasado ese tiempo se observó al microscopio con objetivo de 40X. Se consideró como prueba positiva al visualizar una estructura elongada, fina y de paredes paralelas que se origina en la levadura.

La prueba en Agar cromogénico Candida, las cepas de *Candida albicans* fueron sembradas por el medio CHROMagar Candida, incubándose a 37C por 48 horas para su crecimiento. Se consideró como prueba positiva a *Candida albicans* por el

crecimiento de colonias de un color verde, forma ovoidales, redondeadas, elevadas y de bordes enteros.

Enterococcus faecalis ATCC 29212, se utilizó las pruebas de confirmación: Medio selectivo el agar bilis esculina, prueba química de Catalasa y la coloración Gram. (Anexo 8)

Para la identificación de levaduras *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 por coloración Gram, se utilizó una lámina portaobjeto, para lo cual se colocó una gota de agua destilada junto a una pequeña cantidad de colonias de *Enterococcus faecalis* con ayuda del asa de siembra y finalmente se procedió a la coloración GRAM. Se observó al microscopio óptico con objetivo de 100X, observando cocos Gram positivos que se disponen en parejas y en cadenas cortas.

En la prueba de catalasa, se realizó con el asa de siembra la inoculación de una colonia de bacterias de *Enterococcus faecalis* en la lámina portaobjeto que contenía una gota de peróxido de hidrógeno y se procedió a realizar un proceso de agitación; para observar la aparición de burbujas que indican la presencia de la enzima catalasa y diferenciar las especies de *Streptococcus* que son catalasa negativa y *Staphylococcus* que son catalasa positivo. Encontrando *Enterococcus faecalis* es una catalasa negativo por la ausencia de burbujas en la reacción.

En la prueba de agar bilis esculina, se preparó medio Bilis esculina en tres placas Petri, luego se procedió a realizar el sembrado de cepas aisladas de *Enterococcus faecalis* incubándose a 37C por 48 horas; se consideró como prueba positiva el cambio del medio a un color a negro debido a la formación de glucosa y esculina.

MEDIO DE CULTIVO PARA EL ENFRENTAMIENTO ANTIMICROBIANO

Los inóculos de las cepas de estudio, se prepararon a partir de las colonias aisladas de *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* en el medio de cultivo Caldo tripticasa soya (TSB) por 24 horas y se llevó a ajustar la turbidez con el espectrofotómetro de absorbancia a 0.5 Mac Farland.

Para el enfrentamiento antimicrobiano se prepararon los medios de cultivo Agar Müller-Hinton para *Enterococcus faecalis* y Agar Müller-Hinton con glucosa al 2% y azul de metilo para *Candida albicans*. Posteriormente los inóculos se extrajeron 100 microlitros con una micropipeta y se colocaron en las placas Petri, para realizar la diseminación con ayuda del asa digralsky en toda la superficie y dejándolo secar unos 10 minutos. (Anexo 9)

PRUEBA DEL ENFRENTAMIENTO ANTIMICROBIANO DE LOS CEMENTOS A BASE DE SILICATO DE CALCIO

En el presente trabajo una vez solidificado el medio y sembrado de los microorganismos, se procedió a marcar con un plumón indeleble 4 espacios en la placa petri, con la ayuda de un perforador estéril de acero inoxidable y el asa de siembra se realizó los espacios con un diámetro de 6mm de separación en posiciones equidistantes entre ellos. Siendo para la colocación de los cementos experimentales con sus controles respectivos cemento experimental Portland 99% asociado con 1% de nanopartículas de plata, cemento Portland, Cemento Biodentine® como control positivo y agua destilada como control negativo. Para el proceso de mezclado de los cementos experimentales se utilizó una platina de vidrio colocando 0.28 gramos del material de prueba con una gota de agua destilada, para la unión de los compuestos se utilizó una espátula metálica; y en el caso del control negativo se inoculo 100

microlitros de agua destilada con una micropipeta. Posterior a ello se llevaron las placas Petri a incubar por los periodos de tiempos de 24 horas y 48 horas a 37°C; posteriormente se procedió a la lectura de los halos de inhibición con un pie de rey con pantalla digital Mitutoyo. (Anexo 10)

VI.7. PLAN DE ANÁLISIS

Se realizó el análisis estadístico con el paquete estadístico SPSS versión 22.0. Los datos se analizaron mediante la prueba estadística ANOVA y se realizó la prueba de normalidad de Shapiro Will para observar si los datos se encontraban en distribución normal y para comparar las diferencias entre los cementos de estudio se realizó la prueba de Tukey.

VI.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se solicitó la autorización del comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. (Anexo 12)

El desecho de las muestras en el presente estudio se realizó en base a los criterios del Centro de Control de Enfermedades (CDC).

VII. RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó un total de 40 placas petri que fueron distribuidos en dos grupos de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Candida albicans* ATCC 90008 que fue analizado a las 24 y 48 horas frente a los cementos a base de silicato de calcio: Cemento experimental portland asociado con nanopartículas de plata (CP/NaAg), cemento Portland (CP), cemento Biodentine (CB) como el grupo control positivo y agua destilada como el grupo control negativo.

Se analizó la actividad antibacteriana, mediante la técnica de Difusión en Agar del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 frente a los cementos a base de silicato de calcio. El cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata a las 24 horas de su aplicación, presento una mayor actividad antibacteriana con halos de inhibición de 14.51mm y el cemento Biodentine presento un promedio mayor de 12.92mm en comparación al cemento Portland con 11.04mm. En el grupo de las 48 horas también se encontró una mayor actividad antibacteriana por parte del cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata en todos los grupos con promedio de 14.89mm y el cemento Portland con 12.30mm presento una menor actividad antibacteriana con el cemento Biodentine con un 13.21mm.

Encontrando que el cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata presento una mayor actividad antibacteriana en comparación al cemento Portland y el cemento Biodentine con una diferencia estadísticamente significativa a las 24 horas y 48 horas después de su aplicación, mediante la prueba de Tukey. (Tabla 1)

Tabla N°1. Actividad antibacteriana del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 frente a los cementos a base de silicato de calcio a las 24 y 48 horas.

Cemento	24 Horas			48 Horas			p*
	X	DE	p**	X	DE	p**	
C.E.Porland + NaAg	14.51	0.89		14.89	1.21a		0.44
Cemento Portland	11.04	0.79	<0.01	12.30	0.81	<0.01	<0.01
Cemento Biodentine	12.92	0.71		13.21	0.71		0.37

X: Promedio.

DE: Desviación estándar.

*Prueba de T Student.

**Prueba de Anova.

Prueba de Tukey (p<0.05):

Diferencia estadísticamente significativa

La actividad antifúngica se analizó mediante la técnica de Difusión en Agar de *Candida albicans* ATCC 90028, se compararon los promedios del halo de inhibición de los cementos a base de silicato de calcio a las 24 y 48 horas.

El cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata a las 24 horas de su aplicación, presentó una mayor actividad antifúngica con halos de inhibición de 14.27mm con los grupos de estudio. El cemento Biodentine tuvo halos de inhibición de 12.86mm en comparación al cemento Portland con promedio de 12.26mm.

A las 48 horas también se encontró una mayor actividad antifúngica por parte del cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata con promedio de 15.31mm en todos los grupos y el cemento Portland con un promedio 13.28mm presentó una menor actividad antifúngica con el cemento Biodentine con un halo de inhibición 13.22mm.

Se encontró una mayor actividad antifúngica estadísticamente significativa utilizando el cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata al cemento Portland y el cemento Biodentine. (Tabla 2)

Tabla N°2. Actividad antifúngica de *Candida albicans* ATCC 90028 frente a los cementos a base de silicato de calcio a las 24 y 48 horas.

Cemento	24 Horas			48 Horas			p*
	X	DE	p**	X	DE	p**	
C.E.Porland + NaAg	14.27	1.06		15.31	1.50		0.09
Cemento Portland	12.26	1.30	<0.01	13.98	1.01	<0.01	<0.01
Cemento Biodentine	12.86	1.86		13.22	1.11		0.61

X: Promedio.

DE: Desviación estándar.

*Prueba de T Student.

**Prueba de Anova.

Prueba de Tukey (p<0.05):

Diferencia estadísticamente significativa

VIII. DISCUSIÓN

Los cementos a base de silicato (CSC) fueron desarrollados hace más de 20 años debido a su composición que se basa en gran parte en componentes del cemento Portland (Di- y Tri-silicato de calcio, Al y Fe-silicato). Teniendo propiedades importantes, tales como la capacidad de fijar y sellar en ambientes húmedos y contaminados con sangre, biocompatibilidad, propiedades mecánicas adecuadas.¹⁻³

Siendo aplicados los CSC en diversas terapias endodónticas, debido a que son considerados biomateriales activos; es decir, tienen la capacidad de inducir una respuesta favorable por parte de los tejidos del huésped.⁴⁻⁷

Diversos autores analizaron los compuestos químicos presentes en el MTA y el cemento Portland con un espectrómetro de Difracción de Rayos x, hallando que el cemento Portland contiene los mismos elementos químicos que MTA, excepto que el MTA también contiene bismuto. Por lo tanto, recientemente se están introduciendo nuevos cementos a base de silicato de calcio como el Biodentine que es un cemento recientemente desarrollado basado en la composición del cemento Portland con una matriz de silicato tricálcico (Ca_3SiO_5), óxido de circonio y cloruro de calcio, a partir de la formulación base del cemento Portland.⁵⁻⁸ Siendo estos resultados similares obtenidos en nuestro estudio con la evaluación del cemento Biodentine y el cemento Portland; encontrando que estos cementos cuentan en común con una matriz a base de silicato de calcio en grandes porcentajes.

Múltiples estudios han informado la actividad antimicrobiana limitada de los cementos a base de silicato de calcio como en el MTA y el Biodentine. Por tal motivo diversos autores han propuesto el reemplazo del agua destilada con soluciones antisépticas como la Clorhexidina en diferentes concentraciones para mejorar su potencial

antimicrobiano proporcionado el aumento significativo en la actividad antimicrobiana,⁹⁻¹¹ pero esta asociación además incrementó su citotoxicidad¹⁴ y disminuyó las propiedades mecánicas de los cementos.¹³⁻¹⁶

En el presente estudio se utilizó el método de difusión en agar siendo la técnica más empleada para la evaluación de la actividad antimicrobiana. Teniendo como resultado que el cemento experimental Portland presentó una mayor actividad antimicrobiana al cemento Portland y Biodentine, de manera significativa con respecto al halo de inhibición.

Pudiendo deberse a que los cementos a base de silicato de calcio cuando se transfieren a las placas petri y hacen contacto con el medio de cultivo, los componentes de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se disocian en iones de calcio e hidroxilo, el pH aumenta progresivamente su concentración de calcio. Por lo cual este mecanismo explica la actividad antimicrobiana más favorable como demuestra Duarte²⁷ y Bidar²⁸ observando un pH inicial de 10,2 para MTA, aumentando a 12,5 en 3h.

Los cementos ensayados tienen actividad antimicrobiana, similar a los resultados de Tanomaru¹⁷ quien informó que el cemento Portland fue más eficaz contra *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* en comparación al MTA; Asgary¹⁸ demostró al cemento Biodentine tiene mayor actividad frente al cemento Portland y el MTA. Sin embargo, nuestros resultados difieren de los de Torabinejad¹⁵ y Jang²⁹ en los que no encontraron ninguna actividad antimicrobiana del cemento Portland contra *Enterococcus faecalis*. El desacuerdo podría ser atribuible a los nutrientes disponibles, el nivel de tensión de oxígeno, período de incubación y los métodos de evaluación.⁹

Ademas Jonaidi-Jafari²³ et al. observaron la actividad antifúngica de Biodentine fue mayor el diámetro de la zona de inhibición al cemento Portland, lo que sugieren la

adición de un agente antimicrobiano como las nanopartículas de plata mejora el potencial del cemento Portland.

En cuanto a los resultados en el presente estudio se observó que el cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata tuvo mejores resultados en la actividad antibacteriana y antifúngica que el uso de Biodentine, presentando resultados similares con Samiei,¹⁶ que la adición de 1% de nanopartículas de plata al MTA mejoró su propiedad antimicrobianas contra *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* y con el estudio de Kim Nam,¹⁴ encontró que la adición de nanopartículas de plata promovió la actividad antibacteriana y favoreció las propiedades biomecánicas del cemento Portland. Estos resultados pueden deberse a que las nanopartículas de plata pueden interactuar directamente con las bacterias por su tamaño de 20 nanómetros.²¹⁻²⁵

Con respecto al mecanismo de acción de las nanopartículas de plata sobre las bacterias y hongos, existen reportes que sugieren que el efecto bactericida es debido a una atracción electrostática entre la carga negativa de las células bacterianas y la carga positiva de las nanopartículas de plata. Se cree que su alta afinidad por los grupos sulfuros o fosfóricos de la membrana celular es la clave para la propiedad bactericida, seguido además de la liberación de iones plata que contribuye a la actividad antimicrobiana, interfiriendo en sus actividades principales como la permeabilidad y respiración; así como la capacidad de replicación del ADN y la inactivación de las proteínas celulares.²⁴⁻²⁷

Pudiendo deberse que después de la adherencia de las nanopartículas a la membrana microbiana, la permeabilidad se ve afectada, lo que facilita un mayor nivel de contacto

entre los componentes internos de las bacterias con los iones liberados por el cemento portland.

Este estudio ha demostrado un aporte científico dada su efectividad antibacteriana y antifúngica del cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata en comparación al cemento Portland y el cemento Biodentine, siendo una gran alternativa en la aplicación clínica, en conjunto a otras investigaciones *in vitro* e *in vivo*.

IX. CONCLUSIONES

1. El cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata presentó un mayor halo de inhibición en la actividad antibacteriana frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 que el cemento Portland y el cemento Biodentine® a las 24 y 48 horas estadísticamente significativo.

2. El cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata presentó un mayor halo de inhibición en la actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC 90028 que el cemento Portland y el cemento Biodentine® a las 24 y 48 horas estadísticamente significativo.

X. RECOMENDACIONES

Se necesitan más investigaciones para el cemento portland asociado con las nanopartículas de plata frente a otras cepas microbianas y estudios en un modelo de Biofilm endodontico. Además, evaluar sus propiedades biológicas, físicas y mecánicas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Torabinejad M. Historical and contemporary perspectives on root-end filling materials. *J Endod.* 1993;19(8):432-3.
2. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater.* 2015;31(4):351-70.
3. Camilleri J. Characterization and chemical activity of Portland cement and two experimental cements with potential for use in dentistry. *Int Endod J.* 2008;41(9):791-9.
4. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. A quantitative method for determining the antiwash out characteristics of cement-based dental materials including mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2013;46(2):179-86.
5. Saliba E, Abbassi-Ghadi S, Vowles R, Camilleri J, Hooper S, Camilleri J. Evaluation of the strength and radiopacity of Portland cement with varying additions of bismuth oxide. *Int Endod J.* 2009; 42(4):322-8.
6. Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent.* 2008; 11(4):141-3.
7. Camilleri J, Gandolfi MG. Evaluation of the radiopacity of calcium silicate cements containing different radiopacifiers. *Int Endod J.* 2010; 43(1):21-30.
8. Prasad A, Pushpa S, Arunagiri D, Sawhny A, Misra A, Sujatha R. A comparative evaluation of the effect of various additives on selected physical properties of white mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent.* 2015; 18(3):237-41.
9. Camilleri J, Kralj P, Veber M, Sinagra E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. *Int Endod J.* 2012; 45(8):737-43.

10. Zeferino EG, Bueno CE, Oyama LM, Ribeiro DA. . Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. *Int Endod J.* 2010; 43(10):843-8.
11. Chang KC, Chang CC, Huang YC, Chen MH, Lin FH, Lin CP. Effect of Tricalcium Aluminate on the Physicochemical Properties, Bioactivity, and Biocompatibility of Partially Stabilized Cements. *Plos One* 2014; 9 (9):1-9.
12. Dudeja C, Taneja S, Kumari M, Singh N. An in vitro comparison of effect on fracture strength, ph and calcium ion difusión from various biomimetic materials when used for repair of simulated root resortion defects. *J Conserv Dent.* 2015; 18(4):279-83.
13. Da Silva SR, da Silva Neto JD, Veiga DF, Schnaider TB, Ferreira LM. Portland cement versus MTA as a root-end filling material. A pilot study. *Acta Cir Bras.* 2015;30(2):160-4.
14. Kim EC1, Lee BC, Chang HS, Lee W, Hong CU, Min KS.. Evaluation of the radiopacity and cytotoxicity of Portland cements containing bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(1):54-7.
15. Guerreiro-Tanomaru M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement.. *Braz Dent J.* 2012;11(5):18-24.
16. Samiei M, Ghasemi N, Dastmalchi S, Bargahi N Antimicrobial Efficacy of Mineral Trioxide Aggregate with and without Silver Nanoparticles. *Iran Endod J.* 2013;8(4):166-70.
17. Aguila C, Dagna A, Chiesa M. Actividad antimicrobiana de las nanoparticulas de plata frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. *J Clin Exp Dent.* 2014;3(1):3-8.

18. Bahador C, Dastmalchi S, Bargahi N. *In Vitro* Evaluation of the Antimicrobial Activity of Nanosilver-Mineral Trioxide Aggregate against Frequent Anaerobic Oral Pathogens by A Membrane-enclosed Immersion Test. *Biomed J.* 2015;38(1):8-14.
19. Poggio C, Beltrami R, Colombo M, Ceci M, Dagna A, Chiesa M. *In vitro* antibacterial activity of different pulp capping materials. *J Clin Exp Dent.* 2015; 7(5):584-8.
20. Bhavana V, Chaitanya KP, Gandhi P, Patil J, Dola B, Reddy RB. Evaluation of antibacterial and antifungal activity of new calcium-based cement (Biodentine) compared to MTA and glass ionomer cement. *J Conserv Dent.* 2015;18(1):44-6.
21. Özyürek T, Demiryürek EÖ. Comparison of the antimicrobial activity of direct pulp-capping materials: Mineral trioxide aggregate-Angelus and Biodentine. *J Conserv Dent.* 2016;19(6):569-572.
22. Vázquez F, Tanomaru-Filho M, Chávez GM, Bosso R, Basso MI, Guerreiro-Tanomaru JM. Effect of Silver Nanoparticles on Physicochemical and Antibacterial Properties of Calcium Silicate Cements. *Braz Dent J.* 2016;27(5):508-514.
23. Jonaidi-Jafari N, Izadi M, Javidi P. The effects of silver nanoparticles on antimicrobial activity of ProRoot mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium enriched mixture (CEM) *J Clin Exp Dent.* 2016;8(1):22-6.
24. Zand V, Lotfi M, Aghbali A, Mesgariabbasi M, Janani M, Mokhtari H, Tehranchi P⁶, Pakdel SM. Tissue Reaction and Biocompatibility of Implanted Mineral Trioxide Aggregate with Silver Nanoparticles in a Rat Model. *Iran Endod J.* 2016;11(1):13-6.

25. Samiei M, Shahi S, Ghasemi N, Dastmalchi S, Bargahi N. Effect of Different Additives on Genotoxicity of Mineral Trioxide Aggregate. *Iran Endod J.* 2018;13(1):37-41.
26. Silva EJ, Herrera DR, Rosa TP, Duque TM, Jacinto RC, Gomes BP, et al. Evaluation of cytotoxicity, antimicrobial activity and physicochemical properties of a calcium aluminate-based endodontic material. *J Appl Oral Sci.* 2014; 22(1):61-7.
27. Hungaro Duarte et al. Effect of Different Radiopacifying Agents on the Physicochemical Properties of White Portland Cement and White Mineral Trioxide Aggregate. *JOE* 2012; 38(3).
28. Bidar M, Eslami N, Naghavi N, Fasihi Z, Attaran Mashhadi N. The Effect of Different Concentrations of Chlorhexidine Gluconate on the Compressive Strength of Mineral Trioxide Aggregate. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect* 2015; 9 (1): 1-5.
29. Jang YE, Lee BN, Koh JT, Park YJ3, Joo NE, Chang HS, et al. Cytotoxicity and physical properties of tricalcium silicate-based endodontic materials. *Restor Dent Endod* 2014; 39 (2): 89-94.
30. Fallahinejad Ghajari M, Mirkarimi M, Vatanpour M, Kharrazi Fard MJ. Comparison of pulpotomy with formocresol and MTA in primary molars: a systematic review and meta- analysis. *Iran Endod J.* 2008; 3(3):45-9.
31. Simsek N, Alan H, Ahmetoglu F, Taslidere E, Bulut ET, Keles A. Assessment of the biocompatibility of mineral trioxide aggregate, bioaggregate, and biodentine in the subcutaneous tissue of rats. *Niger J ClinPract.* 2015;18(6):739-43.
32. Mehrvarzfar P, Akhavan H, Ghasemi S, Khodaei F, Tour Savadkouhi S, Dianat.. Mineral Trioxide Aggregate Mixed with Normal Saline, Calcium Chloride or KY

- Jelly as Apical Plug in Simulated Open Apices: An In vitro Microleakage Fatemeh. Iran Endod J. 2014; 9(1):45-9.
33. Moradi S, Saghravanian N, Moushekhian S, Fatemi S, Forghani M. Immunohistochemical Evaluation of Fibronectin and Tenascin Following Direct Pulp Capping with Mineral Trioxide Aggregate, Platelet-Rich Plasma and Propolis in Dogs' Teeth. Iran Endod J. 2015; 10(3):188-92.
34. Hwang YC et al. Chemical composition, radiopacity, and biocompatibility of Portland cement with bismuth oxide. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;107(3):96-102.
35. Martínez R, Esaín ML, Kokubu GA, Willis J, Chaves C, Grana DR. Rat Subcutaneous Tissue Response to Modified Portland Cement, a New Mineral Trioxide Aggregate. Braz Dent J 2009; 20 (2): 112-117.
36. Gonçalves JL, Viapiana R, Miranda CE, Borges AH, Cruz Filho AM. Evaluation of physico-chemical properties of Portland cements and MTA. Braz Oral Res 2010; 24 (3): 277-83.
37. Karanth P, Manjunath MK, R, Kuriakose ES. Reaction of rat subcutaneous tissue to mineral trioxide aggregate and Portland cement: A secondary level biocompatibility test. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2013;31(2):74-81.
38. Monteiro B et al. Biocompatibility and setting time of gray Portland cement clinker with or without calcium sulfate. Dental Press Endod. 2012; 2(3):21-6.
39. Coomaraswamy K, Lumley P, Hofmann M. Effect of Bismuth Oxide Radioopacifier Content on the Material Properties of an Endodontic Portland Cement-based (MTA-like) System. J Endod. 2007; 33(3):295-8

40. Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, Mokhtari H, Roshangar L, Abasi MM, et al. Effect of Mineral Trioxide Aggregates and Portland Cement on Inflammatory Cells. *J Endod.* 2010; 36(5):899-903.
41. Obando G.A. Torres K.E. Salas H. Hofling J.F. (2009) Análisis de la composición química, capacidad de sellado apical y propiedades antimicrobianas del MTA y del cemento Portland. *Endodoncia* 2009; 27 (3):111-120.
42. Terrel NE. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Saturejabrevicalyxeppling* "muña" a diferentes concentraciones frente a *enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Streptococcus oralis* ATCC 10557. Tesis. Biblioteca Central Tesis Maestría 2012 (TM-UPCH, QV 350 T41).

ANEXO 1

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variables	Definición conceptual	Indicador	Tipo	Escala	Valor
Dependiente Actividad antimicrobiana	Actividad antibacteriana: Efecto de las sustancias que tienen la capacidad de inhibir su crecimiento y poder inducir a su muerte de las bacterias.	Halo de inhibición medido en milímetros	Cuantitativa Continua	Razón	En milímetros (mm)
	Actividad antifúngica: Efecto de las sustancias que tienen la capacidad de inhibir su crecimiento y poder inducir a su muerte de diversos hongos.	Halo de inhibición medido en milímetros	Cuantitativa Continua	Razón	En milímetros (mm)
Independiente Cementos a base de silicato de calcio	Cementos que cuentan con una matriz a base de silicato de calcio (dicalcico y tricalcico).	Cementos a base de silicato aplicados en las placas agar.	Cualitativa Politomica	Nominal	1. Cemento Portland. 2. Cemento Portland asociado con nano partículas de plata. 3. Cemento Biodentine

ANEXO 3

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Actividad antimicrobiana de los cementos a base de silicato de calcio

Microorganismo: *Enterococcus faecalis* () *Candida albicans* ()

Tiempo de medición: 24 horas () 48 horas ()

N° de placas	Cemento experimental Portland asociado con Nanopartículas de plata	Cemento Portland	Cemento Biodentine	Agua destilada
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

ANEXO 4

Elaboración del cemento Portland, cemento experimental Portland asociado con nanopartículas de plata.



Balanza analítica de precisión/ Cemento Portland / Nanopartículas de plata



Elaboración del cemento experimental Portland asociado con las nanopartículas de plata

ANEXO 5

Análisis de las características químicas de los compuestos experimentales



Colcacion del cemento experimental Portland y Biodentine en disco de Titaneo
(6mm) para posterior analisis de conpuestos quimicos

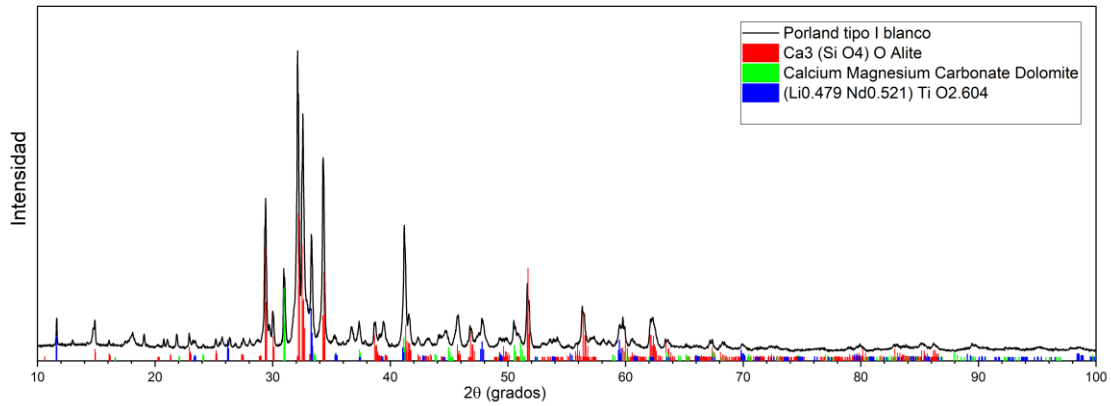


Equipo de Difracción de Rayos X (BrukerASX X-ray) para la realización del análisis químico elemental de los cementos de estudio

ANEXO 6

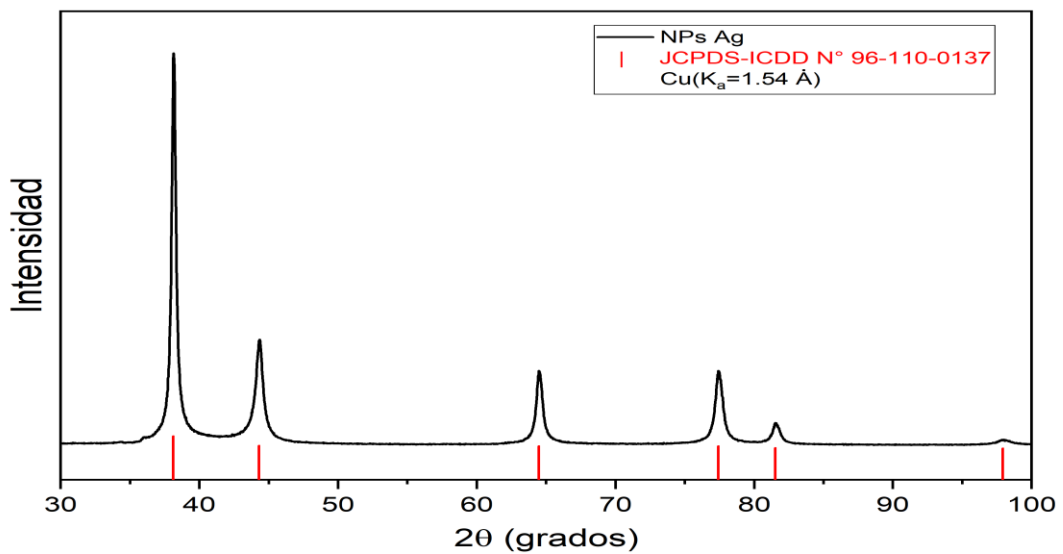
Graficos

Grafico 1: Analisis quimico elemental del cemento Portland por Difraccion de Rayos X.



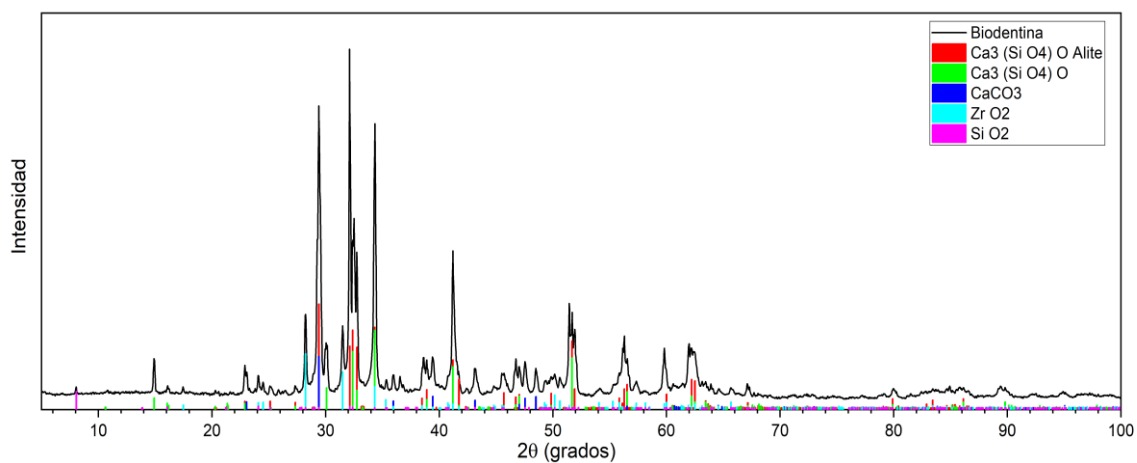
Cemento Portland: Conformado principalmente por Alite- silicato de calcio

Grafico 2: Analisis de las nanoparticulas de plata por el equipo de Difraccion de Rayos X.



Nanoparticulas de plata con diametro de 20 nanometros

Grafico 3: Analisis del cemento Biodentine por el equipo de Difraccion de Rayos X.



Biodentine, conformado principalmente por Alite/ silicato de calcio y óxido de circonio

Cuadro 1: Análisis Químico Elemental por Difracción de Rayos X

	Silicato de Calcio	Carbonato de Calcio	Plata	Óxido de Titanio	Óxido de Circonio
Cemento Portland + NanoAg	80.3%	10.2%	1%	6.1%	---
Cemento Portland	83.5%	14.2%	---	5.1%	---
Biodentine	60.3%	30.4%	---	---	9.3%

ANEXO 7

Laboratorio de microbiología



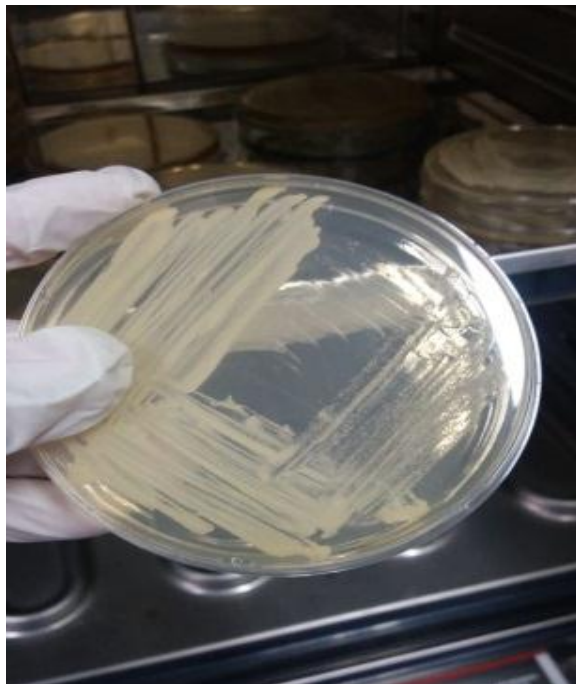
Replicación de cepas ATCC: medios de repique/ plaqueo/ incubo 37 c



Visualización de microorganismos replicados



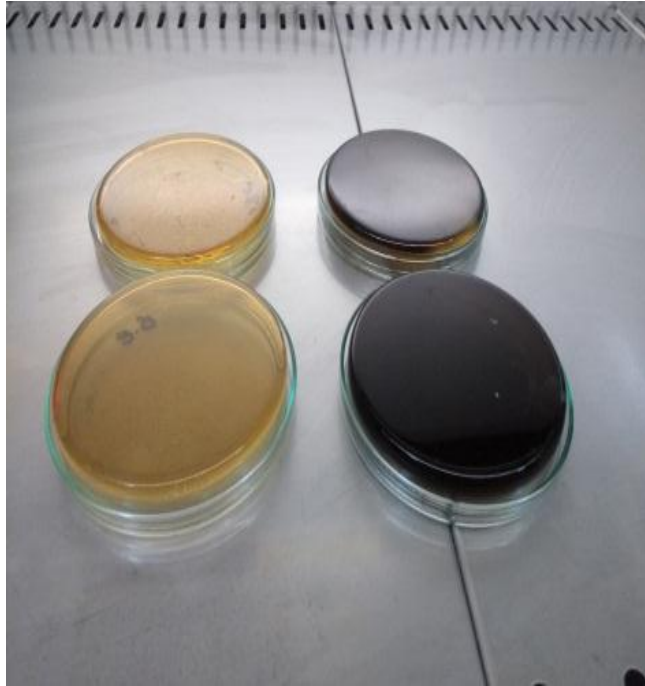
Enterococcus faecalis ATCC 29212



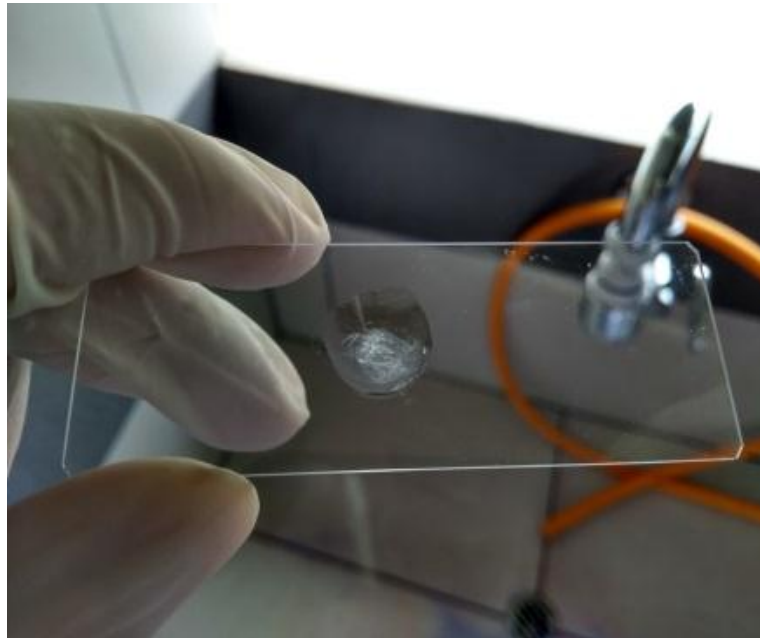
Candida albicans ATCC 90028

ANEXO 8

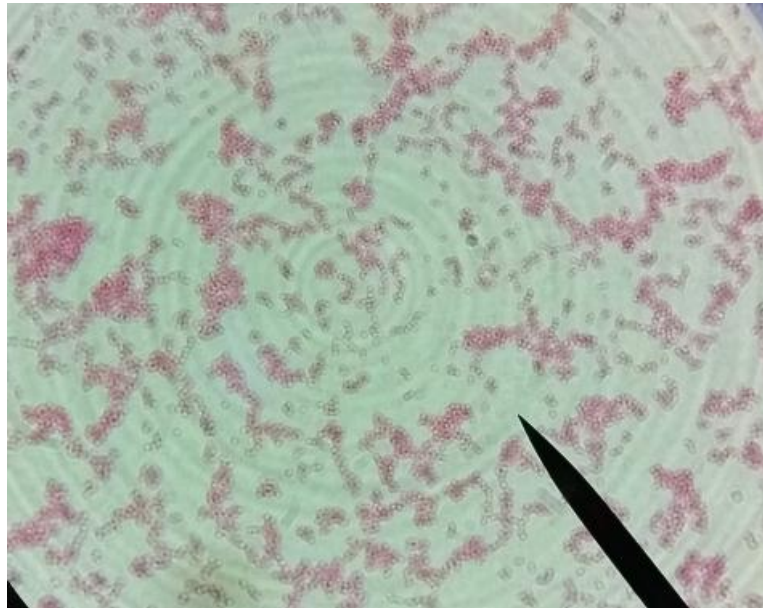
Pruebas de confirmación: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212



Medio de cultivo Agar bilis esculina

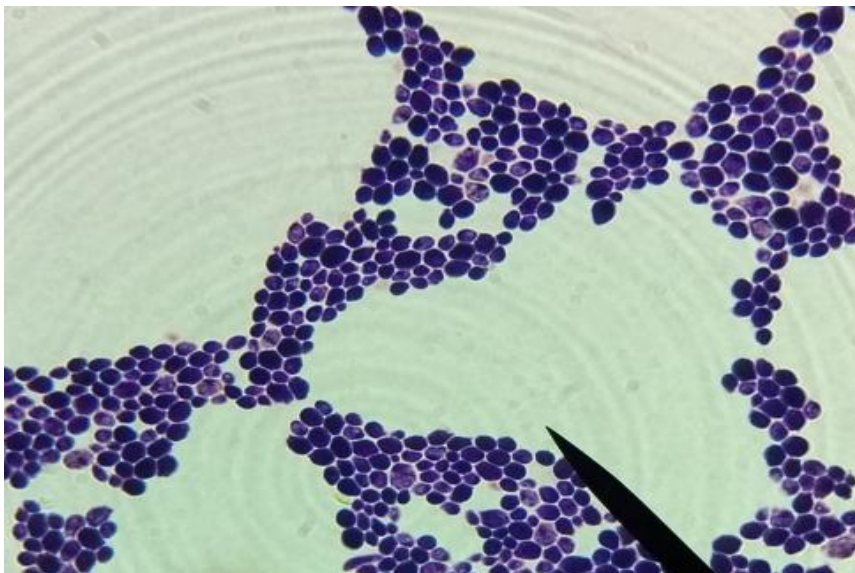


Prueba de Catalasa negativa

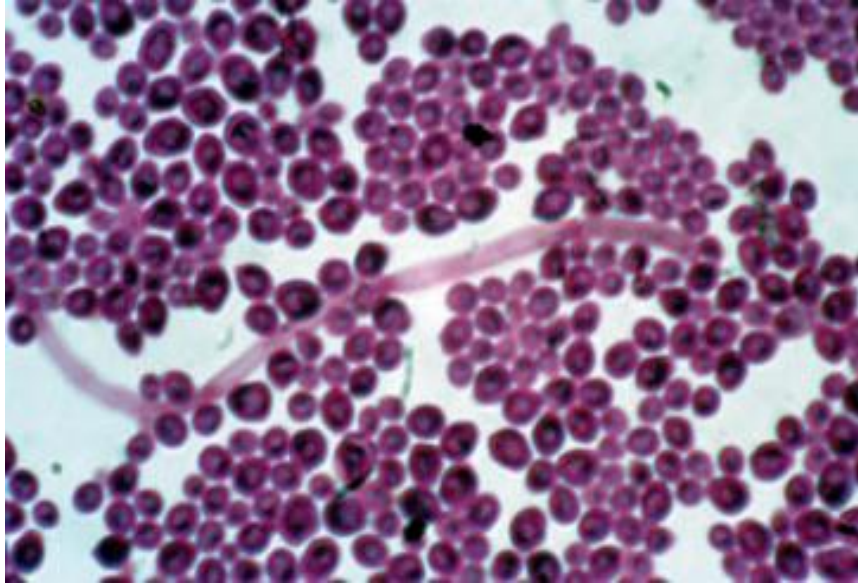


Prueba Coloracion GRAM + /

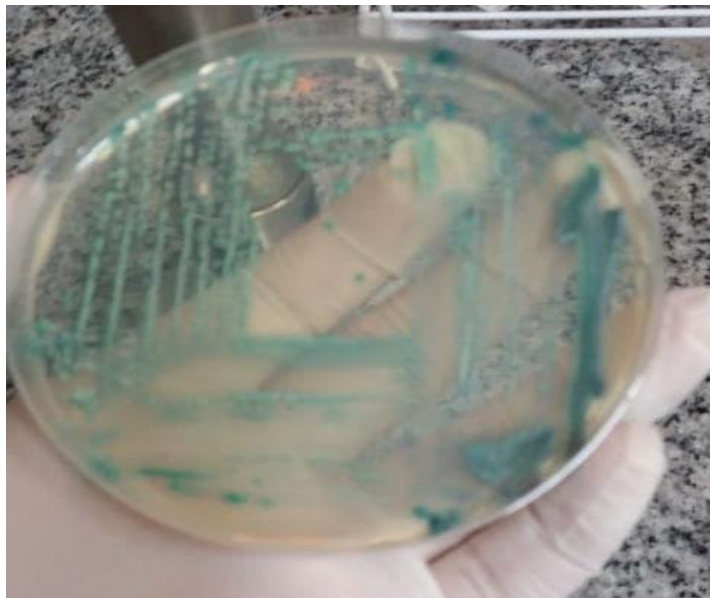
Pruebas de confirmación: *Candida albicans* ATCC 90028



Prueba Coloracion GRAM/ *Candida albicans*



Prueba de tubo germiativo/ *Candida albicans*



Medio de cultivo CHROMagar/ / *Candida albicans*

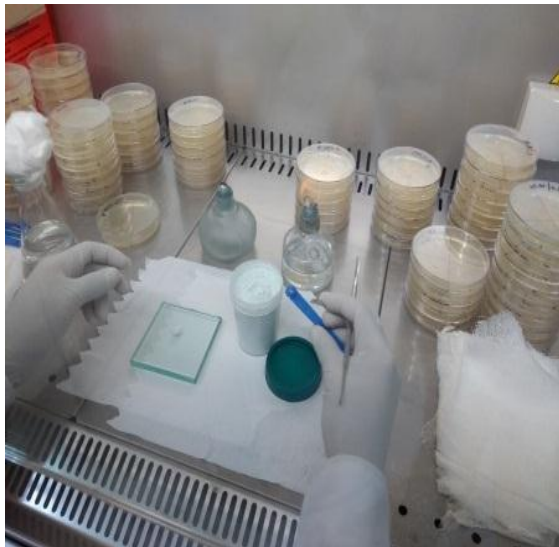
ANEXO 9

Elaboración de medios de cultivos de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.



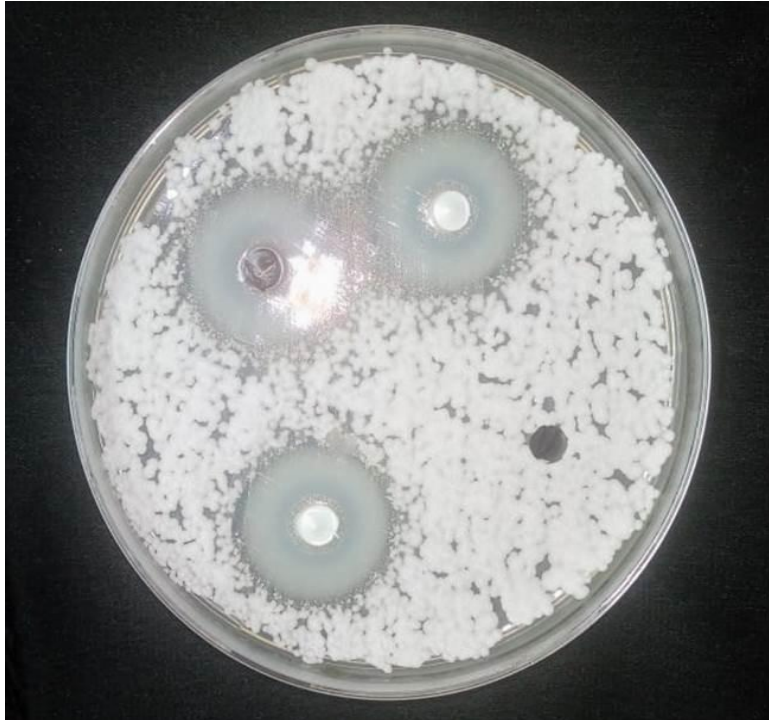
Anexo 10

Aplicación de cementos experimentales en los medios de cultivo correspondientes.



ANEXO 10

Lectura de los halos de Inhibición de *Enterococcus faecalis*



Lectura de los halos de Inhibición de *Candia albicans*

