



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

**POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD**

"Evaluación de la adherencia de *C. albicans* al poli(metacrilato de metilo) de uso dental modificado con quitosano"

Tesis presentada por:

C.D. Carolina Valeria Abeytia Gómez

En opción al grado:

Maestro en Investigación en Salud

Director de Tesis:

M. en O. Rubén Armando Cárdenas Erosa

Codirector de Tesis

Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez

Mérida, Yucatán, diciembre de 2018



UADY

UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN

"Luz, Ciencia y Verdad"

*Posgrado Institucional en
Ciencias de la Salud*

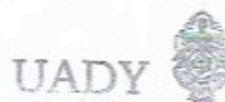
PICSA/235/18.

23 de noviembre de 2018.

La tesis "**Evaluación de la adherencia de C. albicans a acrílicos de uso dental modificado con quitosano**", presentada por la **CD. Carolina Valeria Abeytia Gómez**, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de **Maestra en Investigación en Salud**, ha sido aprobada en su contenido científico y en cuanto al cumplimiento de los establecido en el Plan de Estudios vigente del **Posgrado Institucional en Ciencias de la Salud**.

ATENTAMENTE

DRA. NORMA ELENA PEREZ HERRERA
COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD



c.c.p. Archivo

Av. Itzaes x 59 y 59 A. Facultad de Medicina. C.P. 97000 Mérida, Yucatán, México.
Tel. (999) 9240554, 9233297 Ext. 36163. <http://www.pics.uady.mx>

AGRADECIMIENTOS

Durante el proceso de realización de mi tesis de Maestría, me tocó conocer a mucha gente que apoyó y complementó mi formación a los cuales les estaré eternamente agradecida.

En primer lugar agradezco a mi familia, que siempre me ha inspirado y alentado en mi proceso de formación académica y personal.

Al Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez, que con su paciencia y dedicación me ha orientado e inspirado, no sólo en la realización de la tesis sino también en mi educación en el área de la investigación. Al Dr. Rubén Armando Cárdenas Erosa, mi mentor en la formación académica y profesional. A la Dra. Sandra Hernández Solís por apoyarme siempre y permitirme realizar parte de mi proyecto en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología y Biología molecular en la Facultad de Odontología. Al Dr. Ricardo Peñaloza Cuevas, por su incondicional apoyo durante mi formación profesional desde licenciatura hasta la fecha, y a mis revisores de tesis, por su tiempo y sugerencias para mejorar mi proyecto.

A la Universidad Autónoma de Yucatán, y a la Facultad de Odontología, que ha sido mi hogar y orgullo durante mi educación profesional, de especialidad y de Maestría. Así mismo al Posgrado Institucional en Ciencias de la Salud por permitirme desarrollarme en el ámbito de la investigación.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, que me permitió hacer uso de sus instalaciones y conocer a muchas personas que me ayudaron, el departamento de biomateriales, las técnicas Rossana Vargas y Leticia Medina, por su dedicación y asesoría, entre otros.

A mis compañeros, amigos y personas que de manera desinteresada me ayudaron a nivel personal y profesional en este camino que ha sido la tesis.

El presente trabajo se fue realizado en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. en la Unidad de Materiales haciendo uso de sus instalaciones y equipos bajo asesoría del Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez y la Q. I. Rossana Faride Vargas Coronado. Con el financiamiento de los proyectos:

1) LIBERACIÓN CONTROLADA DE DROGAS ANTIDIABÉTICAS MEDIANTE
NANOESFERAS DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES
CONACYT Proyecto 248378

2) BIOMATERIALES JERÁRQUICOS MULTIFUNCIONALES PARA LA
REGENERACIÓN DE VASOS SANGUÍNEOS
CONACYT Proyecto 1360

La metodología de adhesión fue realizada en la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, haciendo uso de sus instalaciones y equipos bajo la asesoría de la Dra. Sandra Hernández Solís y el Dr. Florencio Rueda Gordillo.

Índice

I	Introducción	1
II	Antecedentes	4
II.1	El PMMA en la odontología	4
II.2	Problemas relativos al PMMA de uso dental	8
II.3	<i>Candida albicans</i> y la Estomatitis Subprótesis	10
II.4	Quitosano como agente antifúngico	16
II.5	Adherencia microbiana	19
II.6	Ensayos mecánicos	20
III	Hipótesis	22
IV	Objetivo	23
IV.1	General	23
IV.2	Específicos	23
V	Materiales y métodos	24
V.1	Tipo y diseño del estudio	24
V.2	Muestra	24
V.3	Definición de las variables y escalas de medición	24
V.4	Criterios:	25
V.4.1	De inclusión para ensayos mecánicos:	25
V.4.2	De exclusión:	25
V.4.3	De eliminación:	25
VI	Metodología	26
VI.1	Concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés)	26
VI.1.1	Preparación de la solución del quitosano	26
VI.1.2	Preparación del inóculo de la cepa	26
VI.1.3	Microdilución en pozos (contacto cepa/quitosano)	26
VI.2	Ensayos mecánicos	27
VI.2.1	Preparación de las muestras	27

VI.2.2	Ensayos de compresión	28
VI.2.3	Ensayos de tensión	29
VI.2.4	Ensayos de flexión	30
VI.3	Ensayos de adherencia.....	32
VI.3.1	Preparación de las muestras de acrílico	32
VI.3.2	Activación de la cepa de <i>Candida albicans</i>	32
VI.3.3	Multiplicación de la cepa	33
VI.3.4	Conservación.....	33
VI.3.5	Preparación de la suspensión de <i>C. albicans</i> para el ensayo de adherencia.....	33
VI.3.6	Ensayo de adherencia.....	34
VI.3.7	Análisis de adherencia	34
VI.4	Observación en MEB	34
VI.5	Metodología para determinar la rugosidad por AFM.....	35
VII	Resultados	36
VII.1	Mínima concentración inhibitoria.....	36
VII.2	Propiedades mecánicas de los acrílicos modificados con quitosana	36
VII.2.1	Propiedades de Compresión	37
VII.2.2	Propiedades de flexión	39
VII.2.3	Propiedades de tensión.....	42
VII.3	Morfología de las superficies de fractura.....	44
VII.4	Adherencia de <i>C. albicans</i> a PMMA modificado con quitosana....	46
VII.5	Determinación de la rugosidad mediante AFM.....	48
VIII	Discusión	50
IX	Conclusiones	54
X	Recomendaciones para trabajos futuros	55
XI	Referencias bibliográficas	56

índice de figuras

Figura. 1. Opciones protésicas.....	2
Figura. 2. Formación de radicales libres de benzoilo.....	6
Figura. 3. Interacción de un radical libre con una molécula de PMMA.....	6
Figura. 4. Conversión del monómero en polímero.....	7
Figura. 5. Reacción de terminación.....	7
Figura. 6. Usos en odontología del PMMA.....	8
Figura. 7. <i>C. albicans</i> incubadas a 48 horas, observadas bajo MEB.....	11
Figura. 8. Diagrama esquemático de la pared celular de <i>C. albicans</i>	12
Figura. 9. Estructura química de la quitina y del quitosano.....	16
Figura. 10. Técnica de microdilución en placa de 96 pozos.....	27
Figura. 11. Probetas en prueba de compresión.....	28
Figura. 12. Probetas en prueba de tensión.....	30
Figura. 13. Probetas en prueba de flexión.....	31
Figura. 14. Resultados de la MCI.....	36
Figura. 15. Curva esfuerzo-deformación en compresión.....	37
Figura. 16. Variación de la resistencia a la compresión del PMMA.....	38
Figura. 17. Curva esfuerzo-desplazamiento en flexión para el PMMA.....	40
Figura. 18. Comparación de los módulos de flexión del PMMA.....	41
Figura. 19. Curva esfuerzo-deformación durante el ensayo de tensión.....	43
Figura. 20. Superficie de fractura de las probetas de tensión.....	45
Figura. 21. Imágenes de SEM con magnificación 100X.....	46
Figura. 22. Imágenes de microscopía óptica a magnificación 100X.....	47
Figura. 23. Imágenes de SEM de las superficies del PMMA.....	48
Figura. 24. Topografía de las superficies de PMMA.....	49

Indice de tablas

Tabla 1. Variables y escalas de medición.....	24
Tabla 2. Propiedades mecánicas de compresión.....	39
Tabla 3. Propiedades mecánicas de compresión.....	41
Tabla 4. Promedios y su DS de las propiedades mecánicas de tensión.....	44

Resumen

Los acrílicos dentales tienen diversos usos en odontología, en particular el poli (metacrilato de metilo) (PMMA) que se usa en la elaboración de prótesis dentales. El uso de la prótesis, al estar en contacto con la saliva, está asociado a la Estomatitis Subprotésica (ESP) cuyo principal factor etiológico es *C. albicans*, que se adhiere a la superficie porosa del acrílico (cara interna de la prótesis). Para prevenir esta adherencia, una opción es la incorporación de compuestos antifúngicos al PMMA. Por otro lado, el quitosano es un biopolímero que ha demostrado propiedades antifúngicas y antiadherentes específicamente contra *C. albicans*. En el presente estudio se demostró, la capacidad antifúngica del quitosano, a través de ensayos de mínima concentración inhibitoria (MCI) y en combinación, a diferentes concentraciones (2,5%, 5% y 10%) con el PMMA. Así mismo, se realizaron ensayos mecánicos de tensión, compresión y flexión. Resultados: en los ensayos de MIC se demostró actividad a una concentración de 500 mg/L. En los ensayos de adherencia, se encontró que en el grupo de PMMA presentó mayor promedio de células adheridas x campo (4.82) mientras que PMMA + 2.5% quitosano (0.32); PMMA + 5% quitosano (0.77); PMMA + 10% (2.42). Por otro lado, en los ensayos mecánicos de tensión y compresión se observó que no existió diferencia estadísticamente significativa entre el PMMA y las diferentes concentraciones; sin embargo, en la prueba de flexión, existió una diferencia significativa entre el grupo de PMMA y las diferentes formulaciones ($p < 0.05$), presentando estas un módulo más alto.

I Introducción

La odontología actual va dirigida a restablecer la morfología, función, comodidad, estética, habla y salud del sistema estomatognático, independientemente del grado de atrofia o lesión del mismo, siendo la pérdida de los órganos dentarios (OD) la principal causa de ésta, pudiendo alterar no sólo al sistema estomatognático, sino la salud en general (1).

Los OD se pierden por múltiples razones, siendo la caries, la enfermedad periodontal y los traumatismos las principales (2,3). Dicha pérdida puede ocasionar no solamente problemas fisiológicos y nutricionales, sino también emocionales y psicosociales, motivo por el cual es importante rehabilitarlos (4-6).

Existen diversas opciones para reemplazar los OD reconocidas como terapia dental aceptada y dependen de las circunstancias particulares de cada paciente (Figura 1). Estas incluyen:

- I Dentaduras parciales removibles: Son aquellas que están soportadas por la mucosa que reviste al hueso posterior a una extracción y los OD restantes.
- II Puentes dentosoportados: En estos, los dientes próximos al espacio edéntulo son preparados anatómicamente para recibir una prótesis que sustituye a los dientes faltantes.
- III Prótesis implantosoportada: En este caso, la prótesis es soportada mediante implantes dentales oseointegrados previamente colocados en los procesos óseo edéntulo sustituyendo los OD perdidos (2).

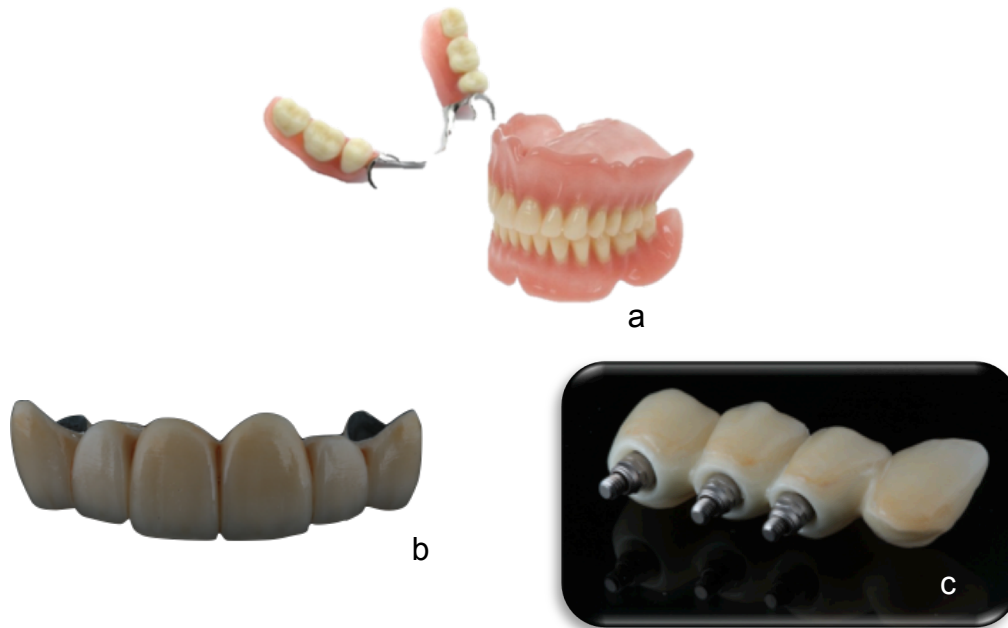


Figura 1. Opciones protésicas. a. Prótesis parciales removibles (3); b. Puente dentosoportado; c. Prótesis implantosoportada (b y c, cortesía del M.O.R. Rubén Cárdenas Vermont).

A pesar de los avances en tratamientos implantosoportados, actualmente las prótesis parciales removibles (PPR's) son altamente demandadas por los pacientes, principalmente por indicaciones terapéuticas, motivos económicos o cómo prótesis provisionales (4,5). El propósito principal de las PPR's, es la conservación de los OD remanentes y de los tejidos de soporte; el propósito secundario es sustituir los perdidos. Otras funciones incluyen a la estética, fonación y masticación (inicio de la digestión) (6).

Las PPR's son generalmente elaboradas con PMMA, son biocompatibles, estéticas, económicas, fácil de manipular y de baja toxicidad (10-11). Sin embargo, pueden causar irritación a los tejidos, debido al monómero residual, el desajuste que se produce con el tiempo debido a la reabsorción ósea, la porosidad que permite alojamiento microbiano, la contracción del material en el curado y la tendencia a absorber agua mediante el proceso de embeber (7).

Las dentaduras de PMMA, tienen en la superficie características de porosidad y aspereza inherentes, a veces agravadas por la mala manipulación en la fabricación, lo que favorece la retención mecánica de la placa dentobacteriana. La retención de la placa dentobacteriana en la prótesis contribuye a la adherencia, siendo esta el primer paso para la colonización y proliferación de microorganismos, dentro de los cuales *Candida albicans* es el que se aísla con mayor frecuencia. Éste es un hongo microscópico, patógeno y oportunista, causante de procesos infecciosos importantes en la cavidad bucal, como la estomatitis subprotésica (ESP) denominada como la forma clínica de la infección por *C. albicans* en pacientes portadores de prótesis (8).

La terapia común utilizada consiste en el uso de antifúngicos tópicos, que pueden causar efectos secundarios como resistencia microbiana y en algunos casos recidiva de la enfermedad, ya que la prótesis dental funciona como reservorio microbiano. Por esta razón, se han buscado terapias alternativas, como el uso de colutorios, soluciones desinfectantes, modificaciones de la composición del PMMA o la aplicación de barnices (8,9).

Por otro lado, el quitosano ha demostrado actividad antifúngica. Se obtiene de la desacetilación de quitina, es biocompatible, es fácilmente degradado por el organismo y posee propiedades mucoadhesivas, por lo que tiene varias aplicaciones en el área médica (como vehículo en sistemas de liberación de fármacos, en la medicina regenerativa y en la aplicación de vacunas) (9).

II Antecedentes

II.1 El PMMA en la odontología

El estudio de los materiales dentales, es una rama de la ciencia odontológica que analiza las propiedades fundamentales de los materiales para el uso bucal, desde el punto de vista fisicoquímico, mecánico y biológico, así como la correcta manipulación. Históricamente, el conocimiento de los biomateriales dentales abarca tres períodos: antiguo, 6.000 años A.C. en mesopotamia el uso empírico de los materiales; el moderno, hasta aproximadamente 1728, cuando Pierre Fouchard la define como una profesión independiente (conocimientos técnicos); y finalmente el contemporáneo, de conocimientos científicos, donde es necesario controlar la calidad definiendo reglas y propiedades (14).

Un material ampliamente utilizado en odontología es la resina acrílica, de las cuales las más utilizadas son las derivadas del ácido acrílico y del ácido metacrílico. A partir de los ésteres obtenidos de estos ácidos, al unirlos con diferentes radicales (metilo, etilo, fenilo), se obtienen los monómeros de dichas resinas (acrilato de metilo y metacrilato de metilo) (7).

El PMMA es un material termoplástico transparente que fue descubierto en 1930 por los químicos británicos Rowland Hill y John Crawford. La primera aplicación importante fue durante la segunda guerra mundial, en las ventanas de los aviones y marquesinas para las torretas de armas. Por otro lado, fueron introducidas como materiales de base para dentaduras en 1936 (10) .

Las resinas acrílicas que se usan como base para dentaduras pueden clasificarse de acuerdo con el tipo de curado (11):

- autocurado,
- termocurado,

- fotocurado.

Los polímeros que se utilizan como base para dentadura se clasifican en distintos tipos, según la ISO 20795 (12):

Tipo 1: Materiales termopolimerizables

- Clase I: polvo y líquido

-Clase II: masa plástica

Tipo 2: Materiales autopolimerizables

-Clase I: polvo y líquido

-Clase II: polvo y líquido para resinas fluidas

Tipo 3: Materiales termoplástico

Tipo 4: Materiales activados por luz

Tipo 5: Materiales de curado por microondas

Las resinas acrílicas se preparan con dos componentes físicos, el monómero líquido (metacrilato de metilo) compuesto por metacrilato de metilo, hidroquinona y dimetacrilato de etilen glicol y el polímero en polvo poli (metacrilato de metilo) compuesto por esferas prepolimerizadas de poli (metacrilato de metilo) y peróxido de benzoilo, que al mezclarse ambos da como resultado el poli (metacrilato de metilo) PMMA. El monómero disuelve parcialmente al polímero, dando una masa plástica, siendo ahí donde se produce la polimerización(7).

El polvo contiene peróxido de benzoilo, que al activarse se desdobla en dos radicales benzoicos libres (Figura 2).

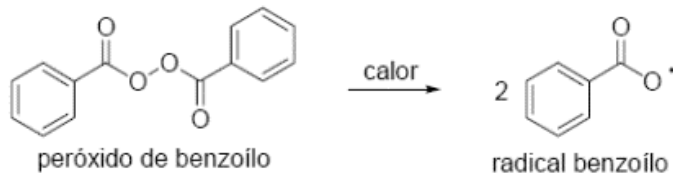


Figura 2. Formación de radicales libres de benzoilo.

Estos radicales benzoicos son capaces de reaccionar con las moléculas del monómero (metacrilato de metilo) romper la doble ligadura e iniciar el proceso de polimerización, denominado iniciación (Figura 3).

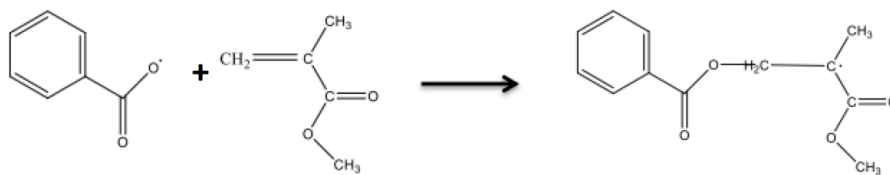


Figura 3. Interacción de un radical libre con una molécula de metacrilato de metilo.

Como se requiere una pequeña cantidad de energía una vez iniciado el desarrollo la reacción continuará en cadena a una velocidad considerable generando una reacción exotérmica (fase de propagación) hasta que todo el monómero se haya convertido a un polímero (Figura 4) (11) .

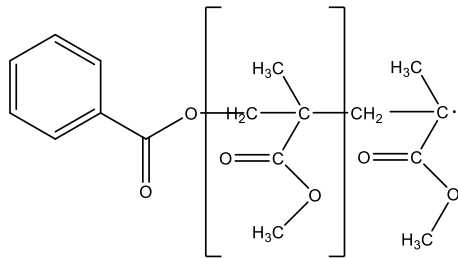


Figura 4. Conversión del monómero en polímero

La reacción en cadena termina por acoplamiento directo (ambas moléculas de polímeros se combinan y se desactivan por intercambio de energía) o por intercambio de un átomo de hidrógeno de una cadena en crecimiento a otra (Figura 5). En el último caso se produce un enlace doble en el extremo de la cadena, cuando el átomo de hidrógeno se transfiere de una cadena a otra (7)

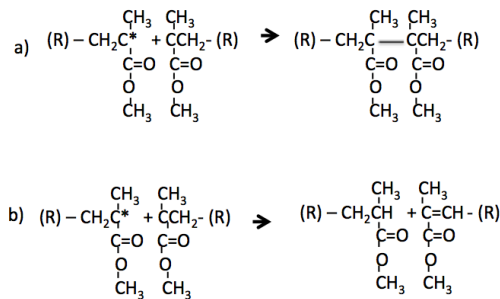


Figura 5. Reacción de terminación a. por acoplamiento directo; b. por intercambio de un átomo de hidrógeno de una cadena en crecimiento a otra.

El PMMA tiene diversos usos en odontología, entre los que destacan los aparatos ortopédicos en población pediátrica, prótesis parciales o totales removibles, obturadores protésicos, provisionales dentosoportados y prótesis de transición (Figura 6). A lo largo de la historia, se han empleado diversos materiales para la fabricación de bases para dentaduras, entre los que se encuentran la

madera, el hueso, el marfil, metales y numerosos polímeros, poli(metacrilato de metilo), poliestireno, poliamida, resina epóxica, policarbonato y vulcanita. polimetacrilato de metilo es el que ha mostrado mejores propiedades, por lo que es el más ampliamente usado..

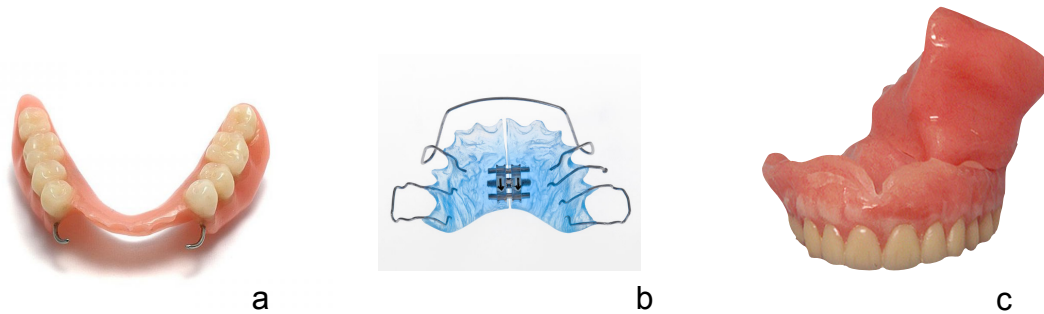


Figura 6. Usos en odontología del PMMA. a. Prótesis transicionales. b. Aparatos ortopédicos. c. Obturadores protésicos

II.2 Problemas relativos al PMMA de uso dental

El PMMA ha monopolizado el mercado de los materiales para bases protésicas desde la mitad del siglo pasado. Su gran éxito en este largo tiempo, se debe a la facilidad de uso y al bajo costo; sin embargo, presentan ciertos inconvenientes (14).

En las bases protésicas permanece cierta cantidad de monómero libre siendo 2.2% el máximo permitido, para no causar irritación a la mucosa bucal (7,13). Por otro lado, pueden absorber agua induciendo cambios dimensionales. En sentido opuesto, los materiales acrílicos experimentan contracciones de hasta un 21% (7). Por sí mismo, el metacrilato de metilo (MMA) es un antígeno incompleto (apteno) que en algunos individuos puede unirse a componente proteicos de la mucosa bucal, formando un antígeno completo que dará lugar a fenómenos alérgicos; sin embargo, esta manifestación es muy poco frecuente

(7,14).

Por otro lado, tanto la absorción de agua como la presencia de irregularidades en la cara interna de la superficie de la prótesis, favorece el desarrollo de colonias de microorganismos, especialmente *C. albicans*, provocando o manteniendo la inflamación de la mucosa subyacente. Ésta promueve el desarrollo de la ESP (inflamación crónica de origen multifactorial de la mucosa bucal) al estar en contacto con la superficie de ajuste de las prótesis (misma que no debe ser tocada, pulida o modificada) causando lesiones atróficas con presencia de zonas eritematosas o hiperplásicas, principalmente en el paladar (14).

Con el propósito de mejorar la superficie de la cara interna de las dentaduras de acrílico se han hecho diversas modificaciones:

Pecsi-Bardon y cols. (15) modificaron el acrílico de dentaduras incorporando una sal de amonio cuaternario al acrílico, encontrando que la liberación de este compuesto en las prótesis inhibía el crecimiento de *C. albicans*. Sin embargo, en este estudio no realizaron pruebas mecánicas ni de citotoxicidad. Por otro lado, se ha demostrado que el amonio cuaternario es irritante y causante de malos sabores en la cavidad oral (16).

Dhir y cols. (17) reportaron modificaciones al acrílico de dentaduras al añadir compuestos con grupos fosfatos, con el fin de evitar la adhesión de *C. albicans* al cargar su superficie con cargas aniónicas (negativas).

Nam y cols (18) evaluaron la capacidad antifúngica (contra *C. albicans*) y características físicas del acrílico de base para dentaduras (Lucitone, Denstply) combinado con nanopartículas de plata, debido a sus propiedades antisépticas. En este estudio se observó una baja en la liberación del compuesto activo después de 30 días, además de dificultades en cuanto al color.

Azevedo y cols. evaluaron la adherencia de *Candida albicans* a la superficie interna de prótesis revestida con un barniz fotopolimerizable que contenían monómeros hidrofílicos o zwitterionicos. Reportaron una disminución en la adherencia de *C. albicans*; sin embargo, al ser una capa superficial mencionan que pudiese haber un problema a largo plazo (19).

Por otro lado, Rodríguez-Santana L y cols. reportaron la copolimerización del PMMA de la base de dentaduras de microondas con el TBAEMA (2-tert-Butilaminoetil metacrilato), debido a las propiedades antimicrobianas de los grupos amino reportadas, presuponiendo que conservaría sus propiedades antifúngicas, sin embargo no reportan resultados de ensayos microbiológicos de los componentes (20).

Finalmente, también se ha evaluado la adición de partículas nanométricas de TiO₂ y SiO₂, con el fin de inducir propiedades antimicrobianas al acrílico, sin embargo, disminuyó las propiedades mecánicas del PMMA (21).

II.3 *Candida albicans* y la Estomatitis Subprótesis

El género *Candida* comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular. Solamente una docena de las especies pertenecientes al género *Candida* poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37°C, y pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre, entre las que se encuentran: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. guilliermondi*, *C. parakrusei*, *C. zeylanoides*, *C. stellatoidea* y *C. brumptii* (22).

Candida albicans suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas (Figura 7a) sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con

extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí. La forma filamentosa del hongo (hifa) (Figura 7b), es una estructura microscópica tubular, que contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes. La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar; todas las levaduras son Gram positivas, pero en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a elongada o esférica. Microscópicamente, *C. albicans* presenta dimorfismo, transformación de la forma ovoide de las blastosporas (levaduras) gemantes a hifas. Las colonias crecen *in vitro* en medios de cultivo a pH en un pH que varía entre 2.5 a 7.5, con una temperatura entre 20°C y 38°C (22).

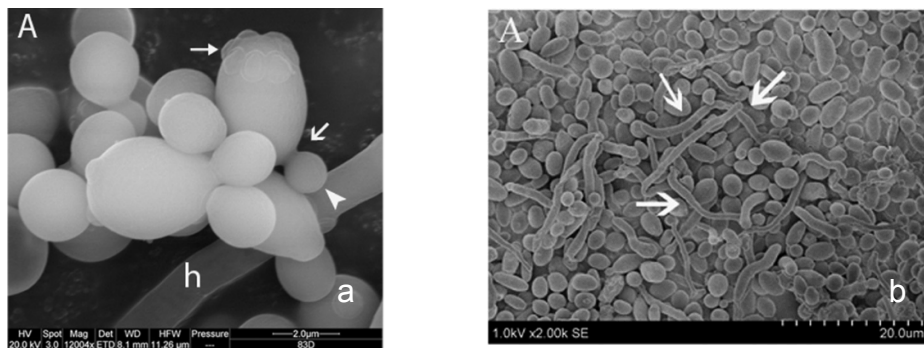


Figura 7. a. Blastoesporas de *C. albicans* incubadas a 48 horas, observadas bajo MEB. b. Morfotipo de hifa de *C. albicans* (flechas) (23).

La composición química de *C. albicans* está representada por 20-40% de proteínas y de 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable. Ésta composición depende de la edad de la cepa, del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono. La pared celular está compuesta principalmente por los polisacáridos manano (15.2- 22.9%), glucano (47%-60%) y quitina (0.6%-9%) componentes que le dan rigidez a la célula y son esenciales para la división celular, adicionalmente han sido reportados otros componentes como proteínas (6%-25%) y lípidos (1%-7%). El manano ha sido identificado como el principal antígeno de la superficie celular de *C. albicans* (24,25).

La *C. albicans* tiene una microarquitectura compleja que se ha demostrado a través de estudios ultraestructurales de la pared celular. La pared tiene un espesor variable y está compuesta por varias capas, las cuales varían con relación a diversos factores como: la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento, la capa seleccionada para su estudio, el medio de cultivo y los procedimientos de fijación. Se han descrito cinco capas dentro de la pared celular, las cuales son (de adentro hacia afuera): Manoproteínas, β -Glucán-Quitina, β -Glucán, Manoproteínas y una capa de fibrillas (Figura 8) (22).

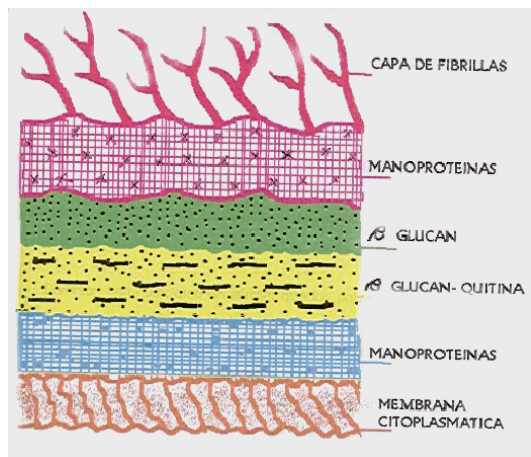


Figura 8. Diagrama esquemático de la pared celular de *C. albicans* sugerido por Calderone y Braun en 1991.

Las infecciones causadas por el género *Candida*, fueron descritas al principio del segundo siglo por Galen, como *ad aphthas albus*. Pero fue hasta el siglo XIX que la naturaleza clínica de la candidiasis oral fue definida y el agente etiológico identificado (26). *Candida albicans* es la principal especie patógena, común en humanos, que coloniza la piel y superficies mucosas de la mayoría de los individuos sanos (22). La candidiasis o candidosis, es la infección micótica oral más frecuentes, siendo la afectación por *Candida albicans* la primera forma clínica descrita históricamente. Ha recibido distintos nombres desde que Robin, en 1853, la denominó *Oidium albicans*, hasta que Berkhout propuso en 1923 el género

Candida y la especie *albicans*, que fue aceptado por el 3er Congreso Internacional de Microbiología en Nueva York en 1939 (22).

Una etapa temprana y esencial en el desarrollo de la candidiasis bucal es la colonización de la cavidad bucal por parte de *C. albicans*, un proceso que involucra la adquisición, adherencia y mantenimiento de una población estable de levaduras. La cavidad bucal posee muchos nichos para la colonización de esta especie, incluyendo entre otros: células epiteliales, prótesis dental y células bacterianas de la flora bucal residente (27).

La incidencia de candidiasis bucal varía (11-67%) (28). *C. albicans* puede estar presente como comensal en las membranas mucosas de sujetos asintomáticos, donde existe un balance entre los mecanismos de defensa del hospedero y el potencial invasivo de las levaduras. Sin embargo, cuando el sistema de defensa del hospedero se modifica, como ocurre en pacientes inmunosuprimidos, médicamente comprometidos o con alguna situación sistémica, la presencia de *C. albicans* puede derivar en el establecimiento de una candidiasis. Ésta se puede manifestar bien sea, de manera superficial, involucrando la mucosa bucal, o diseminada, la cual constituye una forma invasiva más seria. Por otro lado, existen factores que causan un desequilibrio ecológico en el hospedero, como la reducción del flujo salival, trauma local con pérdida de la integridad tisular, debilidad general, estados de malnutrición, estrés, desórdenes endocrinos como hipotiroidismo, enfermedad de Addison, diabetes mellitus, infección por VIH, alteraciones de la sangre como leucemia aguda, agranulocitosis, antibioticoterapia prolongada, quimioterapia, radioterapia, xerostomía, deficiencia de hierro, ácido fólico o vitamina B12, dieta rica en carbohidratos, uso de la prótesis dental, entre otros (25,29).

Otro factor que favorece el crecimiento de *C. albicans* es un medio ambiente ácido, que se ha observado en muestras de placa dental obtenida de prótesis removibles superiores de pacientes con ESP (30). El simple hecho de

portar una prótesis ya es un factor predisponente para la patología, ya que se crea un ambiente más cerrado y anaerobio entre la prótesis colocada en la boca y la mucosa, favoreciendo el crecimiento de *C. albicans*, pudiendo pasar de ser un hongo comensal en la mucosa a un parásito que la infecte (29).

Del mismo modo, la acción de cubrir la mucosa masticatoria con una prótesis, constituye para el tejido, una agresión mecánica no fisiológica; los efectos de presión, tracción y empuje que con ella se produce, puede causar acciones irritantes sobre la misma. Cuando estos efectos son de mayor intensidad, suponen un estímulo patógeno que rompe ese equilibrio y conduce a una irritación tisular, acompañada de reacciones inflamatorias, entre las cuales se encuentra la ESP (31).

La ESP es una respuesta inflamatoria crónica de la mucosa palatina a un estímulo perjudicial, se extiende en la mucosa de pacientes portadores de prótesis y se considera. Se como un determinante para la salud oral en dichas poblaciones (32–34). La ESP se considera una de las patologías más frecuentes en sujetos portadores de prótesis con una prevalencia que va del 27% al 70 % según diversos autores (30,33,35,36) y diversas zonas geográficas, afectando principalmente a personas de edad avanzada, asociadas al uso de prótesis y generalmente bajo tratamientos médicos o alguna condición sistémica. Algunos autores reportan al sexo femenino como el de mayor prevelencia, pudiendo deberse a los cambios hormonales (33,37).

De todos los factores, el más directamente relacionado con la ESP es la presencia de *Candida*, que está presente en la cavidad oral del 25-50% de sujetos sanos según Pires (38) y el 30-70% según Darwazeh (39). Esta proporción aumenta en pacientes portadores de prótesis removibles, desde el 34.27% (39) hasta el 60-100% (38). En pacientes diabéticos portadores, se ha encontrado una incidencia significativamente mayor de infecciones y niveles de *Candida* más altos, debido a que la glucosa en saliva de pacientes diabéticos favorece el crecimiento

de la levadura. Asociado a ello, la presencia de prótesis removible, puede reducir el pH salival, además del flujo, impidiendo el proceso de autoclisis (40). A pesar de su prevalencia, es usualmente asintomática (41).

La *Candida albicans* tiene la habilidad de adherirse y proliferar tanto en tejido blando como en superficies duras. Se ha demostrado que la *Candida* es capaz de generar una matriz extracelular (biofilm) en prótesis dentales, diferente a la que genera en otras superficies, generando mayor resistencia a los tratamientos antifúngicos. Las blastosporas de *Candida* se adhieren mejor a las células de la mucosa bucal y al acrílico de las prótesis cuando se hallan en la fase estacionaria que cuando están en la fase exponencial de crecimiento. La adherencia a las superficies plásticas (poliméricas) es mediada por fuerzas de atracción de London, van der Waals, fuerzas hidrofóbicas y fuerzas electrostáticas (29). Las bases de PMMA proporcionan alojamiento a las colonias de hongos y bacterias. Estas se han asociado a la presencia de poros microscópicos, así como a la formación de grietas (31,34). La habilidad de las especies de *Candida* para adherirse a la superficie de acrílico de las prótesis, puede conferirle acceso directo al hospedero humano, paso necesario para la colonización y desarrollo de la patogénesis, debido a lo cual, el tratamiento busca enfocarse en la reducción de la adherencia inicial (28).

Aunque la etiología puede ser multifactorial, se ha observado que *C. albicans* juega un papel importante en la etiología de este proceso infeccioso. El patrón de patogenicidad de *C. albicans*, inicia con su adherencia y multiplicación en la superficie mucosa, con la consecuente filamentación y formación de tubos germinales, incrementando la adherencia de este microorganismo a las superficies plásticas en las prótesis dentales. Una vez adherido a las superficies, el microorganismo es capaz de reproducirse, desarrollar biopelículas, penetrar en las células e invadir a los tejidos profundos, dificultando así la fagocitosis (30).

II.4 Quitosano como agente antifúngico

El quitosano (Figura 9b) es un polímero parcialmente desacetilado de acetilglucosamina, poli[β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranos] cuya estructura está basada en unidades repetitivas de D-glucosamina unidas con menos unidades N-acetyl-D-glucosamina, distribuidas aleatoriamente por medio de una unión con β -1,4-glucosídico y es usualmente obtenido en la reacción de desacetilación de la quitina, poli[β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos] (Figura 9a) (42).

La quitina es el componente orgánico más abundante en la estructura esquelética de muchas de las clases que conforman al grupo de los invertebrados. Cuando la quitina se somete a la acción de un medio alcalino muy concentrado, y a temperaturas superiores a 60° C, se produce la reacción de desacetilación, que consiste en la pérdida del resto acetilo del grupo amido del carbono 2, mientras queda un grupo amino en esa posición, obteniendo así el quitosano. El quitosano constituye el derivado más importante de la quitina y presenta propiedades significativamente diferentes a ésta (43,44).



Figura 9. a. Estructura química de la quitina; b. Estructura química del quitosano

El quitosano es un compuesto no tóxico, biodegradable, biofuncional y biocompatible con propiedades hidrofílicas (42). Es producto de la degradación es la glucosamina o la N-acetilglucosamina que se dispersa en el organismo presentando un efecto regenerativo sobre el tejido conjuntivo y acelerando la formación de osteoblastos responsables de la formación de hueso. Además posee propiedades hemostáticas, bacteriostáticas, fungistáticas, espermicidas, antitumorales, anticolesterolémicas, inmunoadyuvantes y sedantes del sistema nervioso central (44).

El quitosano es el único polisacárido catiónico natural, lo que le confiere características especiales que lo hacen útil en numerosas aplicaciones: es un polielectrolito lineal, con alta densidad de carga positiva con capacidad para adherirse a materiales cargados negativamente y, por esto último, convertirse en un excelente floculante; se enlaza con superficies celulares, pudiéndose usar para el cuidado de la piel, el cabello, entre otros (45).

El peso molecular del quitosano para productos comerciales depende de las condiciones de procesamiento y de los grados de deacetilación, encontrándose (entre 10-1000 kDa). El quitosano se clasifica en tres tipos: L/M/H (L, bajo; M, mediano y H, Alto) según el peso molecular. La fracción molar de las unidades desacetiladas (glucosamina), definen el grado de desacetilación, que normalmente se encuentra entre 70-90% (43).

Los ensayos de citocompatibilidad *in vitro* de cultivos celulares sobre quitosano han demostrado, en general, la excelente citocompatibilidad. Las células se sienten atraídas por éste polisacárido, se adhieren fuertemente a él y, en general, proliferan adecuadamente. Debido a esto se considera un componente muy prometedor de sistemas de andamiaje en ingeniería de tejidos (48).

El quitosano ha demostrado ser osteo y neocondrogénico, puede soportar y modular el crecimiento y proliferación de células vasculares, neuronales,

fibroblastos, células epiteliales o queratinocitos, además de osteoblastos y condrocitos, así como detectar los factores de crecimiento y estimular la producción de citocinas y colágeno. Promueven también el proceso de angiogénesis, característica que promover el proceso de coagulación y de cicatrizado, estimulando la formación de tejido de granulación y la reepitelización. Se cree que es, el carácter catiónico lo que le confiere estas propiedades frente a las células (42,44).

Pese a todos estos beneficios, algunas limitaciones del quitosano son:

- Solubilidad en pH neutro limitada.
- Degradación rápida y fácil *in vivo*
- Naturaleza policatiónica causante de trombosis, agregación de glóbulos rojos y hemólisis.
- Pobres propiedades mecánicas (47,48).

El quitosano ha sido probado como agente antimicrobiano por diversos autores, contra cepas de *C. albicans* (46), *C. krusei*, *C. glabrata* (47), *Streptococcus mutans* (48), entre otros. Así mismo, se ha reportado que el quitosano, debido a su origen policatiónico, modifica la hidrofobicidad de la pared celular de *C. albicans*, originando complejos polielectrolitos, donde prevalecen fuerzas electrostáticas asociadas con el potencial zeta. *Cándida albicans*, a 37°C es típicamente hidrofílica, siendo capaz de transformarse espontáneamente en hidrofóbica, mientras que las moléculas hidrofílicas interactúan, mediante receptores tipo adhesinas donde abundan los macrófagos. La mayor capacidad de adherir de las moléculas hidrofóbicas, está con relación a un aumento de la energía libre de la superficie, que depende de las interfases entre líquido-microorganismo y sólido-líquido, cuando son reemplazadas por microorganismos sólidos. Si bien la etapa inicial de las moléculas hidrofóbicas no requieren de receptores específicos, la estructura compleja de la pared celular constituida principalmente por glucanos, quitina y especialmente por manoproteínas con

funciones enzimáticas y de ligando-receptor, posibilitaría la unión a las células epiteliales de la mucosa (49).

II.5 Adherencia microbiana

Existen varios componentes en el sistema de defensa del hospedero que protegen contra infecciones causadas por *C. albicans* (50), además de una barrera tegumentaria intacta, que comprende piel y mucosas. Sin embargo, cuando esta barrera pierde la integridad, como ocurre con el tejido adelgazado que se encuentra en contacto con la prótesis, la adhesión de patógenos se favorece (51). La adhesión del hongo a las superficies duras o epiteliales de la cavidad oral incluye movimientos activos de quimiotaxis, variaciones en la energía libre de superficie, potencial zeta y la hidrofobicidad. El fenómeno de adherencia constituye un proceso clave necesario para la colonización de las levaduras. No todas las *Candida* spp poseen capacidad para adherir e infectar dichas superficies mucosas. *C. albicans*, que se encuentra comúnmente en la cavidad oral, presenta una gran habilidad para adherir y consecuentemente producir candidosis oral (49). Los mecanismos de adhesión de los microorganismos han sido estudiados y en general se reconocen cuatro etapas que son aceptadas:

1. Transporte a la superficie: ocurre por difusión (movimientos brownianos) o movimiento activo como la quimiostaxis.

2. Adhesión inicial: a una distancia de separación aproximadamente de 50 nm, el microorganismo es atraído a la superficie por fuerzas de Van der Waals.

3. Acoplamiento: la pared celular de *C. albicans* tiene dos funciones principales: mantener la forma de la célula y la de interactuar con el ambiente externo. Se han identificados ciertos componentes específicos en la superficie celular, que involucran la adhesión del microorganismo. La estructura de la pared celular es compleja, con al menos cinco capas descritas anteriormente. El principal antígeno de la pared celular es el manano, unido covalentemente a proteínas para formar manoproteínas. Dichas moléculas tienen acciones enzimáticas así como

funciones de ligando-receptor. Las proteínas tipo CR3 de *C. albicans* están implicadas como receptores endoteliales y el CR2 promueve la adhesión a sustratos plásticos. También se ha encontrado que el tubo germinal de *C. albicans*, produce una superficie fibrilar, responsable de favorecer la adhesión a las placas de poliestireno de las cajas de Petri.

4. Colonización: En esta etapa, los microorganismos crecen y forman placas, que son comúnmente llamadas *in vitro* como "biofilm". Es en esta etapa en la cual puede ocurrir interacción con otros microorganismos. En las etapas iniciales, dependen de la energía libre superficial y de la rugosidad del material. (52).

En el campo de la odontología, el quitosano ha sido utilizado en estudios para la prevención de la caries dental y por sus propiedades bactericidas y bacteriostáticas. La interacción entre los grupos amino positivos en el quitosano con las superficies de las células microbianas con carga negativa, resultan en la pérdida de la función de barrera de las paredes celulares y la filtración de material intracelular y proteico. Además, se ha sugerido que el quitosano es un polímero bioadhesivo que permanece por un largo período en la mucosa oral (9).

II.6 Ensayos mecánicos

El conocimiento de las propiedades mecánicas de los diferentes materiales dentales es crucial para la selección y el diseño de las restauraciones, ya que están sujetos a un ambiente hostil, en el cual el pH, el flujo salival y la carga mecánica fluctúa constante y rápidamente, causando fatiga del material (53). Ninguna propiedad mecánica define por sí sola la calidad del material. A menudo, diversas propiedades, determinadas mediante pruebas de laboratorio estandarizadas, son utilizadas para describir la calidad. Las pruebas de laboratorio, siendo substitutos de estudios clínicos, proveen medidas estandarizadas para la comparación de los materiales y guías para la interpretación en el uso clínico. En cuanto al PMMA de uso dental, las pruebas

normalmente evaluadas son: resistencia a la flexión, tensión flexural y resistencia a la compresión (7,53).

III. Hipótesis

El quitosano de bajo peso molecular, adicionado al PMMA de uso dental inhibe la adherencia de *C. albicans*.

III Objetivo

III.1 General

Evaluar la adherencia de *C. albicans* al PMMA de uso dental adicionado con quitosano.

III.2 Específicos

1. Determinar la capacidad antifúngica del quitosano de bajo peso molecular que se utilizará en los ensayos contra *C. albicans* mediante la determinación de la mínima concentración inhibitoria (MCI).

2. Modificar el PMMA con quitosano de bajo peso molecular al 2.5%, 5% y 10%.

3. Caracterizar mecánicamente el PMMA modificado con quitosano mediante ensayos de flexión, tensión y compresión de acuerdo a las norma ISO 5833, 20795 y ASTM D-638.

4. Determinar el tipo de fractura mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)

5. Determinar la rugosidad de las muestras de PMMA y las modificadas con quitosano, mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).

6. Analizar la adherencia de *C. albicans* a las superficies de PMMA y las modificadas con quitosano a diferentes concentraciones.

IV Materiales y métodos

IV.1 Tipo y diseño del estudio

Experimental, analítico, transversal

IV.2 Muestra

Probetas elaboradas con base a PMMA de uso dental modificadas con quitosana de bajo peso molecular a diferentes concentraciones (2.5%, 5% y 10%). El número de probetas dependerá de la prueba a ser realizada.

IV.3 Definición de las variables y escalas de medición

Tabla 1. Tabla de variables y escalas de medición.

Variable	Tipo	Escala de medición	Unidad de medida	Instrumento de medición
Actividad antifúngica del LMWC	Dependiente	Cuantitativa	mg/mL	Técnica de microdilución
Módulo de flexión	Dependiente	Cuantitativa	MPa	Máquina de pruebas universal
Resistencia a la flexión	Dependiente	Cuantitativa	MPa	Máquina de pruebas universal
Módulo de tensión	Dependiente	Cuantitativa	MPa	Máquina de pruebas universal
Resistencia a la tensión	Dependiente	Cuantitativa	MPa	Máquina de pruebas universal
Módulo de	Dependiente	Cuantitativa	MPa	Máquina de

compresión				pruebas universal
Resistencia a la compresión	Dependiente	Cuantitativa	MPa	Máquina de pruebas universal
Adherencia de <i>C. albicans</i>	Dependiente	Cuantitativa	UFC	Microscopio
Rugosidad del PMMA	Dependiente	Cuantitativa	rms	AFM

IV.4 Criterios:

IV.4.1 De inclusión para ensayos mecánicos:

Probetas que cumplan con las características especificadas en las normas ISO 5833, 20795 y ASTM D-638.

IV.4.2 De exclusión:

Especímenes que no cumplan con las características especificadas en la norma ISO 5833, 20795 y ASTM D-638 respectivamente.

IV.4.3 De eliminación:

Especímenes con defectos visibles en las zonas de prueba, como burbujas o grietas

V Metodología

V.1 Concentración mínima inhibitoria

V.1.1 Preparación de la solución del quitosano

Se preparó una solución de ácido acético con 250 μ l de ácido acético y 750 μ l de agua destilada. Se preparó una solución de quitosano con una concentración de 40000 mg/L. A partir de la cual se prepararon las diferentes concentraciones a evaluar: 1000 mg/L; 500 mg/L; 250 mg/L; 125 mg/L; 62.5 mg/L; 31.25 mg/L y 15.62 mg/L (54).

V.1.2 Preparación del inóculo de la cepa

Se utilizaron cepas con 24 h de incubación a 37°C en Agar Dextrosa Sabouraud. Se tomaron 5 colonias aproximadamente y se suspendieron en 5 ml de agua destilada estéril. Se ajustó la solución a 0.5 McFarland, lo cual tuvo una densidad de 1.5×10^8 UFC/mL.

Por medio de una dilución se obtuvo una concentración de 1.5×10^6 UFC/mL, a partir del cual se preparó el inóculo para obtener una concentración final de 5×10^5 UFC/mL + medio RPMI pH 4.

V.1.3 Microdilución en pozos (contacto cepa/quitosano)

A partir de las soluciones preparadas, se comenzó la microdilución en microplacas estériles de 96 pocillos para evaluar las propiedades antifúngicas del quitosano de bajo peso molecular, como se muestra en la figura 10. Se realizaron diluciones seriadas por triplicado. Se utilizó el reactivo XTT al 1 % (2,3,5-Triphenyl-

2 H-tetrazolium Chloride, J.T. Baker) para la tinción y una prueba de réplica para confirmar los resultados (55).

a 1000 mg/L
b 500 mg/L
c 250 mg/L
d 125 mg/L

d 62.5 mg/L
f 31.85 mg/L
g 15.62 mg/L
h 7.81 mg/L

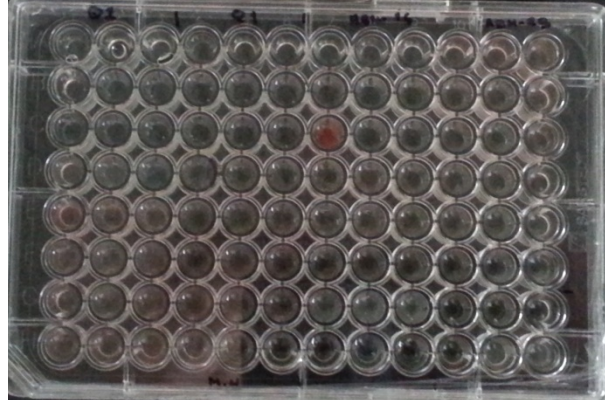


Figura 10. Técnica de microdilución en placa de 96 pozos.

V.2 Ensayos mecánicos

V.2.1 Preparación de las muestras

Se molió la quitosana durante 2 horas y posteriormente se tamizó a un grosor de $105\ \mu$ con el fin de obtener el tamaño de las partículas más homogéneo. De acuerdo a cada tipo de ensayo y sus especificaciones, se prepararon el número de probetas requeridas en cada norma, mezclando 30 g de polvo con 15 g de líquido a una temperatura de 4.4°C , de acuerdo a las instrucciones del fabricante (NIC TONE). Las muestras modificadas con quitosano a las diferentes concentraciones fueron modificadas en el polvo. La porción del líquido permaneció igual. Para la preparación de las muestras se hicieron moldes de teflón con las características de cada probeta y se vertió la mezcla sobre los moldes para ser prensado en una prensa hidráulica. Posterior a 1h fueron retirados de los moldes y se analizaron y retiraron excedentes. Las muestras se dejaron en agua destilada durante 7 días para eliminar el exceso de monómero residual (56).

V.2.2 Ensayos de compresión

Cuando un objeto es sometido a pruebas de compresión, la falla puede ocurrir como resultado de diversos esfuerzos en dicho objeto. Las fuerzas de compresión son aplicadas a cada extremo del objeto, por lo que es importante adoptar medidas y dimensiones estandarizadas para obtener resultados reproducibles. El objeto a probar deberá tener una forma cilíndrica y tener el doble de largo que de diámetro para resultados más reproducibles y satisfactorios (53).

El PMMA fue preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante con el objeto de obtener muestras cilíndricas. Después de la mezcla del polvo con el líquido, la pasta se colocó en moldes de teflón con formas cilíndricas (12 mm \pm 0.1mm de alto; 6 mm \pm 0.1mm de diámetro) Figura 11.

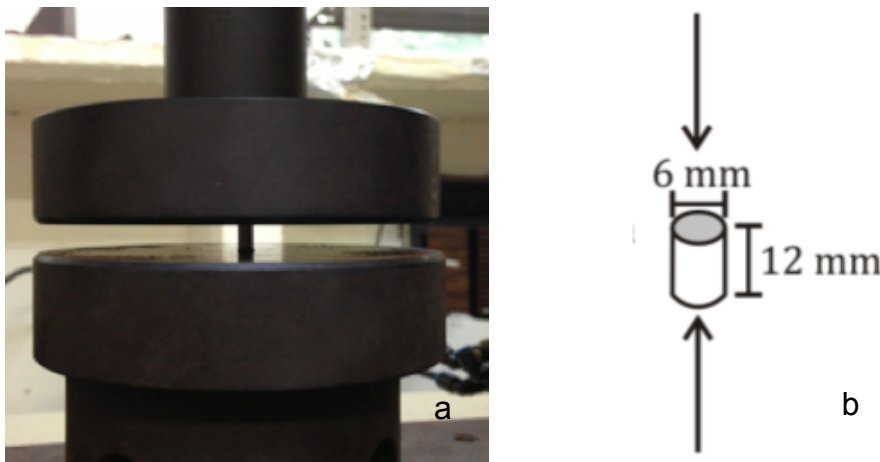


Figura 11. a. Probetas en prueba de compresión. b. Diagrama esquemático de las probetas de compresión

El molde se colocó entre dos placas de teflón en una prensa durante 1 h. Una vez concluido el tiempo, se retiraron los cilindros del molde y se midieron las dimensiones con un Vernier, se les dio un acabado con papel metalográfico en caso de ser necesario para obtener las medidas requeridas. Veinticuatro horas después del mezclado, se midió el diámetro y altura promedio de cada cilindro en

al menos 2 partes de éste. El cilindro obtenido se colocó en la Shimadzu AG1-100 con una celda de carga de 5 kN y se deformó, utilizando una velocidad constante de 20 mm/min. Cuando el cilindro se fractura o cuando la carga se mantenga constante, se detuvo la prueba. Este ensayo fue realizado con probetas de PMMA y probetas de PMMA adicionadas con quitosano tamizado, usando una malla de 105 μm con el fin de obtener partículas monodispersas. Se reporta el promedio de al menos 5 repeticiones.

V.2.3 Ensayos de tensión

El módulo elástico, es una propiedad mecánica de los materiales, considerada para la caracterización. Para ello, las probetas son sometidas a una fuerza axial por medio de una máquina de pruebas universales, que al incrementar la carga, el material se deforma aumentando su longitud (57). Los esfuerzos del área de sección transversal de la muestra con respecto a su deformación unitaria y la pendiente de la curva en la zona elástica corresponde al módulo de elasticidad. Además del módulo elástico se pueden obtener otras propiedades como el esfuerzo último, tenacidad, y comportamiento que puede ser dúctil, frágil, elastómero, etc. (58).

Para obtener a muestra, se virtió el polvo al líquido sobre moldes de teflón en forma de mancuerna con dimensiones de $75 \pm 0.1\text{mm}$ de largo; $3.3 \pm 0.1\text{mm}$ de grosor y $5 \pm 0.1\text{mm}$ de ancho dejándola bajo presión, en una prensa durante 1 h (Figura 12).

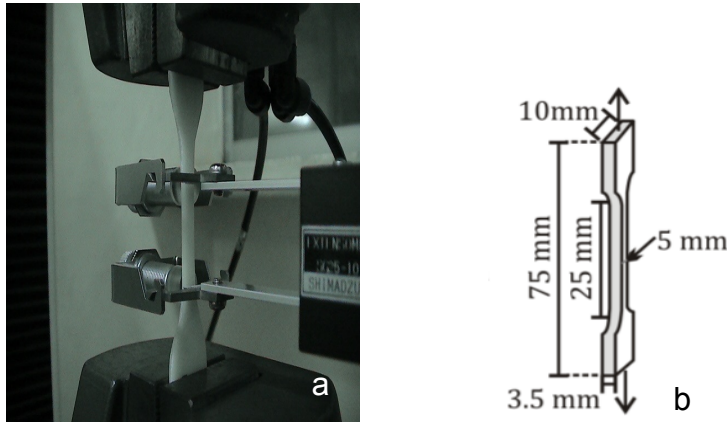


Figura 12. a. Probetas en prueba de tensión. b. Diagrama esquemático de las probetas de tensión.

Una vez concluido el tiempo, se retiraron los especímenes del molde, se obtuvieron las dimensiones con un Vernier y se les dio un acabado con papel metalográfico, en caso de ser necesario, para obtener las medidas requeridas. Se colocaron las probetas en la Shimadzu AG1-100® con una celda de carga de 5 kN, teniendo cuidado de alinear el eje longitudinal de la muestra a las mordazas. Este ensayo se realizó utilizando una velocidad de cabezal de 5 mm/min y se detuvo la prueba cuando la probeta se fracturó. Los resultados fueron expresados en MPa y se realizó un promedio de 5 probetas (59). Esta prueba fue realizada con probetas de PMMA y con probetas de PMMA adicionadas con quitosano.

V.2.4 Ensayos de flexión

Esta prueba determina no sólo la resistencia del material, también determina la distorsión esperada. En este tipo de prueba es preferible utilizar la prueba de flexión de cuatro puntos que la de tres puntos para medir el módulo de flexión y la resistencia a la flexión, ya que evita la deformación por esfuerzo localizado, aplicando una carga más uniforme (7). La resistencia a la flexión del PMMA es importante en prótesis, ya que debido a la reabsorción gradual del tejido óseo, deja a las prótesis con un soporte irregular (60,61).

La pasta de acrílico fue colocada en moldes de teflón y moldeada bajo presión durante 1 h para obtener las dimensiones requeridas por la norma ISO 5833 para pruebas de flexión (75 mm de largo, 10 mm de ancho y 3.5 mm de grosor) Figura 13 .

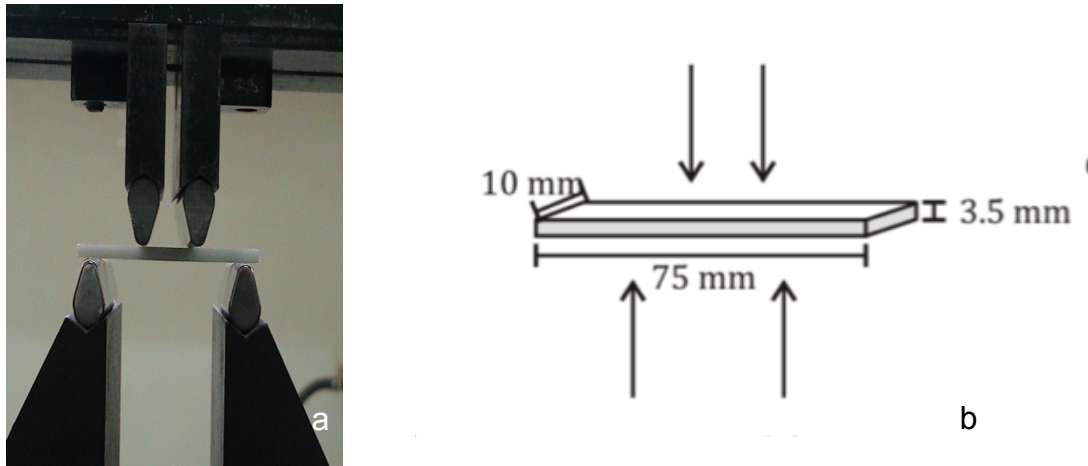


Figura 13. a. Probetas en prueba de flexión. b. Diagrama esquemático de las probetas de flexión.

Una vez concluido el tiempo, se retiraron las probetas del molde, se midieron con un Vernier y se pulieron con papel metalográfico en caso de ser necesario para obtener las medidas requeridas. La barra obtenida se colocó en la Shimadzu AG1-100 y se programó para incrementar la fuerza desde cero, utilizando una velocidad de $5 \text{ mm/min} \pm 1 \text{ mm/min}$. Se registró la deflexión de la probeta como una función de fuerza aplicada. La prueba se detuvo hasta ocurrir la fractura.

V.3 Ensayos de adherencia

V.3.1 Preparación de las muestras de acrílico

Las muestras empleadas fueron placas de 10mm x 10mm x 1mm de espesor. Se evaluaron 4 grupos: Grupo 1: control, poli(metacrilato de metilo) transparente (PMMA) NIC TONE; Grupo 2: PMMA con 2.5% en peso de quitosano; Grupo 3: PMMA con 5% de quitosano; Grupo 4: PMMA con 10% de quitosano.

Se molió el quitosano durante 2 horas y posteriormente se tamizó a un grosor de 105 μ con el fin de obtener el tamaño de las partículas más homogéneo. Se prepararon 10 muestras de cada grupo mezclando 30 g de polvo con 15 g de líquido a una temperatura de 4.4°C, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (NIC TONE®). Las muestras modificadas con quitosano a las diferentes concentraciones fueron modificadas en proporción en el polvo. La porción del líquido permaneció igual. Para la preparación de las muestras se hicieron moldes de cera (10x10x1 mm) y se colocaron en una mufla dental con yeso tipo III. La cera fue eliminada con la ayuda de agua caliente y un vaporizador. Posteriormente se colocó la mezcla del acrílico con una proporción de polímero:monómero de 2:1 p/p. Para los grupos experimentales se añadió el 2.5%, 5% y 10% respectivamente de quitosano sustituyendo esta proporción del polímero. Las muestras se dejaron en agua destilada durante 7 días para eliminar el exceso de monómero residual (56).

V.3.2 Activación de la cepa de *Candida albicans* (ATCC® 10231™).

La *Candida albicans* se colocó en 1.0 mL de agua destilada (obtenida de otro tubo con 5 a 6 mL de agua destilada estéril) y se mezcló para formar una suspensión. De manera aséptica, se regresó la suspensión al tubo de agua destilada estéril y se dejó reposar durante 2 h a una temperatura de 25°C para su

rehidratación. Posteriormente se mezcló la suspensión y se tomaron 50 µL para luego depositarlo en una caja Petri con Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) y sembrar mediante el método de estría simple. Se dejó incubar a una temperatura de 35°-37°C durante 24 horas cómo indica la hoja técnica de ATCC (62).

V.3.3 Multiplicación de la cepa

De la caja Petri dónde se activó la cepa de *Candida albicans* (ATCC® 10231™) se tomó con un asa de niquel-cromo (NiCr) una porción de la siembra del microorganismo y se resembró por método de estría múltiple en cajas Petri con el medio ADS. Esto se realizó por triplicado y se dejó en una estufa de incubación a 35°-37°C durante 24 h (63).

V.3.4 Conservación

Una vez transcurrido el tiempo, se tomaron 5 colonias diferentes con un diámetro de 1 mm, con la ayuda de un asa de NiCr y se transfirió a un tubo de crio preservación conteniendo 1 mL de Caldo Dextrosa Sabouraud por cada tubo. Se conservaron los tubos inoculados en el ultracongelador Glacier NU-9483 NuAire® a una temperatura de -80°C según las indicaciones del ATCC (63).

V.3.5 Preparación de la suspensión de *C. albicans* para el ensayo de adherencia

La cepa de *Candida albicans* (ATCC® 10231™) se reactivó en una placa con ADS durante 48 h a 37°C. Se tomaron 4 colonias y se colocaron en caldo Dextrosa Sabouraud y se incubó durante 24 h a 37°C. El cultivo fue centrifugado a 3,000 rpm durante 10 minutos y el sedimento lavado dos veces con buffer PBS (0.15 M, pH 7.3). Posteriormente se obtuvo una concentración final de 1 x10⁶ UFC/mL con PBS (56).

V.3.6 Ensayo de adherencia

Las muestras de acrílico fueron esterilizadas por medio de una campana UV durante 5 minutos por lado. Se colocaron 2 muestras en cada pozo de la microplaca de 6 pozos. Se añadieron 10 mL de la suspensión final y se incubó a 37°C durante 60 min. (64). Posteriormente las muestras fueron retiradas de la incubadora, las levaduras no adheridas fueron removidas con 2 lavados suaves de PBS para después ser sumergidos en PBS con 1.5% de glutaraldehído para su fijación, durante 90 minutos. Las muestras fueron lavadas con agua desionizada estéril y se dejaron secar. Para la tinción se utilizó la técnica de tinción de Gram (64).

V.3.7 Análisis de adherencia

Las muestras fueron analizadas bajo microscopio binocular biológico CX-31 Olympus® con una magnificación de 100x y se realizó el conteo de células de *C. albicans* adherida. Se tomaron 40 campos al azar, y se obtuvo un promedio.

V.4 Observación en MEB

Las muestras de tensión fracturadas, fueron recortadas a 5 mm de la zona de fractura. Dichas muestras fueron cubiertas con una capa de oro por aproximadamente 15 min (dicho metalizado es indispensable por que además de hacer conductiva la superficie, elimina la electricidad estática, minimiza el daño por radiación y aumenta la reflectividad electrónica) para posteriormente ser montadas en el MEB y observar la superficie a un magnificación 100X (8).

V.5 Metodología para determinar la rugosidad por AFM

Se tomó una muestra aparte de cada grupo de PMMA realizadas para la muestra de adherencia y se observó la superficie a través de imágenes obtenidas por un microscopio de fuerza atómica (AFM, Ambios Universal) con un cantiliver de SiN y una punta de 10 nm de radio en un modo de no contacto. Las imágenes fueron tomadas con una resolución de 512 x 512 píxeles² para su observación.

VI Resultados

VI.1 Mínima concentración inhibitoria

Para comprobar la actividad antifúngica del quitosano se realizó la prueba de MCI, cuya actividad se demostró a partir de una concentración de 500 mg/L, teniendo una concentración de ácido acético de 0.31%. Mediante esta prueba se comprobó el efecto antifúngico del quitosano de bajo peso molecular a utilizar (Figura14).

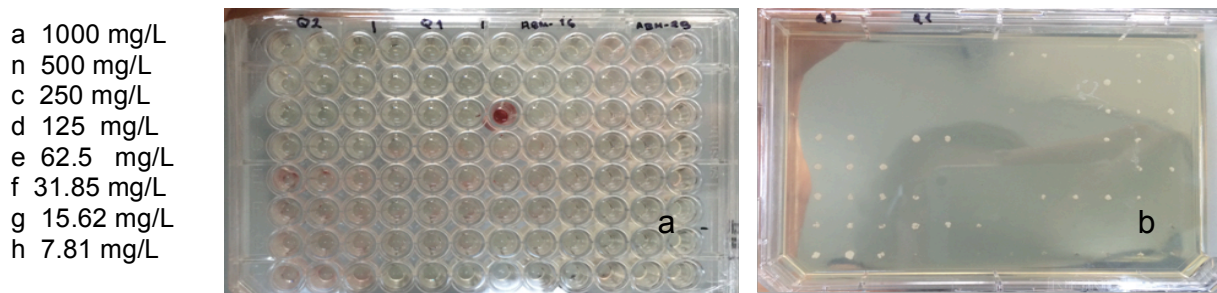


Figura 14. Resultados de la MCI. a. Placa de microdilución a las 24 h. b. réplica inoculada.

VI.2 Propiedades mecánicas de los acrílicos modificados con quitosana

Debido a que las prótesis acrílicas tienen la función de sustituir las piezas dentarias, y por ende las fuerzas masticatorias que pueden variar de 100 a 500 N, es importante medir sus propiedades mecánicas, ya que están sujetas a las fuerzas intraorales que causan fatiga del material (61,65) (66).

VI.2.1 Propiedades de Compresión

Las curvas esfuerzo-deformación durante el ensayo de compresión para PMMA y las diferentes formulaciones se muestra en la figura 15.

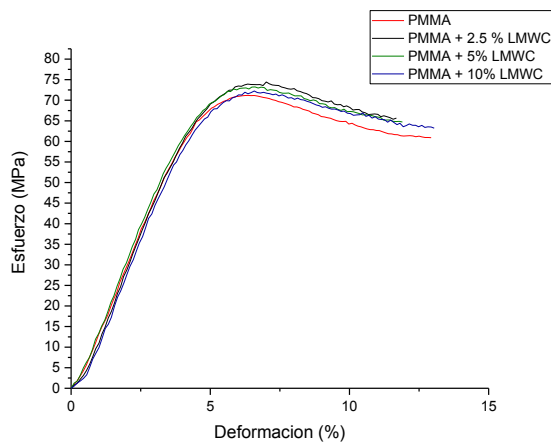


Figura 15. Curva esfuerzo-deformación en compresión para el PMMA y las diferentes formulaciones.

Se obtuvo un módulo de compresión de 1571.97 ± 65.83 MPa para el PMMA sin modificar. La curva esfuerzo vs. deformación, mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo (σ_{\max}) de 69.47 ± 2.63 MPa, deteniéndose la prueba a una deformación de 6.89 ± 0.86 % mientras que para la muestra PMMA + 2.5% de quitosana se obtuvo un módulo de compresión de 1634.08 ± 89.01 MPa y la curva esfuerzo vs. deformación mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo de $\sigma_{\max} = 70.56 \pm 2.43$ MPa.

Cuando se añadió 5% de quitosana, se obtuvo un módulo de compresión de 1557.73 ± 67.82 MPa. La curva esfuerzo vs. deformación mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo (σ_{\max}) 67.89 ± 3.32 MPa.

Finalmente, cuando se agregó 10% de quitosana, se obtuvo un módulo de compresión de 1638.81 ± 102.76 MPa. La curva esfuerzo vs. deformación mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo (σ_{max}) 68.35 ± 2.93 MPa.

Los resultados obtenidos no cumplen con la norma ISO 5833, ya que no todas tienen una resistencia a la compresión mayor a 70 MPa (Tabla 1). Sin embargo, la variación entre el grupo control y las diferentes formulaciones se encuentran dentro del mismo intervalo (Fig. 16). Para evaluar si existió una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los demás grupos se realizó una prueba de ANOVA en el programa IBM SPSS versión 22, y se encontró que no existió dicha diferencia entre ninguno de los grupos.

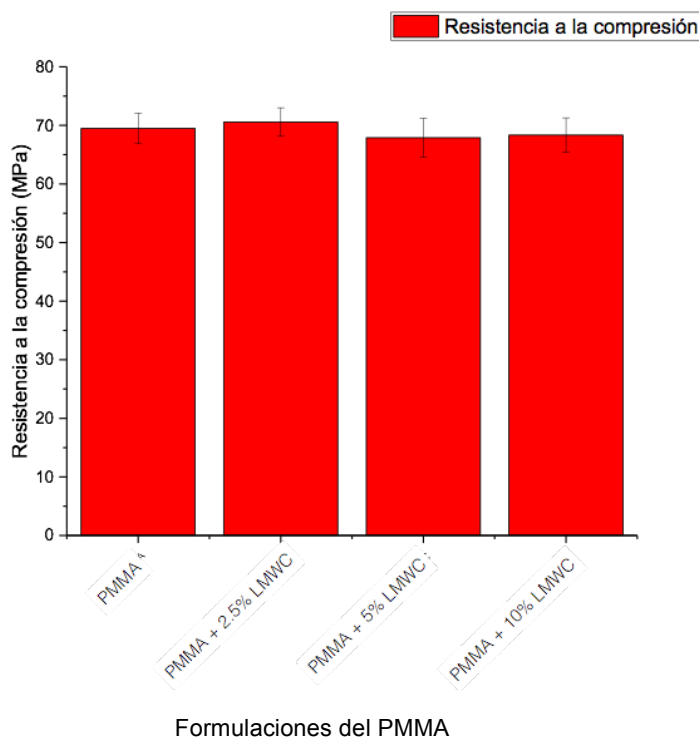


Figura 16. Variación de la resistencia a la compresión del PMMA modificado con quitosano a distintas concentraciones.

Tabla 2. Tabla comparativa de las propiedades mecánicas de compresión en las diferentes formulaciones.

Propiedad	PMMA	PMMA + 2.5 % LMWC	PMMA + 5 % LMWC	PMMA + 10 % LMWC
Módulo elástico (MPa)	1571.97 ± 65.83	1634.08 ± 89.01	1557.73 ± 67.82	1638.81 ± 102.76
Deformación (%)	6.89 ± 0.86	6.74 ± 0.57	6.38 ± 0.18	6.62 ± 0.17
Esfuerzo máximo (MPa)	69.47 ± 2.63	70.56 ± 2.43	67.89 ± 3.32	68.35 ± 2.93

VI.2.2 Propiedades de flexión

El PMMA sin modificar mostró un módulo de flexión de 1883 ± 185.67 MPa. La curva esfuerzo vs. deformación mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo (σ_{\max}) 50.91 ± 3.51 MPa, deteniéndose la prueba a la fractura, con un desplazamiento 3.39 ± 0.43 mm.

El acrílico con 2.5% de quitosana mostró un módulo de flexión de 2156 ± 44.62 MPa. La curva esfuerzo vs. desplazamiento mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo (σ_{\max}) 40.58 ± 2.88 MPa, deteniéndose la prueba a la fractura en 2.25 ± 0.19 mm. Cuando se añadió, quitosano al 5% se obtuvo un módulo de flexión de 2164 ± 126.40 MPa. La curva esfuerzo vs. desplazamiento mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo (σ_{\max}) 47.75 ± 1.759 MPa, deteniéndose la prueba a la fractura en 2.8 ± 0.19 mm. Finalmente, cuando se añadió 10% de quitosana se obtuvo un módulo de flexión de 2066.83 ± 170.24 MPa. La curva esfuerzo vs. desplazamiento mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo (σ_{\max}) 44.21 ± 1.50 MPa, deteniéndose la prueba a la fractura con un desplazamiento de 3.33 ± 0.22 mm.

Las curvas esfuerzo-desplazamiento obtenidas durante el ensayo de flexión para PMMA y las diferentes formulaciones se muestra en la figura 17.

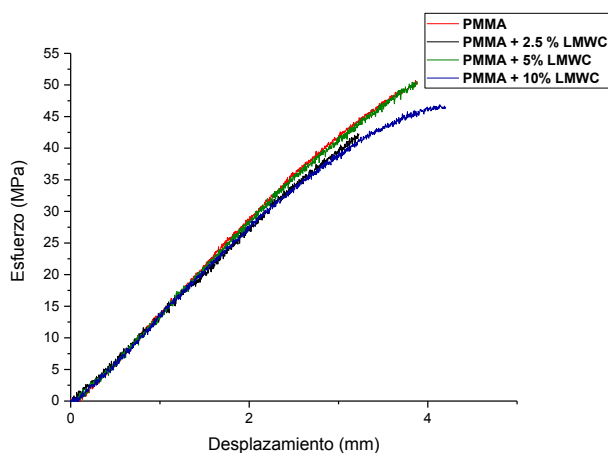


Figura 17. Curva esfuerzo-desplazamiento en flexión para el PMMA y las diferentes formulaciones.

Se observó que el menor módulo de flexión lo presentó el grupo de PMMA (tabla 2) el cual no llegó al mínimo reportado por el fabricante (>2000 MPa); sin embargo, las otras formulaciones si cumplen con la norma ISO 20795 ya que obtuvieron módulos de flexión >2000 MPa. Ninguno de los compuestos evaluados obtuvo el mínimo de la resistencia a la flexión reportado por el ISO 20795, que es de 60 MPa (Fig. 18).

Al realizar el análisis estadístico se encontró que existió una diferencia significativa entre el grupo control y las formulaciones evaluadas, teniendo estas módulos más altos de flexión ($p < 0.05$).

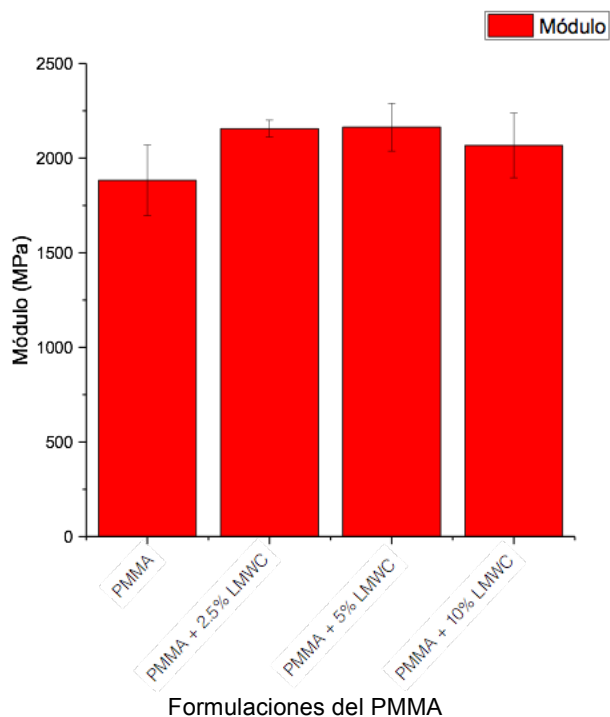


Figura 18. Comparación de los módulos de flexión del PMMA modificado con quitosana a distintas concentraciones.

Tabla 3. Tabla comparativa de los promedios y DS de las propiedades mecánicas de flexión en las diferentes formulaciones.

Propiedad	PMMA	PMMA + 2.5 % LMWC	PMMA + 5 % LMWC	PMMA + 10 % LMWC
Módulo elástico (MPa)	1883 ± 185	2156 ± 44.62	2164 ± 126.4	2066.83 ± 170.24
Desplazamiento (mm)	3.39 ± 0.43	2.25 ± 0.19	2.8 ± 0.19	3.33 ± 0.22
Esfuerzo máximo (MPa)	50.91 ± 3.51	40.58 ± 2.88	47.75 ± 1.75	44.21 ± 1.5

VI.2.3 Propiedades de tensión

Durante el ensayo de tensión, el PMMA puro, presentó un módulo de 738.11 ± 35.94 MPa. La curva esfuerzo vs. deformación mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo (σ_{\max}) 27.41 ± 3.58 MPa, deteniéndose la prueba a la fractura con una deformación de 5.12 ± 1.01 %. Cuando el PMMA fue modificado con 2.5% de quitosana de bajo peso molecular, el módulo de tensión alcanzado fue de 714.18 ± 58.95 MPa. En este caso, la curva esfuerzo vs. deformación, mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo (σ_{\max}) 6.67 ± 0.27 MPa y se detuvo la prueba a una deformación de 31.02 ± 2.80 %.

Cuando se incorporó 5% de quitosano, se obtuvo un módulo de tensión de 557.73 ± 67.82 MPa. La curva esfuerzo vs. deformación mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo (σ_{\max}) 67.89 ± 3.32 MPa y deteniéndose la prueba a una deformación de 6.38 ± 0.18 %. Finalmente, con 10% de quitosano en el PMMA, se obtuvo un módulo de tensión de 520.64 ± 127.48 MPa. La curva esfuerzo vs. deformación mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo (σ_{\max}) 27.33 ± 3.12 MPa y deteniéndose la prueba a una deformación de 6.7131 ± 1.38 %.

Las curvas esfuerzo-deformación durante la prueba de tensión para PMMA y las diferentes formulaciones se muestra en la figura 19. En la tabla 3 se muestra un resumen de las propiedades mecánicas de las diferentes formulaciones.

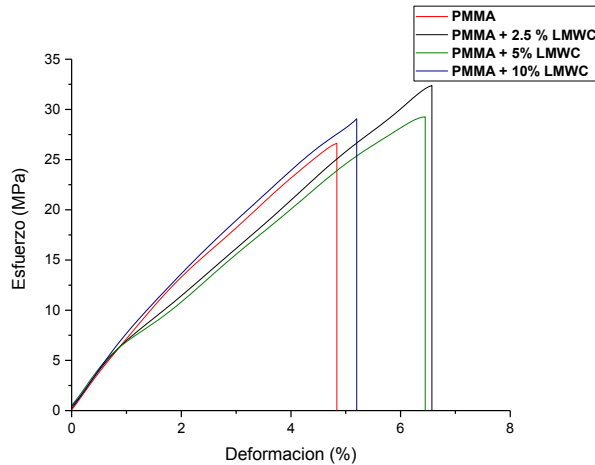


Figura 19. Curva esfuerzo-deformación durante el ensayo de tensión para el PMMA y las diferentes formulaciones.

Durante el ensayo de tensión, el PMMA puro, presentó un módulo de 738.11 ± 35.94 MPa. La curva esfuerzo vs. deformación mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo (σ_{\max}) 27.41 ± 3.58 MPa, deteniéndose la prueba a la fractura con una deformación de 5.12 ± 1.01 %. Cuando el PMMA fue modificado con 2.5% de quitosana de bajo peso molecular, el módulo de tensión alcanzado fue de 714.18 ± 58.95 MPa. En este caso, la curva esfuerzo vs. deformación mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo (σ_{\max}) 6.67 ± 0.27 MPa y deteniéndose la prueba a una deformación de 31.02 ± 2.80 %.

Cuando se incorporó 5% de quitosano, se obtuvo un módulo de tensión de 557.73 ± 67.82 MPa. La curva esfuerzo vs. deformación mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo (σ_{\max}) 67.89 ± 3.32 MPa y deteniéndose la prueba a una deformación de 6.38 ± 0.18 %. Finalmente, con 10% de quitosano en el PMMA, se obtuvo un módulo de tensión de 520.64 ± 127.48 MPa. La curva esfuerzo vs. deformación mostró una respuesta lineal hasta un valor de esfuerzo (σ_{\max}) 27.33 ± 3.12 MPa y deteniéndose la prueba a una deformación de 6.7131 ± 1.38 %.

Tabla 4. Tabla comparativa de los promedios y DS de las propiedades mecánicas de tensión en las diferentes formulaciones.

Propiedad	PMMA	PMMA + 2.5 % LMWC	PMMA + 5 % LMWC	PMMA + 10 % LMWC
Módulo elástico (MPa)	738.11 ± 35.94	714.19 ± 58.95	571.14 ± 80.7	520.64 ± 127.48
Deformación (%)	5.12 ± 1.01	6.67 ± 0.27	6.93 ± 1.02	6.71 ± 1.38
Esfuerzo máximo (MPa)	27.41 ± 3.58	31.02 ± 2.8	27.24 ± 2.5	27.33 ± 3.12

Si bien no se obtuvo la resistencia a la tensión de 30 MPa, no incluida en la norma pero sugerida por varios autores, como resistencia mínima de tensión que deben soportar los acrílicos, no existió una diferencia estadísticamente significativa entre todas las formulaciones estudiadas ($p < 0.05$).

VI.3 Morfología de las superficies de fractura después de los ensayos de tensión

Las fracturas de tipo frágil se presentan sin una deformación apreciable y por una propagación rápida de la grieta. La dirección de la grieta es casi completamente perpendicular a la dirección de la fuerza de tensión aplicada, y se obtiene una superficie prácticamente plana. La figura 20 muestra una imagen de la superficie de fractura macroscópica después del ensayo de tensión.

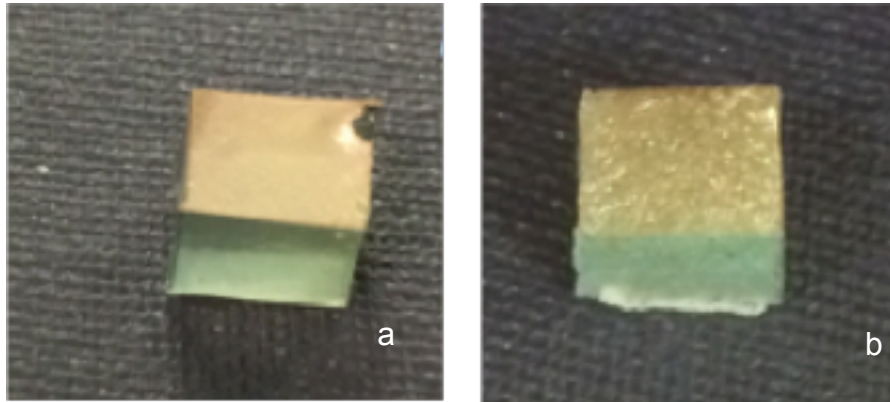


Figura 20. Superficie de fractura de las probetas de tensión en la formulación de PMMA (a) y PMMA + 10% LMWC (b).

Cuando estas superficies fueron observadas mediante microscopía electrónica de barrido (JEOL LV63) se apreciaron detalles adicionales. En la superficie del PMMA se encontró una faceta típicamente plana, una topografía con grietas que son características de una falla por tipo frágil (figura 21 a). En las superficies adicionadas con quitosana en las diferentes concentraciones, podemos observar la topografía agrietada característica del PMMA y partículas que miden aproximadamente $105\ \mu\text{m}$, tamaño aproximado de las partículas de quitosana obtenidas después del tamizaje.

En la superficie de PMMA adicionado con 2.5% de quitosana (figura 21 b), se observa una mayor distancia entre las partículas de quitosana y se observan cavidades con una forma similar a la de las partículas de quitosana. En las imágenes obtenidas de las superficies de 5% (figura 21 c) y 10% (figura 21 d) se observó una topografía similar a la del 2.5%, pero con mayor presencia de partículas por campo.

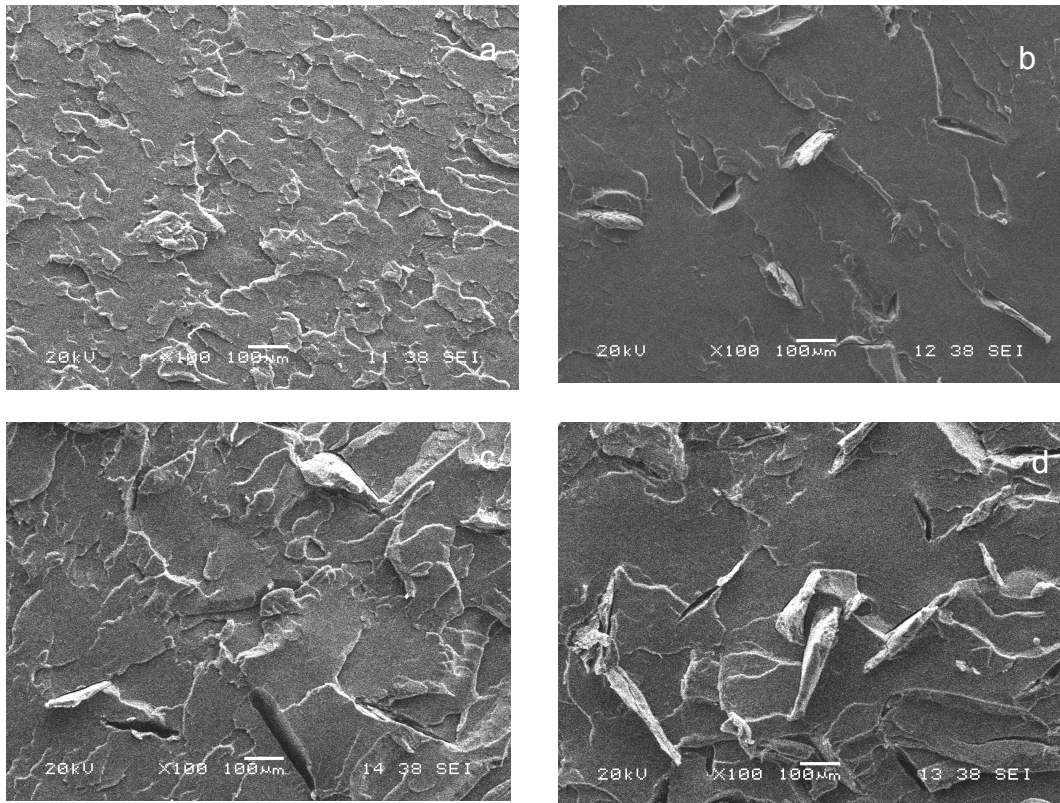


Figura 21. Imágenes de SEM con magnificación 100X de las superficies de fractura del: a. PMMA; b. PMMA + 2.5% quitosana; c. PMMA + 5% quitosana; d. PMMA + 10% quitosana obtenidas de la prueba de tensión.

VI.4 Adherencia de *C. albicans* a PMMA modificado con quitosana

Se contaron cuarenta campos por cada muestra a una magnificación de 100X. El promedio de las levaduras de *C. albicans* adheridas a las superficies de las diferentes muestras se resume en la tabla 4. Se analizaron 2 muestras de cada grupo por triplicado.

Se observó que el grupo con mayor adherencia de *C. albicans* fue el de PMMA (control), seguido por el de PMMA + 10 % de LMWC. El grupo que menor adherencia tuvo fue el de PMMA + 2.5% LMWC. En la figura 22 se observan campos de cada una de las formulaciones a magnificación 100x.

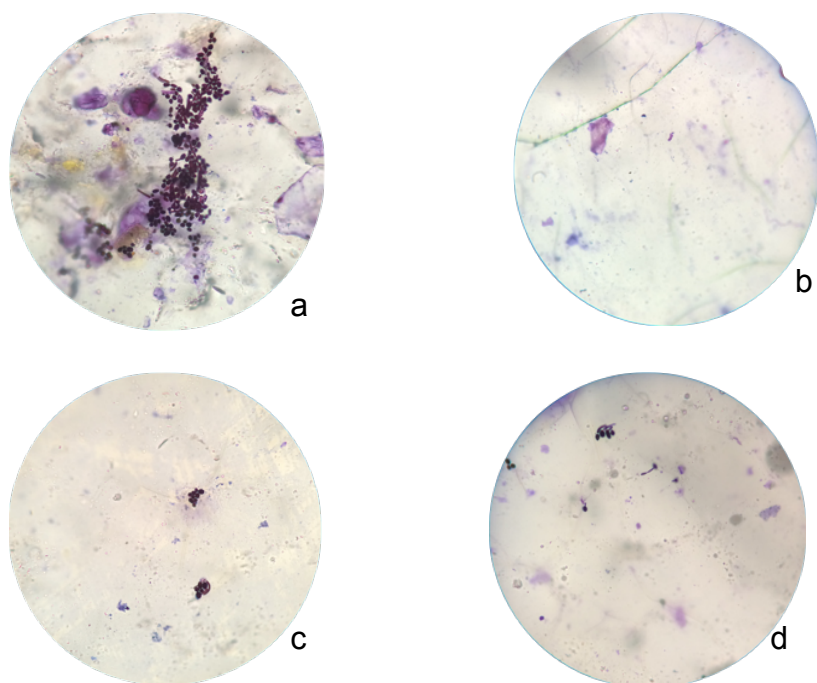


Figura 22. Imágenes de microscopía óptica a magnificación 100X de a. PMMA; b. PMMA + 2.5% LMWC; c. PMMA + 5% LMWC; d. PMMA + 10% LMWC.

Tabla 4. Promedio de células de *C. albicans* adheridas a las diferentes superficies en cada ensayo.

Muestra	PMMA	PMMA + 2.5% LMWC	PMMA + 5% LMWC	PMMA + 10% LMWC
1	3.48	0.28	0.72	1.72
2	3.98	0.38	0.86	2.52
3	6.98	0.31	0.75	3.03
Promedio	4.82	0.32	0.77	2.42

Por otro lado, se observó en el MEB la superficie de la muestra del grupo control (solo PMMA) después de realizadas las pruebas de adherencia, ya que ésta presentó la mayor cantidad de *C. albicans* (Figura 14). En las imágenes se pueden apreciar la presencia de *C. albicans* en forma de hifa y de blastoconidia,

en forma ovoide y de pseudohifa, es decir, con todas las morfologías que se han reportado según el estado de madurez.

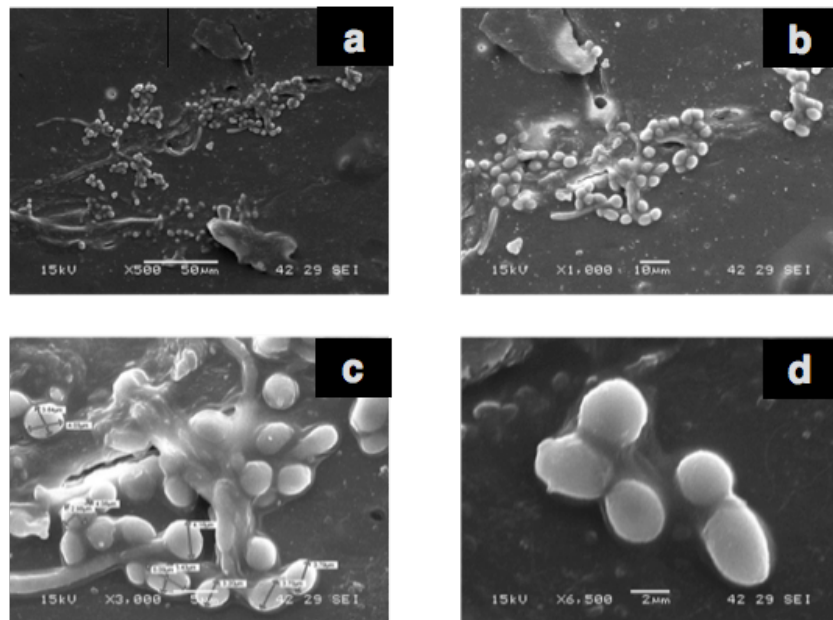


Figura 23. Imágenes de SEM de las superficies del PMMA. a. con magnificación 500X; b. magnificación 1000X, c. magnificación 3000X; d. magnificación 6500X.

VI.5 Determinación de la rugosidad mediante AFM

Con el objeto de eliminar la rugosidad como posible causa de la adhesión de *C. Albicans*, se usó AFM. Los resultados obtenidos mostraron que la muestra de PMMA tuvo una rugosidad promedio de 1.09 μm , con 2.5% de quitosano 0.96 μm y con 5% una rugosidad de 1.13 μm . La muestra con 10% de quitosano era tan rugosa que no fue posible medirle este parámetro. Las muestras con alto contenido de quitosano fueron las más rugosas, siendo la adhesión de *C. albicans* a estas mayor. La figura 15 muestra la topografía obtenida por AFM para estas muestras.

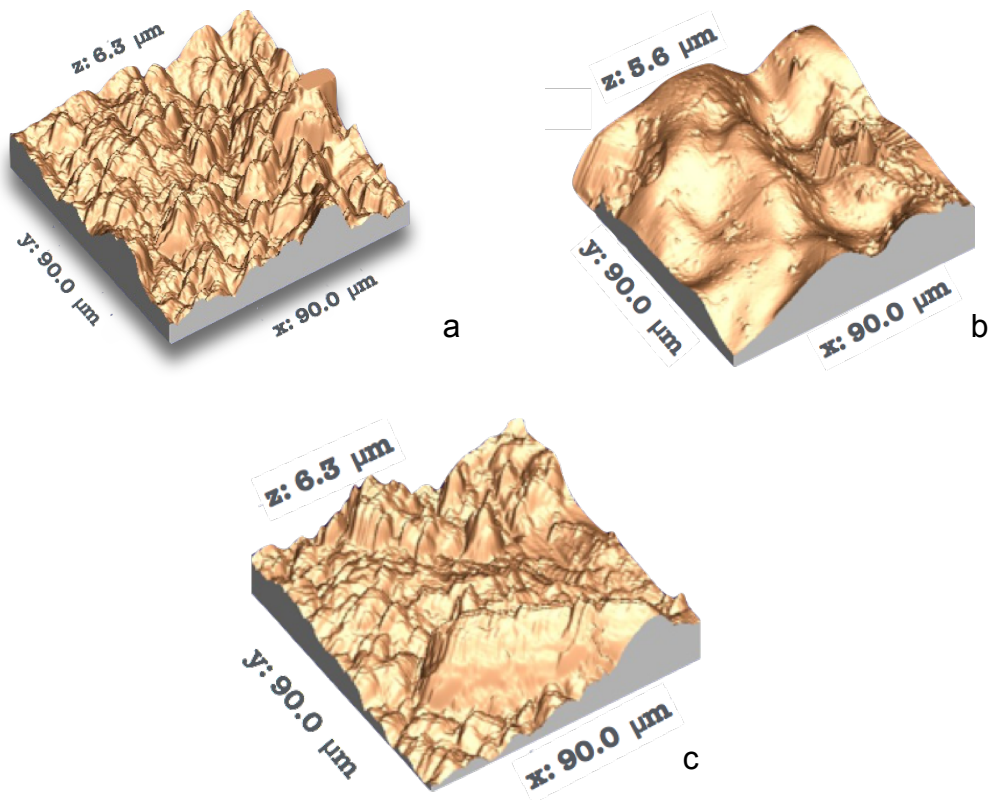


Figura 24. Topografía de las superficies de PMMA modificado con quitosano. a. PMMA puro; b. PMMA con 2.5% de quitosano y c. PMMA con 5% de quitosano.

VII Discusión

El quitosano tiene varias ventajas sobre otros desinfectantes, ya que posee una alta actividad antimicrobiana, un espectro más amplio de actividad, alta tasa de destrucción contra patógenos y menor toxicidad para células mamíferas. Tayel y Cols., reportaron actividad antimicrobiana del quitosano a concentraciones de 2000, 1750 y 1250 mg/L, dependiendo de los diferentes grados de acetilación, contra *C. albicans* (46), valores superiores a los encontrados en este estudio, pudiéndose deber a que la actividad antimicrobiana está influenciada por diversos factores como el tipo de quitosano, grado de polimerización, de acetilación, el disolvente, pH y el microorganismo involucrado. Por otro lado, la actividad antifúngica reduce las infecciones micóticas, el crecimiento micelial, la producción de esporas y la germinación de hongos (45). Mediante esta prueba se comprobó el efecto antifúngico del quitosano de bajo peso molecular a utilizar.

En este estudio se encontró, que a partir de la concentración de 1% de ácido acético, existió una inhibición producida únicamente por éste, similar a lo reportado por Costa y cols., que reportaron actividad del ácido acético a partir de una concentración del 1% (67).

Por otro lado, la integración del quitosano a las muestras de PMMA no se logró de manera homogénea, ya que la quitosana no es soluble en el metacrilato de metilo, monómero utilizado en la polimerización del PMMA. Para evitar este problema se sugiere modificar al quitosano bajo una reacción de desacetilación en condiciones heterogeneas para generar una distribución irregular de los grupos N-acetyl-D-glucosamina y los residuos de D-glucosamina, bloqueando la distribución de los grupos amino a lo largo de la cadena polimérica, los cuales están relacionados con su solubilidad (45). Al inicio de este trabajo, se realizaron ensayos con el fin de modificar la quitosana al añadirle glicidil metacrilato (GMA), para funcionalizarlo con el metacrilato de metilo (MMA), pero la solubilidad de la quitosana modificada en MMA se mantuvo baja, probablemente a un posible

entrecruzamiento de los grupos amino del quitosano y el GMA por lo que se abandonó esta reacción (10).

Durante éste trabajo, se utilizó PMMA transparente con el fin de observar la distribución del quitosano y su afectación en el color, lo cual es importante en términos estéticos. En este sentido, se observó que a una concentración del 10% de quitosano si afectó visiblemente su claridad óptica. Sin embargo, éste efecto negativo puede ser compensado por su efecto antifúngico en tratamientos con materiales de rebase o acondicionador de tejido (53). Existió una mayor adherencia de *C. albicans* a las muestras de PMMA (grupo control), seguida del grupo de PMMA +10% LMWC, probablemente al no ser una mezcla homogénea, algunas partículas perdidas del LMWC causaron porosidades que permitieron zonas de mayor retención, ya que en los resultados del MEB se observó en las superficies de fractura zonas huecas con la forma de la partícula del quitosano, sugiriendo el desprendimiento de la partícula al no existir una interfase química entre ambos polímeros. Se observó una disminución de la adherencia de las cepas entre un 93.36% y un 49.79% cuando se empleó 2.5 o 5% de quitosano, de la misma manera, Costa y Cols. reportaron una disminución de la adherencia contra *C. albicans* en de más de un 90% al realizar un estudio de adherencia en superficies de aluminio revestidas con quitosano (67).

La higiene es un prerequisite para la salud bucal, siendo ésta dificultada en pacientes geriatricos, generalmente portadores de prótesis. Es por esto que es importante el uso de sustancias que eviten la adherencia de patógenos, específicamente *C. albicans* al ser esta la más relacionada con la ESP ya que es un paso esencial y necesario para la colonización y por ende la patogénesis (38,39).

Si bien es importante la determinación de la acción antimicrobiana de los compuestos agregados a los materiales poliméricos con el fin de evitar o disminuir la adherencia microbiana, también es importante valorar si existe alguna alteración

en sus propiedades mecánicas, debido a que son sometidos a diversas cargas en la cavidad oral (68). La fractura de las prótesis dentales de PMMA es el resultado del debilitamiento de las propiedades mecánicas por su mala manipulación, alguna modificación, o debido a otros factores de tipo biológico. En general, las bases para dentadura removibles son sometidas a diferentes tipos de esfuerzos, entre los que se encuentran fuerzas de compresión, tensión, flexión y cizallamiento, que pueden producir fracturas de las prótesis dentro de la cavidad bucal ya que se ha demostrado que las cadenas poliméricas se distorsionan alrededor de la zona de concentración de estos esfuerzos (69). En este estudio se realizaron pruebas de compresión, flexión y tensión, basados en los estándares ISO 5833, 20795 y ASTM D-638. En relación a las propiedades de compresión, no todas las muestras evaluadas alcanzaron el valor mínimo de resistencia a la compresión de 70 MPa, sin embargo, la variación entre el grupo control y las diferentes formulaciones se encuentran dentro del mismo intervalo. A diferencia de las pruebas de flexión, en las cuales si se observó una diferencia estadísticamente significativa. Si bien se observó que el módulo de flexión mínimo requerido por la norma fue superior a 2000 MPa, ninguno de los compuestos evaluados alcanzó el mínimo de la resistencia a la flexión reportado por el ISO 20795 (60 MPa). En general, se observó una mayor resistencia a la flexión en todos los grupos con quitosana comparado con el PMMA puro, coincidiendo con lo reportado por Zuhair J et al. (70). Esto es relevante debido a que las prótesis dentales preparadas con PMMA tienen un soporte en la mucosa oral, la cual es resiliente, por lo que las prótesis deben ser obtenidas con materiales rígidos con el fin de minimizar el proceso de reabsorción ósea (53).

En cuanto a los resultados de tensión, sólo se obtuvo un valor superior al mínimo aceptado de 30 MPa de resistencia a la tensión en el grupo de PMMA + 2.5% de quitosana. No obstante al compararlo con los demás grupos no existió una diferencia estadísticamente significativa. Los materiales de uso dental, generalmente experimentan menos cargas de tensión (53).

Al ser analizadas las superficies de fractura de las muestras que fueron sometidas a cargas de tensión se observaron vacíos en ciertas zonas, causados por las partículas de quitosano, lo que sugiere la pobre interface entre el acrílico y la quitosana. Se observó una morfología de superficie muy similar en todos los compuestos, variando únicamente en términos de la proximidad entre las partículas de quitosana.

Se observó en AFM que la rugosidad de la superficie fue mayor en las muestras con 5%, más fue similar a la del grupo control. La que menor rugosidad presentó fue la de 2.5%, la cual también presentó la menor adhesión de *C. albicans*. Esto es importante debido a que la rugosidad es un factor predisponente a la adherencia microbiana (71), contrario a esto, Tsutsumi y Cols. reportaron que la rugosidad no favoreció la adherencia de *C. albicans*, sin embargo pulieron la superficie del PMMA y excluyeron cualquier muestra con $Ra < 0.10 \mu m$ (72).

VIII Conclusiones

1. El quitosano de bajo peso molecular y de 70% de grado de desacetilación demostró tener actividad antifúngica contra *C. albicans*.
2. No se observó la formación de una interface adecuada entre el quitosano y el PMMA al formular las mezclas debido a una pobre solubilidad de la quitosana en el monómero de MMA.
3. Se observó un cambio en el color en la formulación del 10% de quitosano.
4. Hay un ligero efecto reforzante (aumento del módulo) de la quitosana en compresión a bajas concentraciones (10%) y en flexión hasta el 5%, pero no en tensión.
5. La muestra que menor rugosidad mostró fue la de 2.5%, la de 10% fue tan alta que no pudo medirse.
6. La presencia del quitosano de bajo peso molecular disminuyó la adherencia de *C. albicans*, en especial a una concentración de 2.5%, sugiriendo el papel de la rugosidad en la adherencia

IX Recomendaciones para trabajos futuros

Realizar pruebas de fatiga en una prótesis total.

Mejorar la interface acrílico-quitosa probablemente con un plasma de oxígeno.

Determinar otros parámetros exigidos por la norma ISO 20795 tales como monómero residual.

Evaluar el efecto del PMMA modificado a mediano plazo.

X Referencias bibliográficas

1. CE M. Implantología Contemporánea. 3a edición. España: Elsevier; 2009. 32-59. p.
2. Babbush C, Hahn J, Kauser J RJ. Implantes dentales arte y ciencia. 2da. Venezuela: Amolca; 2012. 17 p.
3. Abaden. No Title. Image. 2018.
4. Bedrossian E. Implant treatment planning for the edentulous patient. 1a edición. Missouri: MOSBY; 2011. 1-4 p.
5. AU, Khan GF. Factors influencing the type of prosthetic restoration for partially dentate adults. JPMI. 2010;24(01):13–21.
6. Ángeles-Medina F N-BE. Prótesis bucal removible. 1a ed. México: Trillas; 2003. 13 p.
7. KJ A. Ciencia de los materiales dentales de Phillips. México: McGraw-Hill Interamericana; 2001. 219-45 p.
8. I GV, li RO, lii LA, Iv LB. Evidencia microscópica de la presencia de Candida albicans en bases protésicas retiradas de la cav1. I GV, li RO, lii LA, Iv LB. Evidencia microscópica de la presencia de Candida albicans en bases protésicas retiradas de la cavidad bucal Microscopic evide. 2009;46(2):1–8.
9. Domínguez-Delgado CL, Fuentes-Prado E, Escobar-Chávez JJ, Vidal-Romero G, Rodríguez-Cruz IM, Díaz-Torres R. Chitosan and Pluronic[®] F-127: Pharmaceutical Applications. Encycl Biomed Polym Polym Biomater [Internet]. 2016;(January):1513–35. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/E-EBPP-120050057>
10. Ali U, Karim KJBA, Buang NA. A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). Polym Rev. 2015;55(4):678–705.
11. JL. C-N. Biomateriales dentales. 1a ed. Colombia: Amolca; 2004. 313-26 p.
12. Standar D. Dentistry- Base polymers- Part 1: Denture base polymers ISO

20795. kollegievej, Dinamarca; 2008.
13. Solórzano-Lemus F, Venegas-Lancón RD, Moreno-Maldonado V L-MS. Determinación de monómero residual de metacrilato de metilo en 3 diferentes marcas comerciales para base de dentaduras por cromatografía de gases. *Rev Odontológica Mex* [Internet]. 2010;14(2):91–8. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/odon/uo-2010/uo102d.pdf>
 14. Bortolotti L. *Prótesis Removibles Clásica e Innovaciones*. 1a ed. Colombia: Amolca; 2006. 131-36 p.
 15. Pesci-Bardon C, Fosse T, Madinier I, Serre D. In vitro new dialysis protocol to assay the antiseptic properties of a quaternary ammonium compound polymerized with denture acrylic resin. *Lett Appl Microbiol*. 2004;39(3):226–31.
 16. Bascones Martínez a, Mudarra Morantes S, Perea Pérez E. Antisépticos en el tratamiento de la enfermedad periodontal. *Av en Periodoncia e Implantol Oral*. 2002;14(3).
 17. Dhir G, Berzins D, Dhuru V, Periathamby AR DA. NIH Public Access. *J Prosthodont*. 2007;16(6):465–72.
 18. Nam K-Y, Lee C-H, Lee C-J. Antifungal and physical characteristics of modified denture base acrylic incorporated with silver nanoparticles. *Gerodontology* [Internet]. 2012 Jun [cited 2014 Nov 20];29(2):e413-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22612845>
 19. Lazarin AA, Machado AL, Zamperini CA, Wady AF, Spolidorio DMP, Vergani CE. Effect of experimental photopolymerized coatings on the hydrophobicity of a denture base acrylic resin and on *Candida albicans* adhesion. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Nov 20];58(1):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23123065>
 20. Santana-Rodriguez L, Gustavo- Paleari A, Giro G, Martins de Oliveira Junior N PA, MA C. Chemical characterization and flexural strength of a denture base acrylic resin with monomer 2-tert-butylaminoethyl methacrylate. *J Prosthodont* [Internet]. 2013 Jun [cited 2014 Nov 20];22(4):292–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23106690>

21. Sodagar A, Bahador A, Khalil S, Saffar Shahroudi A, Zaman Kassae M. The effect of TiO₂ and SiO₂ nanoparticles on flexural strength of poly (methyl methacrylate) acrylic resins. *J Prosthodont Res* [Internet]. Japan Prosthodontic Society; 2013;57(1):15–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2012.05.001>
22. Pardi G CE. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta odontol venez*. 2002;40(1).
23. Staniszewska M, Bondaryk M, Swoboda-Kopec E, Siennicka K, Sygitowicz G, Kurzatkowski W. *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. *Braz J Microbiol* [Internet]. 2013;44(3):813–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3910194&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
24. McGinnis MR B. *Current topics in medical mycology*. 3rd ed. New York: Springer; 1989. 248-70 p.
25. Motaño-Barrientos A R-AM. Algunas consideraciones sobre la aplicabilidad de la MBE y la toma racional de decisiones en la práctica clínica diaria. *fisterra*. 2004;(1):1–10.
26. McCullough MJ, Ross BC RP. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1996;25:136–44.
27. Gendreau L LG. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. *J Prosthodont*. 2011;20:251–60.
28. Karakis D, Akay C, Oncul B, Rad AY, Dogan A. Effectiveness of disinfectants on the adherence of *Candida albicans* to denture base resins with different surface textures. *J Oral Sci*. 2016;58(3):431–7.
29. Ayuso-Montero R, Torrent-Collado J L-LJ. Estomatitis protésica : puesta al día Denture stomatitis : update. *RCOE* [online]. 2004;9(6):657–62.
30. Hernández-Solís S, Villamil-Urzaiz JL, Lama-González, Puc-Pool R R-GF. Prevalencia de *C. albicans* en pacientes con y sin estomatitis subprotésica. *Rev Odontológica Latinoam*. 2009;1(1):7–11.

31. Herrera IB, Núñez MO. REVISION BIBLIOGRÁFICA SOBRE ESTOMATITIS SUBPROTESIS. *Rev Habanera Ciencias Médicas*. 2005;4(2).
32. Emami E, Kabawat M, Rompre PH, Feine JS. Linking evidence to treatment for denture stomatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Dent* [Internet]. 2014;42(2):99–106. Available from: http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=prem&AN=24316341%5Cnhttp://sfx.metabib.ch/sfx_locator?sid=OVID:medline&id=pmid:24316341&id=doi:10.1016%2Fj.jdent.2013.11.021&issn=0300-5712&isbn=&volume=42&issue=2&spage=99&pages=99-106&
33. Nápoles-González IJ, Díaz-Gómez SV, Puig-Capotell E C-RY. Prevalencia de la estomatitis subprótesis. *Rev Arch Médico Camagüey* [Internet]. 2009;13(1). Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552009000100003&lng=es
34. Nett JE, Marchillo K, Spiegel C a, Andes DR. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect Immun* [Internet]. 2010 Sep [cited 2014 Nov 20];78(9):3650–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2937450&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
35. Ramos-Díaz M, Hidalgo-Hidalgo S, Rodríguez-Rodríguez M, Lorenzo-González G D-GS. Alteraciones bucales en pacientes geriátricos rehabilitados con prótesis parciales. *Rev Arch Médico Camagüey*. 2014;9(5).
36. Espasandín-González S, Martínez-Toledo G, Reyes-Suárez VO D-VR. Estomatitis subprótesis en pacientes con prótesis de más de dos años de uso. *Rev ciencias médicas*. 2013;19(2):234–43.
37. Díaz-Martell Y, Martell-Forte IC Z-DD. Afecciones de la mucosa oral encontradas en pacientes geriátricos portadores de prótesis estomatológicas. *Rev Cuba Estomatolol*. 2007;44(3).
38. Pires FR, Santos EBD, Bonan PRF, De Almeida OP LM. Denture stomatitis and salivary candida in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil*. 2002;29(11):1115–9.

39. Darwazeh AM, Al-Refai S A-MS. Isolation of *Candida* species from the oral cavity and fingertips of complete denture wearers. *J Prosthet Dent.* 2001;86:420–3.
40. Volpato-Sanità P, Pavarina AC, Teresinha-Giampaolo E, Montenegro-Sila M, García E, García-Ribero D VC. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2011;111(6):726–33.
41. Kaomongkolgit R, Wongviriya A, Daroonpan P, Chansamat R, Tantanapornkul W, Palasuk J. Denture stomatitis and its predisposing factors in denture wearers. *J Int Dent Med Res.* 2017;10(1):89–94.
42. Wieckiewicz M, Wolf E, Richter G, Meissner H, Boening K. New concept of polymethyl methacrylate (PMMA) and polyethylene terephthalate (PET) surface coating by chitosan. *Polymers (Basel).* 2016;8(4).
43. Ng JCY, Cheung WH, McKay G. Equilibrium studies for the sorption of lead from effluents using chitosan. *Chemosphere [Internet].* 2003 Aug [cited 2014 Nov 20];52(6):1021–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12781235>
44. Agulló E, Mato R, peniche C, Tapia C, Heras A, San Román J, Arguelles A, Goycoolea F, Mayorga A, Nakamatsu J AA. *Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones.* 1a ed. Perú: Fondo Editorial; 2004. 40,75-78,160,300. p.
45. Younes I, Sellimi S, Rinaudo M, Jellouli K, Nasri M. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *Int J Food Microbiol.* 2014;185:57–63.
46. Tayel A a, Moussa S, el-Tras WF, Knittel D, Opwis K, Schollmeyer E. Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. *Int J Biol Macromol [Internet].* Elsevier B.V.; 2010 Nov 1 [cited 2014 Nov 21];47(4):454–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603144>
47. Seyfarth F, Schliemann S, Elsner P HUC. Antifungal effect on high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan

- oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *Int J Pharm.* 2008;353(1–2):139–48.
48. Kim J. Inhibitory effect on *Streptococcus mutans* and mechanical properties of the chitosan containing composite resin. *Restor Dent Endod.* 2013;7658:36–42.
 49. Barembaum S, Virga C, Bojanich A, Cornejo L, Calamari S, Pontón J DS. Efecto de quitosan y alginato de sodio sobre la adherencia de *C. albicans* autoctonas a células epiteliales bucales (in vitro). *Med Oral.* 2003;8:188–96.
 50. Gow NAR, Veerdonk FL Van De, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence : discriminating invasion from colonization. 2012;10(February):112–23.
 51. Bizarro SA, Goes TF Van Der. Análisis microscópico de la adherencia de *Candida albicans* in vitro sobre resina acrílica utilizada para bases de dentaduras procesada con tres diferentes técnicas. *Rev Odontológica Mex.* 2006;10:167–72.
 52. Radford DR, Challacombe SJ WJ. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10(1):99–116.
 53. Sakaguchi RL PJ. *Craig's Restorative Dental Materials.* 13th ed. Philadelphia, USA: Elsevier Mosby; 2012. 83-105 p.
 54. Alburquenque C, Bucarey S a, Neira-Carrillo A, Urzúa B, Hermosilla G, Tapia C V. Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida* spp. *Med Mycol [Internet].* 2010 Dec [cited 2014 Nov 20];48(8):1018–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20482450>
 55. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts, *Clin Microbiol Infect* , 2008 vol. 14 (4)(pg. 398-405). No Title.
 56. Nevzatoglu EU, Ozcan M, Kulak-Ozkan Y KT. Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. *Clin Oral Invest.* 2007;11:231–6.

57. F B. Textbook of polymer science. New York: John Wiley & Son; 1984.
58. Beer P, Russel E DT. Mecánica de materiales. México: McGraw-Hill Interamericana; 2006.
59. Materials P, Materials EI. Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics 1. 2015;1–17.
60. Diaz-Arnold AM, Vargas MA, Shauli KL, Lafoon JE QF. Flexural and fatigue strenghts of denture base resin. *J Prosthet Dent*. 2008;100(1):47–51.
61. Straioto FG, Ricomini-Filho AP, Fernandes-Neto AF D-B-CA. Polytetrafluorethylene Added to Acrylic Resins : Mechanical Properties. *Braz Dent J*. 2010;21(1):55–9.
62. ATCC. No Title [Internet]. 2016. Available from: %0A
63. Reyes-estebanez M, Herrera-parra E, Cristóbal-alejo J, Heredia- G, Canto-canché B, Medina-baizabal I, et al. Antimicrobial and nematicidal screening of anamorphic fungi isolated from plant debris of tropical areas in Mexico. *African J Microbiol Res*. 2011;5(9):1083–9.
64. Samaranayake LP MT. An in-vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch oral Biol*. 1980;25:603-09.
65. Ajaj-alkordy NM, Alsaadi MH. Elastic modulus and flexural strength comparisons of high-impact and traditional denture base acrylic resins. *Saudi Dent J* [Internet]. King Saud University; 2014;26(1):15–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sdentj.2013.12.005>
66. Zhou ZR, Zheng J. Tribology of dental materials: A review. *J Phys D Appl Phys*. 2008;41(11).
67. Costa E, Silva S, Tavaría F, Pintado M. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Chitosan on the Oral Pathogen *Candida albicans*. *Pathogens* [Internet]. 2014;3(4):908–19. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-0817/3/4/908/>
68. Ayad N, Badawi M, Fatah A. Effect of reinforcement of high-impact acrylic resin with zirconia on some physical and mechanical properties. *Rev Clín Pesq Odontol*. 2008;4(3):145–51.
69. Hakan Demir, Orhan Murat Dogan AD. Tensile Properties of Denture Base Resin Reinforced with Various Esthetic Fibers Hakan. *J Appl Polym Sci*.

2012;123:3354–62.

70. Amer ZJA, Ahmed JK, Abbas SF. Chitosan / PMMA Bioblend for Drug Release Applications. *Int J Eng Technol*. 2014;4(5):318–24.
71. PAN H, WANG G, PAN J, YE G, SUN K, ZHANG J, et al. Cold plasma-induced surface modification of heat-polymerized acrylic resin and prevention of early adherence of *Candida albicans*. *Dent Mater J* [Internet]. 2015;34(4):529–36. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmj/34/4/34_2015-035/_article
72. Tsutsumi C, Takakuda K, Wakabayashi N. Reduction of *Candida* biofilm adhesion by incorporation of prereacted glass ionomer filler in denture base resin. *J Dent*. 2016;44:37–43.