

Efecto antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans* de sistema adhesivo con nanopartículas de óxido de zinc y cobre

Antimicrobial effect against *Streptococcus mutans* of an adhesive system with copper and zinc oxide nanoparticles

Macarena Castro¹ <https://orcid.org/0000-0002-7436-163X>

Eduardo Fernandez^{1,2} <https://orcid.org/0000-0002-2616-1510>

Patricia Palma Fluxá³ <https://orcid.org/0000-0002-1841-6798>

Alain Manuel Chaple Gil^{4*} <https://orcid.org/0000-0002-8571-4429>

Patricio Vildósola Grez^{1,5} <https://orcid.org/0000-0002-0649-4334>

¹Universidad de Chile, Facultad de Odontología, Departamento de Odontología Restauradora. Santiago de Chile, Chile.

²Universidad Autónoma de Chile, Instituto de Ciencias Biomédicas. Santiago de Chile, Chile.

³Universidad de Chile, Facultad de Odontología, Área de Microbiología, Departamento de Medicina y Patología Oral. Santiago de Chile, Chile.

⁴Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, Facultad de Ciencias Médicas “Victoria de Girón”, Departamento de Estomatología General Integral. La Habana, Cuba.

⁵Universidad Andres Bello, Facultad de Odontología. Santiago de Chile, Chile.

*Autor para la correspondencia: chaple@infomed.sld.cu

RESUMEN

Objetivo: Determinar las propiedades antimicrobianas de la incorporación de nanopartículas de óxido de zinc y cobre en un adhesivo de grabado y lavado total sobre *Streptococcus mutans* en pacientes con restauraciones de resina compuesta confeccionadas con adhesivo cargado.

Métodos: Este estudio clínico randomizado, participaron 25 pacientes, de ambos sexos, pertenecientes al posgrado de Ortodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, en los cuales se confirmó presencia de *Streptococcus mutans* en saliva. Se confeccionaron

restauraciones de resina compuesta oclusales, en premolares superiores con indicación de exodoncia por el tratamiento de ortodoncia, con adhesivo cargado (cuya composición es 5 / 0.2 % ZnO y Cu respectivamente) y control (sin presencia de nanopartículas en su composición), según el listado de aleatorización. Se tomaron muestras microbiológicas en tres tiempos con la Técnica de la cubeta (antes, 1 semana y 4 semanas posterior a la confección de las restauraciones). Se obtuvieron, aislaron e identificaron colonias de *Streptococcus mutans* a partir de las muestras obtenidas. Los datos fueron analizados por el test de Mann Whittney.

Resultados: El promedio del recuento de UFC (unidades formadoras de colonias) de *Streptococcus mutans* en el grupo experimental fue mayor posterior a la confección de las restauraciones de resina compuesta. Los resultados de la identificación molecular por PCR demuestran la presencia de *Streptococcus mutans* en 20 de 25 muestras.

Conclusiones: No existen diferencias en el recuento de *Streptococcus mutans* antes y después de la aplicación del adhesivo sobre las restauraciones de resina compuesta.

Palabras clave: óxido de zinc; cobre; recubrimiento dental adhesivo; recubrimientos dentinarios; *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Objective: Determine the antimicrobial properties of the incorporation of copper and zinc oxide nanoparticles into a total rinse and etch adhesive against *Streptococcus mutans* in patients with composite resin restorations made with loaded adhesive.

Methods: A randomized clinical study was conducted of 25 patients of both sexes from the orthodontics graduate course taught at the Dental School of the University of Chile, in whom the presence of *Streptococcus mutans* was confirmed in saliva. Occlusal composite resin restorations were performed in upper premolars with exodontia indicated as part of the orthodontic treatment, using loaded adhesive (composition 5 / 0.2% ZnO and Cu, respectively) and control (without nanoparticles in its composition), according to the randomization list. Microbiological samples were taken at three moments applying the tray technique (before, 1 week after and 4 weeks after the restorations). *Streptococcus mutans* were obtained, isolated and identified from the samples taken. Data analysis was based on the Mann-Whitney test.

Results: Mean *Streptococcus mutans* CFU count in the experimental group was higher after the composite resin restorations were made. Results of PCR molecular identification show the presence of *Streptococcus mutans* in 20 of 25 samples.

Conclusions: No differences were found in the *Streptococcus mutans* count before and after application of the adhesive over the composite resin restorations.

Keywords: zinc oxide, copper, adhesive dental coating, dentin coatings, *Streptococcus mutans*.

Recibido: 24/03/2020

Aceptado:24/05/2020

Introducción

La necesidad de algunos materiales dentales de tener propiedades antibacterianas es inminente, los adhesivos dentales carecen de estas y, definitivamente, si poseyeran propiedades antimicrobianas hipotéticamente podríamos suponer un aumento de longevidad de las restauraciones en boca. Estudios recientes *in vitro* se han concentrado en mejorar esta propiedad, por ejemplo, *Gutiérrez* y otros⁽¹⁾ describieron que, adicionando a un adhesivo comercial 5/0,2 % de ZnO/CuNp se consiguieron propiedades antibacterianas significativamente más altas que el grupo control al polimerizar el adhesivo dental. Asimismo, se demostró que a esta concentración el adhesivo no era citotóxico.⁽¹⁾

La idea de usar nanopartículas implica no alterar las propiedades originales del material e, incluso, mejorar sus propiedades, lo cual resolvería uno de los principales problemas de las resinas compuestas, su longevidad en el tiempo. La aplicación de la nanotecnología para combatir la caries dental, incluida la inhibición de la formación de biopelículas y la regulación del equilibrio de desmineralización y remineralización, es una dirección prometedora para la prevención y el tratamiento de la caries dental.⁽²⁾

El presente estudio se enfoca en aumentar la longevidad de la restauración por medio del pincelado de adhesivo en la superficie de la restauración en la capa final de su confección, con adhesivo cargado con nanopartículas de cobre y óxido de zinc, y su subsecuente potencial antimicrobiano en toda la superficie y la interfase.

El objetivo fue determinar las propiedades antimicrobianas de la incorporación de nanopartículas de óxido de zinc y cobre en un adhesivo de grabado y lavado total sobre *Streptococcus mutans* en pacientes con restauraciones de resina compuesta confeccionadas con adhesivo cargado.

Métodos

Se realizó un estudio clínico tipo boca-dividida (*split mouth*) comparativo experimental, doble ciego tanto para el paciente como para el operador, en el cual se reclutaron pacientes con indicación de extracción por ortodoncia.

El tamaño de la muestra se calculó con análisis *a priori* utilizando el programa estadístico G*Power[®], versión 3.1.9.2, con niveles de confianza del 95 % ($\alpha = 0,05$) y un potencial estadístico del 78 %. El tamaño de efecto considerado para el cálculo muestral fue medio (0,5). El análisis indicó que se requerían al menos 25 pacientes para lograr resultados significativos.

Cada paciente fue controlado en tres tiempos (T0, T1 y T2), estos debían tener al menos 2 dientes premolares superiores con indicación de extracción por ortodoncia, idealmente contralaterales, en los cuales se realizaron restauraciones de resina compuesta oclusales.

Participaron en el estudio:

- Pacientes de ambos géneros, en dentición mixta o permanente.
- Pacientes que presentaban al menos 2 dientes premolares superiores con indicación de extracción por ortodoncia, idealmente contralaterales.
- Muestras de saliva inicial positivas a la presencia de *Streptococcus mutans*.

Fueron excluidos de la investigación aquellos pacientes que cumplieran alguna de las siguientes condiciones:

- Consumieran fármacos que produjeran alteraciones en el flujo salival, como antidepresivos, narcóticos, diuréticos, antihistamínicos, antihipertensivos y antieméticos.
- Bajo tratamiento con colutorios y/o geles de clorhexidina u otro antiséptico bucal (cuyo compuesto activo fuera cloruro de cetilpiridinio, triclosán, hexetidina, xilitol y sales de zinc como cloruro de zinc, citrato de zinc y sulfato de zinc) y/o pastas dentales con

concentraciones de flúor mayor o igual a 2500 ppm de ion flúor durante los últimos tres meses.

- En tratamiento con antibióticos durante los últimos tres meses.
- En tratamiento de fármacos inmunosupresores (corticoides).
- Clasificados según la American Society of Anesthesiologic como ASA III, los cuales son pacientes con enfermedad sistémica grave, pero no incapacitante.
- Portadores de aparatos protésicos removibles o fijos, planos de relajación o de cualquier artefacto acrílico.
- Consumieran goma de mascar cuatro o más días a la semana.
- Con dificultades motrices que les impidieran realizar su propia higiene dental.

Procedimiento

Un operador, previamente calibrado en examen clínico, reclutó y seleccionó a los pacientes, tomó las muestras, realizó el procesamiento microbiológico (supervisado por un académico del área de microbiología). Un segundo operador confeccionó las restauraciones de resina compuesta y, un tercero, realizó el análisis estadístico. Se evaluaron 47 pacientes de la clínica de Ortodoncia de segundo año en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (FOUCH) en el periodo de mayo-octubre de 2019, previa autorización del alumno tratante, y se ingresaron al estudio los 25 que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión definidos, asignándole un número de ingreso al estudio según una secuencia de aleatorización en planilla del programa Microsoft Office Excel 2007. Todos los pacientes firmaron un consentimiento en forma libre y voluntaria (Fondecyt n.º 1170575), autorizado por el Comité de Ética Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

En cada paciente seleccionado se tomó una muestra de saliva para determinar presencia/ausencia de *Streptococcus mutans* en su microbiota oral. Mediante la estimulación de saliva con papel de parafina, se obtuvo aproximadamente 1 mL (1000 µl) en tubos de ensayo estériles. Los tubos fueron rotulados con el nombre del paciente y la fecha correspondiente.

Una vez confirmada la presencia de colonias de *Streptococcus mutans* en las muestras obtenidas de cada paciente, se utilizó la técnica de la cubeta⁽⁴⁾ para obtener la biopelícula depositada sobre la superficie oclusal de los dientes premolares superiores seleccionados mediante las cubetas destinadas para cada uno de los pacientes. Trabajando en una campana de bioseguridad tipo II

(Dwyer Mark II, Filtro Met) se colocaron en placas de Petri estériles bajo luz ultravioleta durante 20 minutos y se llenaron con 3 mL de agar TYCSB (agar con extracto de levadura tripticasa, cisteína y sacarosa con bacitracina). Se llevaron a estufa de incubación por 24 horas a 37 °C para comprobar que los medios de cultivo no se encontraran contaminados, para de efectuar un control de calidad. Se guardaron en el refrigerador hasta su utilización.

Se confeccionaron las restauraciones oclusales de resina compuesta (Opallis, FGM) mediante la técnica incremental. Al finalizar el último incremento oclusal de resina compuesta se procedió a pincelar con adhesivo toda la superficie y márgenes de la restauración con el objetivo terapéutico de mejorar el pulido y sellado final. Además, la capa de adhesivo cargada con óxido de zinc y cobre permitió verificar sus propiedades antimicrobianas de superficie. Se comprobó la oclusión y se pulieron las restauraciones. Todo lo anterior se realizó bajo una efectiva técnica de aislación relativa.

La composición de cada grupo fue la siguiente:

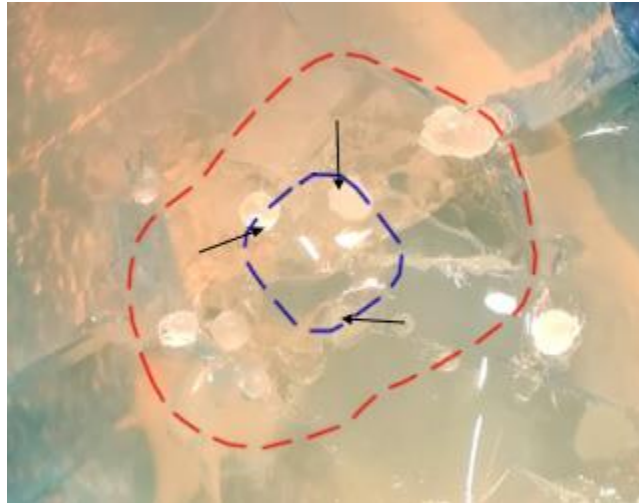
- Grupo experimental: 25 dientes premolares superiores en los cuales se realizaron restauraciones de resina compuesta oclusal con sistema adhesivo cargado con nanopartículas de óxido de zinc y cobre.
- Grupo control: 25 dientes premolares superiores en los cuales se realizaron restauraciones de resina compuesta oclusal con sistema adhesivo no cargado con nanopartículas de óxido de zinc y cobre.

Pasada la primera semana después del tratamiento, y nuevamente a la cuarta, se tomaron muestras de la biopelícula adherida a las restauraciones oclusales de resina compuesta confeccionadas previamente, en ambas ocasiones se utilizó la técnica de la cubeta.

Al igual que en la muestra microbiológica inicial, las placas de Petri que contenían las cubetas fueron trasladadas al laboratorio de microbiología en bolsas de frío, una vez ahí, se incubaron en estufa a 37 °C en jarra con vela para lograr condiciones de microaerofilia durante 48 horas.

A partir de todas las muestras se identificaron colonias de *Streptococcus mutans* sobre la base de la morfología colonial (macroscópica) y adherencia de las colonias al agar, observadas bajo lupa estereoscópica y fuente luminosa (Fig. 1). El recuento de UFC de *Streptococcus mutans* sobre la

impronta en agar TYCSB de las superficies oclusales fue realizado por un operador previamente calibrado.



Nota: Rojo: contorno de la superficie oclusal del diente; azul: restauración de resina compuesta. Se señala UFC *Streptococcus mutans* contabilizadas en el recuento del estudio.

Fig. 1 - Impresión de la superficie oclusal de un premolar con la técnica de la cubeta.

Se tomaron fotografías de las impresiones correspondientes a cada paciente. En ellas se pudo delimitar el área de la superficie oclusal de cada premolar y, además, la restauración de resina compuesta confeccionada durante el estudio, y así guardar el registro del recuento de UFC de *S. mutans*.

El análisis estadístico fue realizado por un tercer operador. A este se le entregaron los recuentos de *Streptococcus mutans* en T0 (previo aplicación de los adhesivos experimentales), T1 (una semana posterior a la aplicación de los adhesivos) y T2 (cuatro semanas posterior a la aplicación de los adhesivos).

Se utilizó el test Shapiro-Wilk ($p \leq 0,05$) para determinar si la distribución de los datos fue normal. Como los datos no se distribuyeron de forma normal, se utilizó el T-test para la comparación de los resultados en T0, T1 y T2, con un nivel de confianza de 95 %. Todo el análisis se llevó a cabo con el programa IBM SPSS Statistics versión 25.

Resultados

De los 25 pacientes reclutados, el promedio de edad fue de 22 años. Se contó con la participación de 16 mujeres (64 %) y 9 hombres (36 %). De acuerdo a la clasificación de riesgo cariogénico basada en el recuento de UFC *Streptococcus mutans* en saliva, se estableció que un 12 % de los pacientes estudiados presentaron bajo riesgo de caries dental, un 64 % riesgo moderado y un 24 % se encontraba en la categoría de alto riesgo. Por último, la experiencia de caries estuvo representada por el COPD (dientes cariados, obturados y/o perdidos) de cada paciente, cuyo promedio fue de 7,08.

El frotis de subcultivo líquido a partir de una colonia de *Streptococcus mutans* teñido con Gram, mostró formas cocáceas, Gram positivo y agrupadas en cadenas, característico de bacterias del grupo *Mutans Streptococci* (Fig. 2).

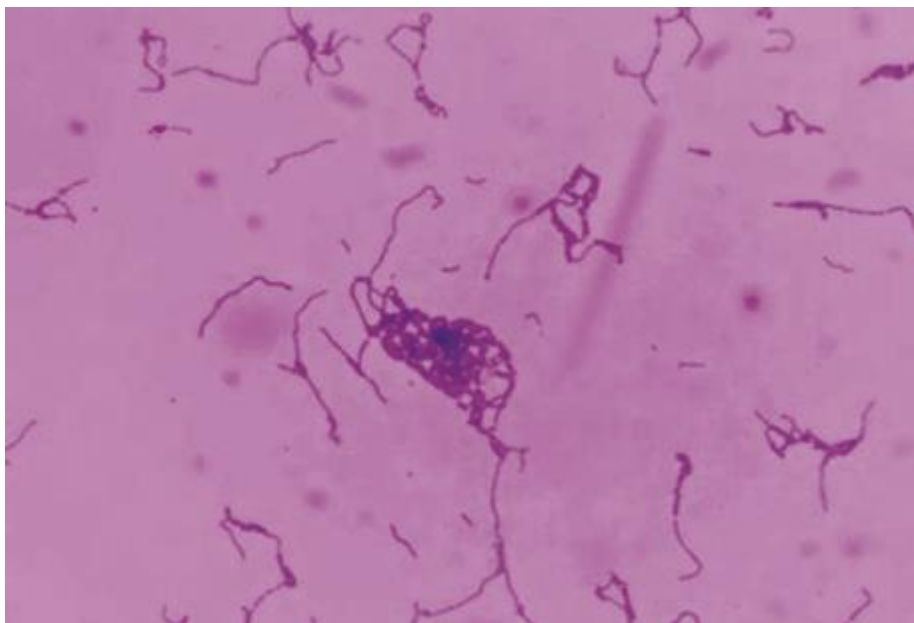


Fig. 2 - Frotis de un subcultivo líquido a partir de colonia de *Streptococcus mutans*, seleccionada por su macromorfología colonial, teñido con tinción Gram (Aumento 100x)

Diferencias en el recuento de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* antes y después de la aplicación del adhesivo

En primer lugar, se utilizó el test de Shapiro-Wilk para determinar la forma en que se distribuyen los datos de la muestra. El cálculo mostró que la distribución de los valores no es normal ($p < 0,05^*$), tal como se describe en la tabla 1.

Tabla 1 - Tabla comparativa donde se observa para cada variable (diente A con nanopartículas [NP]) y diente B sin NP), número de casos, mínimo, máximo, y los resultados del test de Shapiro Wilk.

	Diente A (con NP)			Diente B (sin NP)		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2
N.º de casos	25	25	25	25	25	25
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Máximo	11	25	11	27	12	19
Shapiro-Wilk estadístico	0,630	0,393	0,571	0,400	0,695	0,476
Shapiro-Wilk <i>p</i> -valor	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*

En la figura 3 se grafica la distribución de los datos en T0 (antes de la aplicación), T1 (una semana posterior a la aplicación) y T2 (cuatro semanas posteriores a la aplicación) del recuento de UFC de colonias de *Streptococcus mutans*, tanto para el adhesivo experimental como el control.

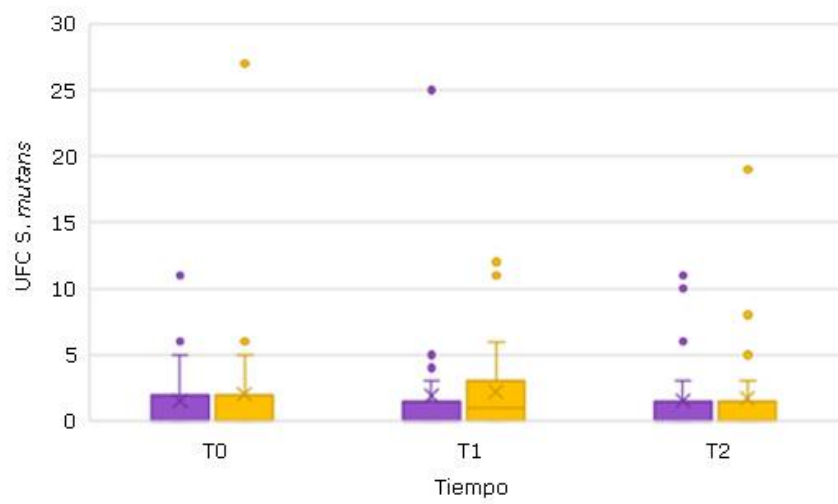


Fig. 3 - Recuento de las UFC de *S. mutans* grupo experimental (en morado, adhesivo con ZnONp y CuNp) y grupo control (en amarillo, adhesivo sin ZnONp y CuNp) en T0, T1 y T2, respectivamente. La línea continua representa el valor de la mediana de la muestra, las X representan el promedio obtenido y los círculos corresponden a todos aquellos valores extremos.

Además, se utilizó el T-test puesto que se comparó una misma característica (recuento de UFC *Streptococcus mutans* en la superficie oclusal de las restauraciones de resina compuesta) pero, en dos circunstancias distintas. La intención fue comparar la diferencia entre dos variables numéricas (antes y después de la aplicación del adhesivo) en un mismo grupo. La tabla 1 muestra la distribución paramétrica para los distintos grupos de este estudio; en la tabla 2, se describe la cantidad de UFC de *Streptococcus mutans* contadas en la superficie oclusal de los premolares, con indicación de exodoncia por tratamiento de ortodoncia, a partir de muestras de biofilm obtenidas de un mismo diente antes (T0 = primera muestra microbiológica), después de una semana (T1 = segunda muestra microbiológica) y después de cuatro semanas (T2 = tercera muestra microbiológica) de la confección de resinas compuestas oclusales con adhesivo con/sin nanopartículas (NP) de óxido de zinc y cobre, mediante la técnica de la cubeta.

Tabla 2 - Tabla comparativa donde se observa el promedio del recuento de *S. mutans* en T0, T1 y T2, desviación estándar y significancia; datos calculados por T-test

Tiempo	Promedio	Desviación estándar	Significancia
T0 con NP	1,48	2,69 (± 0,54)	0,501*
T0 sin NP	2,00	5,45 (± 1,09)	
T1 con NP	1,88	5,00 (± 1,00)	0,746*
T1 sin NP	2,16	3,35 (± 0,67)	
T2 con NP	1,52	3,05 (± 0,61)	0,878*
T2 sin NP	1,68	4,07 (± 0,81)	

* $p < 0,05$ estadísticamente significativos.

El promedio del recuento de UFC de *Streptococcus mutans* en el grupo experimental (adhesivo modificado con nanopartículas de óxido de zinc y cobre) T1 y T2 fueron mayores que T0.

Discusión

En este estudio no existe relación entre el recuento de *S. mutans*, a partir del biofilm depositado sobre las superficies oclusales de los premolares o las resinas compuestas confeccionadas durante la investigación y el COPD. Este es un índice que permite tener una visión global del daño

acumulado que posee el paciente. Son diversos los factores que en conjunto provocan dicho daño, tales como factores propios del hospedero, factores ambientales y socioeconómicos. Por esta razón, la sola presencia de bacterias no determinará un COPD alto, sino que son todos los determinantes en conjunto.

A partir de las muestras obtenidas, se observaron múltiples formas, tonalidades de color y tamaños de las colonias bacterianas, pero se mantuvo como característica común su adherencia al medio de cultivo. Lo anterior se corresponde con el polimorfismo colonial que puede presentar *Streptococcus mutans*, lo cual complejiza la situación en algunos casos por su similitud en apariencia y características con otras bacterias.

Dentro de las limitaciones de la microscopía directa está que no proporciona datos sobre géneros ni especies bacterianas, aunque sí sobre la morfología tradicional. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar presencia de *S. mutans* es una de las alternativas más rápida y segura para su identificación, además, la sensibilidad de la técnica es superior al método microbiológico.

La técnica de la cubeta permitió aislar *Streptococcus mutans* en un 76 % de los pacientes, exclusivamente en las superficies de los dientes incluidos en el estudio, cifra que aumenta al contabilizar las colonias observadas en la impresión por completo. Esto es similar a un estudio realizado anteriormente, en el que, mediante la misma técnica se logró aislar *Streptococcus mutans* y permitió el recuento del microorganismo en estudio.⁽³⁾

Al comparar la cantidad de UFC de *S. mutans* en restauraciones de resina compuesta confeccionadas con adhesivo cargado con CuNP y ZnONP y restauraciones de resina compuesta confeccionadas con adhesivo control sin presencia de nanopartículas mediante la técnica de la cubeta, no se encontraron diferencias significativas; incluso, fue mayor el promedio para el grupo de las muestras microbiológicas en T1 y/o T2 que en T0 (previo a la confección de las restauraciones). Por lo tanto, se rechaza la hipótesis que planteaba una disminución en el recuento de UFC de *S. mutans* sobre la superficie oclusal de resinas compuestas gracias a la incorporación de nanopartículas de óxido de zinc y cobre en el adhesivo dental.

En primer lugar, el resultado puede estar influenciado por la técnica y momento de higiene de los pacientes, por ejemplo, aun cuando se les recordaba no consumir alimentos ni enjuagarse la boca, no cepillar los dientes al menos 2 horas antes de la muestra microbiológica, se consideró posible el ocultamiento de información.

Además, una clara desventaja de la técnica de la cubeta radica en que está limitada a las caras oclusales y libres de piezas dentarias, y al ser los espacios proximales zonas estrechas y de mayor retención provocan que el agar, categorizado como material poco resistente a la tracción, tiende al desgarro, lo que pudo dificultar el recuento de las colonias, concordando con el estudio de Vildósola y otros.⁽⁴⁾

Los componentes de la superficie del material de restauración fueron clave en la colonización de los microorganismos, ya que, si se agrega un deficiente control de placa por parte del paciente, puede detonar en una mayor prevalencia de formación de caries secundaria a la restauración. De ahí la importancia del desarrollo de materiales y sus propiedades antimicrobianas, puesto que hasta el momento existen pocos estudios o información limitada al respecto.⁽⁵⁾

La idea detrás de la incorporación de ZnONp y CuNp en los sistemas adhesivos era agregar propiedades antimicrobianas. Los adhesivos dentales se cargaron con ZnONp⁽⁶⁾ o CuNp,^(2,7) pero no existe mucha evidencia sobre los efectos antimicrobianos de la combinación de ambas nanopartículas.

Este es el primer estudio *in vivo* que evaluó el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de óxido de zinc y cobre agregadas al adhesivo dental sobre *Streptococcus mutans*. Como limitaciones de este estudio podemos mencionar que los resultados no muestran diferencias significativas en la actividad antimicrobiana contra *S. mutans*, por lo tanto, no se puede establecer clínicamente relevante ni como una solución definitiva al proceso de caries secundaria, y he ahí la importancia de seguir la línea de investigación. Otras limitaciones son el tamaño muestral y el tiempo de exposición de los adhesivos al medio oral (acotado solo a cuatro semanas, en este caso, interrumpido por la indicación de las exodoncias por parte del equipo de ortodoncia para continuar con el tratamiento).

En estudios futuros se podría estudiar el potencial antimicrobiano de las nanopartículas de óxido de zinc y cobre sobre otros microorganismos orales relacionados con la enfermedad de caries dental, como *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacilli spp.* Además, se podría determinar si existe un efecto de la incorporación de las nanopartículas en el recuento de *Streptococcus mutans* en saliva a largo plazo, tomando muestras microbiológicas en distintos momentos durante el estudio o probar su utilidad en el reacondicionamiento o reparación de restauraciones de resina compuesta con años de antigüedad.

El promedio del recuento de UFC de *Streptococcus mutans* en el grupo experimental (adhesivo modificado con nanopartículas de óxido de zinc y cobre) T1 y T2 fueron mayores que T0. No existieron diferencias significativas en el recuento de *Streptococcus mutans* antes y después de la aplicación del adhesivo sobre las restauraciones de resina compuesta, a partir de muestras de biopelícula obtenidas mediante la técnica de cubeta.

Referencias bibliográficas

1. Gutiérrez MF, Alegria-Acevedo LF, Mendez-Bauer L, Bermudez J, Davila-Sanchez A, Buvinic S, *et al.* Biological, mechanical and adhesive properties of universal adhesives containing zinc and copper nanoparticles. J Dent. 2019 [acceso: 17/01/2020]; 82. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300571219300211?via%3Dihub>
2. Gutiérrez M, Malaquias P, Hass V, Matos T, Lourenço L, Reis A, *et al.* The role of copper nanoparticles in an etch-and-rinse adhesive on antimicrobial activity, mechanical properties and the durability of resin-dentine interfaces. J Dent. 2017 [acceso: 17/01/2020]; 61. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030057121730091X?via%3Dihub>
3. Vildósola Grez P, Fernandez E, Cury Saad JR, Palma Fluxá P, Chaple Gil AM, Acuña Zepeda N, *et al.* Decrecimiento de *Streptococcus mutans* después de la aplicación de sellantes en superficies oclusales de molares permanentes en adultos. Rev Cubana Estomatol. 2019 [acceso: 17/01/2020]; 56(4). Disponible en: <http://revestomatologia.sld.cu/index.php/est/article/view/2121>
4. Vildósola P, Palma P, Zuñiga P, Fernandez E, Oliveira Junior OB, Moncada G. Recovering *Streptococcus mutans* over restorations by the tray technique: a randomized clinical study. Braz J Oral Sci. 2013 [acceso: 17/01/2020]; 12(4). Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1677-32252013000400004&script=sci_arttext
5. Huang B, Siqueira WL, Cvitkovitch DG, Finer Y. Esterase from a cariogenic bacterium hydrolyzes dental resins. Acta Biomater. 2018 [acceso: 17/01/2020]; 71. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29496621>
6. Mahshid S, Marjan R, Mohammadreza T, Amir P. Antimicrobial and bond strength properties of a dental adhesive containing zinc oxide nanoparticles. Braz J Oral Scie. 2016 [acceso: 17/01/2020]; 15(1). Disponible en: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/bjos/article/view/8647127>

7. Gutiérrez M, Malaquias P, Matos T, Szesz A, Souza S, Bermudez J, *et al.* Mechanical and microbiological properties and drug release modeling of an etch-and-rinse adhesive containing copper nanoparticles. *Dent Mater.* 2017 [acceso: 17/01/2020]; 33(3). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S010956411630776X?via%3Dihub>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

1. *Conceptualización:* Eduardo Fernandez ,Patricia Palma Fluxá ,Patricio Vildósola Grez.
2. *Curación de datos:* Macarena Castro ,Patricia Palma Fluxá.
3. *Análisis formal:* Macarena Castro;Patricia Palma Fluxá;Alain Manuel Chaple Gil;Patricio Vildósola Grez;Eduardo Fernandez.
4. *Adquisición de fondos:* Eduardo Fernandez ,Patricio Vildósola Grez.
5. *Investigación:* Macarena Castro ,Patricia Palma Fluxá ,Eduardo Fernandez.
6. *Metodología:* Patricia Palma Fluxá ,Patricio Vildósola Grez.
7. *Administración del proyecto:* Eduardo Fernandez.
8. *Recursos:* Eduardo Fernandez.
9. *Software:* Eduardo Fernandez;Alain Manuel Chaple Gil.
10. *Supervisión:* Eduardo Fernandez ,Patricia Palma Fluxá ,Patricio Vildósola Grez.
11. *Validación:* PP ,Eduardo Fernandez ,Patricio Vildósola Grez
12. *Visualización:* Patricia Palma Fluxá ,Eduardo Fernandez ,Patricio Vildósola Grez.
13. *Redacción – borrador original:* Macarena Castro ,Patricia Palma Fluxá ,Alain Manuel Chaple Gil ,Patricio Vildósola Grez ,Eduardo Fernandez.
14. *Redacción – revisión y edición:* Macarena Castro ,Patricia Palma Fluxá ,Alain Manuel Chaple Gil ,Patricio Vildósola Grez ,Eduardo Fernandez.