

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 957 907**

21 Número de solicitud: 202230570

51 Int. Cl.:

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 31/195** (2006.01)

**A61K 47/02** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**24.06.2022**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**29.01.2024**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS (90.9%)**  
**C/ Tulipán, s/n - Despacho 202, 2ª planta**  
**Rectorado**  
**28933 Móstoles (Madrid) ES y**  
**UNIVERSIDAD DE GRANADA (9.1%)**

72 Inventor/es:

**GARCÍA MUÑOZ, Rafael;**  
**SANZ MARTÍN, Raúl;**  
**MORALES PÉREZ, Victoria;**  
**NAVAS LÓPEZ, Francisco;**  
**MARTÍNEZ ERRO, Samuel;**  
**FERNÁNDEZ GARCÍA, Paloma;**  
**CEBALLOS GARCÍA, Laura;**  
**LÓPEZ RUIZ, Marta;**  
**GIRÁLDEZ DE LUIS, Isabel;**  
**FUENTES FUENTES, María Victoria y**  
**FERRER LUQUE, Carmen María**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **Nanopartículas de sílice que contienen L- arginina su procedimiento de obtención y el uso de las mismas**

57 Resumen:

La invención se refiere a nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs) que contienen N-oleoil-L-arginina. La invención también se refiere al procedimiento, basado en el enfoque del agente director de la estructura con actividad farmacológica, para la preparación de dichas nanopartículas, que son particularmente útiles para la preparación de adhesivos dentales terapéuticos.

**ES 2 957 907 A1**

## DESCRIPCIÓN

### **NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE QUE CONTIENEN L-ARGININA, SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y EL USO DE LAS MISMAS**

5

La invención se refiere a nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs) que contienen L-arginina, su procedimiento de obtención y el uso de las mismas. Son particularmente útiles para la preparación de adhesivos dentales. Por lo tanto, la presente invención pertenece al campo de los nanomateriales aplicados a la medicina y, más  
10 específicamente, al área de la salud dental.

### **ESTADO DE LA TÉCNICA**

A nivel mundial, la caries dental sigue siendo la enfermedad bucal mediada por  
15 biopelículas más prevalente que afecta a los dientes permanentes de 2.300 millones de personas en todo el mundo. Los composites de resina son el material de primera elección y el más ampliamente utilizado, para restaurar lesiones de caries y restauraciones defectuosas en dientes anteriores y posteriores. Varias razones contribuyen a su popularidad, tales como su alto rendimiento mecánico y estético, fácil  
20 manejo y compatibilidad con los principios de la Odontología de Mínima Intervención, ya que se colocan de forma adhesiva y, por lo tanto, requieren preparaciones menos invasivas. Sin embargo, la longevidad de las restauraciones de composites de resina es limitada, siendo la caries secundaria en los márgenes de las restauraciones debido a los ácidos de la biopelícula una de las principales razones del fracaso clínico. La caries  
25 secundaria se ha relacionado con la presencia de defectos marginales en una restauración, debido a la contracción de polimerización de los adhesivos y composites resinosos y a la degradación de la capa híbrida, permitiendo la penetración, proliferación y mayor degradación de bacterias cariogénicas. Asimismo, la caries secundaria es significativamente más frecuente en los pacientes con alto riesgo de  
30 caries. Esto es de enorme importancia, ya que los componentes resinosos pueden estimular el crecimiento de las bacterias acidógenas al proporcionar una fuente de carbono y oxígeno.

Una de las estrategias para prevenir el desarrollo de caries secundarias es la  
35 introducción de modificadores de biopelículas, principalmente en los adhesivos dentales, dado que inhibirían las poblaciones microbianas con acción cariogénica y

potenciarían el crecimiento de las bacterias prosaludables.

Entre los materiales más ampliamente utilizados en Odontología para la liberación de fármacos se encuentran las nanopartículas metálicas, partículas poliméricas, micelas, liposomas y nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs). En comparación con otras nanopartículas, las MSNs tienen las características únicas de estructura mesoporosa, gran área superficial y volumen de poro, propiedades fisicoquímicas estables, fácil modificación de la superficie y buena biocompatibilidad (Jadhav, K.S. *et al. J. Nanomed. Res.* 2015; 5: 00043; Narayan, R.*et al. Pharmaceutics* 2018, 10, 118-157; Singh P. *et al. ACS Biomater. Sci. Eng.* 2019; 5: 4882-4898). En la síntesis típica de las MSNs, se requiere un agente director de la estructura para ordenar la mesoestructura. Después de eso, este compuesto necesita ser eliminado de las MSNs para obtener los poros que albergarían los diferentes productos farmacéuticos dependiendo de las aplicaciones. Recientemente, Morales V. *et al. (Adv. Funct. Mater.* 2016; 26: 7291-7303) han informado sobre el concepto de agente director de la estructura con actividad farmacológica (DSDA), basado en el uso de moléculas con actividad farmacológica convenientemente modificadas para ser utilizadas como tensioactivos en la síntesis de MSNs. Estos DSDAs presentan una cabeza hidrófila, la molécula biológicamente activa, y una cola hidrocarbonada hidrófoba. Por tanto, la química supramolecular de estos agentes en medios acuosos provoca la formación de micelas, que promueven la formación de las MSNs a través de interacciones electrostáticas con los precursores de sílice correspondientes. De forma adicional, además de ordenar la mesoestructura de las MSNs, los DSDAs poseen actividad farmacológica y, de ahí, desempeñan un doble papel que dota a la MSN sintetizada mediante este enfoque de atributos médicos intrínsecos.

La L-arginina es un aminoácido semiesencial presente en la dieta y, también producido naturalmente por el cuerpo y secretado en la saliva en forma libre o como péptidos salivales. La L-arginina se considera un modificador de biopelículas a base de prebióticos, ya que ciertas bacterias bucales, tales como *S. sanguis*, *S. parasanguinis* y *S. gordonii*, pueden metabolizar la arginina por la vía de la arginina deiminasa (ADS), produciendo amoníaco y neutralizando las condiciones ácidas perjudiciales para la salud bucodental. Es más, diferentes estudios han demostrado que la arginina inhibe el crecimiento de bacterias patógenas, tales como *S. mutans* (Burne *et al. FEMS Microbiol Lett.* 2000; 193:1-6) y su incorporación en pastas de dientes fluoradas ha demostrado reducir clínicamente la incidencia de caries dental (Xue *et al. J. Dent.* 2017; 67: 88-93).

Por consiguiente, este prebiótico bucal se ha incluido también en su forma libre en barnices fluorados, cementos de ionómero de vidrio, cementos de resina curados con luz para ortodoncia y adhesivos dentales (Geraldini *et al. J. Dent.* 2017; 63: 72-80).

5 El principal tratamiento para restaurar las lesiones de caries consiste en el uso de resinas compuestas adhesivas debido a sus buenas propiedades. Sin embargo, la progresiva degradación del adhesivo a medio plazo junto con un alto riesgo de caries posibilitan la aparición de caries secundarias, permitiendo la proliferación de bacterias cariogénicas. Por esta razón, la presente invención proporciona nuevas nanopartículas  
10 para ser utilizadas en adhesivos dentales como fuente de basicidad, derivadas de la L-arginina, para neutralizar las perjudiciales condiciones ácidas que median en el desarrollo de la caries dental.

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15 Los inventores de la presente invención han descubierto que un adhesivo dental que incorpora un sistema de administración de fármacos basado en nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs) que contienen L-arginina libera este aminoácido esencial, que actúa como fuente de basicidad para neutralizar las condiciones ácidas perjudiciales  
20 que intervienen en el desarrollo de la caries dental. Los experimentos *in vitro* y de cultivo de bacterias probaron que la L-arginina se liberaba de forma sostenida de las MSNs y se dispersaba fuera del adhesivo dental, contribuyendo eficazmente a la reducción de las cepas bacterianas *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. Por otra parte, las propiedades mecánicas, adhesivas y cariogénicas del adhesivo dental no cambiaron  
25 significativamente tras la incorporación de MSNs que contenían L-arginina. Estos resultados son prometedores para la prevención de la caries secundaria.

A continuación, un primer aspecto de la presente invención se refiere a nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs) caracterizadas por que comprenden N-oleoil-L-arginina  
30 dispuesta dentro de los poros de dichas nanopartículas.

La expresión "nanopartículas de sílice mesoporosa" se refiere a nanopartículas de sílice (también llamado dióxido de silicio o SiO<sub>2</sub>) que comprende mesoporos.

35 Pueden producirse interacciones electrostáticas entre la sílice y la N-oleoil-L-arginina en el interior de los poros.



arginina a través de la reacción de amidación entre el grupo amino del carbono asimétrico de este aminoácido y el cloruro de oleilo. El compuesto formado se obtiene como un sólido una vez que la mezcla de reacción ha sido acidificada a un pH entre 3 y 6.

5

En una invención preferida, la reacción en la etapa a) se lleva a cabo a un pH entre 9 y 11. Se puede ajustar añadiendo una solución de NaOH.

En una invención preferida, la reacción en la etapa a) se lleva a cabo entre 1 y 2 h.

10

En la etapa b), el carácter anfífilo de la forma N-oleil-L-arginina permite formar micelas en contacto con el agua. Para neutralizar el DSDA que está en su forma aniónica, se utiliza (3-aminopropil)trietoxisilano (APTES) como co-agente director de la coestructura.

15

En una invención preferida, los mmol de APTES utilizados en la etapa b) son entre 1,1 y 1,5 veces superiores a los de la N-oleil-L-arginina.

En la etapa c), las micelas formadas en la etapa b) actúan como la plantilla alrededor de la cual la fuente de sílice, tetraetilortosilicato (TEOS), que se polimeriza mediante autoensamblaje supramolecular para crear el armazón de las nanopartículas de sílice mesoporosa.

20

En una invención preferida, la reacción en la etapa c) se lleva a cabo a un pH 9,5. Se puede ajustar añadiendo una solución de NaOH.

25

En una invención preferida, los mmol de TEOS utilizados en la etapa c) son entre 10 y 12 veces superiores a los de la N-oleil-L-arginina.

La invención también se refiere a las nanopartículas de sílice mesoporosa obtenidas por el método descrito anteriormente.

30

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende las nanopartículas descritas en el primer aspecto de la invención.

35

En una realización preferida, la composición es una composición farmacéutica.

La composición farmacéutica incluye preferentemente al menos un excipiente, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, la composición es un adhesivo dental.

5

La expresión "adhesivo dental", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una composición que puede adherirse a un sustrato dental acondicionado, esmalte y dentina, y al composite de resina que restaura una cavidad dental cariada

10 En una realización preferida, las nanopartículas están en una concentración entre 0,1 y 2 % en peso en la composición o adhesivo dental, más preferentemente, entre 0,5 y 2 %, incluso más preferentemente, 1 %.

La invención también se refiere a un adhesivo dental que comprende las nanopartículas de la invención.

15

El adhesivo dental puede ser cualquiera de los adhesivos dentales convencionales a base de resina conocidos en el estado de la técnica a los que se han añadido las nanopartículas de la invención.

20 En una realización preferida, el adhesivo dental es un adhesivo de grabado y lavado.

En una realización preferida, el adhesivo dental podría obtenerse mezclando bisfenol-A-glicidil-metacrilato (Bis-GMA) con 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA), siguiendo con la adición de 4-(dimetilamino)benzoato de etilo y canforoquinona y agitación en la oscuridad durante al menos 24 h. A continuación, se añaden las nanopartículas de la presente invención, y la mezcla resultante se homogeneiza mediante agitación.

25

Otro aspecto de la invención se refiere a las nanopartículas de la invención, o de una composición que las comprende, para su uso como medicamento o adhesivo dental.

30

Un último aspecto se refiere a las nanopartículas de la invención, o de una composición que las comprende, para su uso en la prevención de la caries secundaria.

La caries secundaria es una lesión de caries que se desarrolla adyacente a una restauración después de un período de tiempo. Se trata entonces de una lesión asociada con restauraciones o selladores.

35

El término "prevención" como se utiliza en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, se refiere a inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección, al que se aplica en dichos términos, uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

5

Las nanopartículas de la presente invención han demostrado tener ventajas cuando se utilizan en adhesivos dentales. En los experimentos de cultivo de bacterias se descubrió que el sistema adhesivo que contenía dichas nanopartículas proporcionaba una reducción significativa de las cepas bacterianas *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. Por último, su incorporación a diferentes concentraciones en el adhesivo dental no produjo ningún efecto perjudicial en las propiedades físico-mecánicas, propiedades adhesivas y actividad anticaries. Las nanopartículas permiten una liberación lenta y constante del DSDA. El fármaco puede avanzar desde el interior de la nanopartícula hasta el medio y la liberación máxima se establece en torno a la mitad de la cantidad inicial de DSDA en las MSNs. A modo de ejemplo, después de 6 h, el material libera alrededor del 25 % de la liberación máxima teórica del DSDA. En 2 días, la cantidad aumentó hasta alrededor del 40 % de la liberación acumulada. El material siguió liberándose después de 7 días, aunque en una tasa muy baja cuando la liberación se mantuvo en torno al 44 % de la liberación máxima teórica.

20

Las nanopartículas incorporadas en los adhesivos dentales han probado ser un enfoque terapéutico muy prometedor que abre una nueva perspectiva para prevenir la caries secundaria de forma económica, ya que dichas nanopartículas tienen actividad terapéutica en comparación con los adhesivos convencionales, actuando como modificador de biopelículas que dificulta el desarrollo y la progresión de las lesiones de caries secundaria.

25

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende normalmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. En la práctica de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos adicionales, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tras examinar la descripción o pueden aprenderse poniendo en

35

práctica la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo ilustrativo y no pretenden limitar la presente invención.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

**Fig. 1.** Esquema de la preparación de un adhesivo dental que contiene las nanopartículas de la presente invención. La expresión "Arg-C<sub>18</sub> en MSN" se refiere a las nanopartículas de la presente invención y "Arg-C<sub>18</sub> en MSN en DAdh" se refiere a un adhesivo dental que comprende dichas nanopartículas.

10

**Fig. 2.** *N*-oleoil-arginina (Arg-C<sub>18</sub>) en la forma zwitteriónica a un pH fisiológico.

**Fig. 3.** Esquema de la síntesis de MSNs utilizando *N*-oleoil-L-arginina (Arg-C<sub>18</sub>) como DSDA.

15

**Fig. 4.** Caracterización estructural y textural de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs. Micrografía de TEM (A), isoterma de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> y distribución de tamaño de poro (B), patrón de difracción de rayos X de bajo ángulo (C) y análisis termogravimétrico (D).

20

**Fig. 5.** Liberación del DSDA Arg-C<sub>18</sub> de las nanopartículas de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs.

**Fig. 6.** Liberación del DSDA de arginina a partir de los adhesivos experimentales con concentraciones de 0,5 % en peso (negro), 1 % en peso (rojo) y 2 % en peso (azul) de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs.

25

## EJEMPLOS

Seguidamente, la invención se ilustrará con algunos ejemplos llevados a cabo por los inventores, con el fin de demostrar la eficacia del producto de la invención.

30

### Materiales y métodos

#### Síntesis de las nanopartículas de sílice mesoporosa que contienen *N*-oleoil-arginina (denominadas Arg-C<sub>18</sub> en MSNs) y los adhesivos experimentales

##### Productos químicos

L-Arginina (≥98 %), cloruro de oleilo (≥89 %), (3-aminopropil)trietoxisilano (APTES, 98 %), tetraetilortosilicato (TEOS, 98 %), solución de glutaraldehído (50 % en peso en H<sub>2</sub>O), acetona (≥99,5 %), tolueno (anhidro, 99,8 %), ácido clorhídrico (35 % en p/p),

bisfenol-A-glicidil-metacrilato, 2-hidroxietilmetracrilato, 4-(dimetilamino) benzoato de etilo y canforoquinona se obtuvieron todos ellos de Sigma-Aldrich.

#### **Síntesis del DSDA N-oleoil-L-arginina (Arg-C<sub>18</sub>)**

5 A partir de la arginina, el agente director de la estructura con actividad farmacológica N-oleoil-L-arginina se obtuvo a través de la reacción de amidación entre el grupo amino del carbono asimétrico de este aminoácido y el cloruro de oleilo (C<sub>18</sub>). La reacción se realizó de la siguiente manera: La L-arginina (1,5 g, 8,6 mmol, 1 equiv.) se disolvió en una solución de H<sub>2</sub>O (7 ml) y acetona (4 ml) y la mezcla se agitó a una temperatura en  
10 un intervalo entre 10-15 °C mientras se ajustaba el pH a 10-11 con una solución de NaOH 5 N. A continuación, se añadió cloruro de oleilo (3 ml, 9,03 mmol, 1,05 equiv.) gota a gota a la solución durante 30 min. El pH de la solución se mantuvo entre 10-11 mediante la adición de gotas de la solución de NaOH acuoso 5 N. La reacción se agitó durante 1 h y, después de esto, la temperatura se aumentó a 50 °C mientras se ajustaba  
15 el pH a 3,8 con HCl (37 %). Por último, cuando el sólido se disolvió completamente, el pH se ajustó a 5-6 y el sólido final se retiró por filtración y se lavó con agua y etanol. El sólido se caracterizó por completo por <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C RMN y ESI-MS.

#### **Síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosa con el DSDA de Arg-C<sub>18</sub> (Arg-C<sub>18</sub> en MSNs)**

20 Las MSNs sintetizadas utilizando el DSDA de Arg-C<sub>18</sub> se obtuvieron de la siguiente manera. El DSDA de Arg-C<sub>18</sub> (306 mg, 0,7 mmol, 0,5 equiv.) se dispersó en agua de milli-Q (50 ml) a 90 °C durante la noche. Al día siguiente, la temperatura se redujo a 60 °C y se añadió (3-aminopropil)trietoxisilano (200 µl, 0,854 mmol, 0,61 equiv). La mezcla  
25 resultante se agitó durante 5 min antes de añadir tetraetilortosilicato (1,84 ml, 8,26 mmol, 5,90 equiv.). El pH de la mezcla se ajustó a 9,5 mediante la adición de algunas gotas de una solución de NaOH acuoso 1 M. Después de esto, la reacción se agitó 10 min; se retiró el agitador de la solución y la mezcla se calentó durante la noche a 60 °C. Por último, al día siguiente, la temperatura se aumentó a 100 °C y se mantuvo a esa  
30 temperatura durante 3 días. El sólido se retiró por filtración, se lavó con H<sub>2</sub>O y etanol, y se secó al vacío.

#### **Formulación de adhesivos experimentales**

Se obtuvo un adhesivo dental genérico de la siguiente manera: se agitaron 100 ml de  
35 bisfenol-A-glicidil-metacrilato (Bis-GMA) durante 1 hora en presencia de 48 mg de 2-hidroxietilmetracrilato (HEMA). Después de esto, se añadieron 1,66 g de 4-

(dimetilamino)benzoato de etilo y 414 g de alcanforquinona a la mezcla anterior y se agitó en la oscuridad durante 24 h.

Se añadieron Arg-C<sub>18</sub> en MSNs al adhesivo y se homogeneizaron en las  
5 concentraciones de relación de peso del 0,5 %, 1 % y 2 %, obteniendo tres adhesivos experimentales diferentes.

### **Caracterización de las nanopartículas de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs**

Las mediciones de RMN se efectuaron en un espectrómetro Varian Infinity 400 MHz  
10 equipado con un campo magnético de 9,4 T. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se muestran en ppm y se les hace referencia externamente en tetrametilsilano (TMS). Las mediciones de masa se realizaron mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento-espectrometría de masas en tándem (UHPLC-HESI-MS/MS) utilizando una interfaz de ionización por electrospray calentado con VIP (Bruker UHPLC/MS EVOQ™  
15 ELITE) con un detector de triple cuadrupolo.

Las MSNs se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) utilizando un microscopio JEOL JEM 2100 que funcionaba a 200 kV y con una resolución de 0,25 nm. Las muestras se dispersaron en etanol y se depositaron sobre una rejilla de  
20 cobre recubierta con carbono. El tamaño y la medición de las nanopartículas se determinó a partir de las micrografías de TEM utilizando el software ImageJ. Las propiedades texturales se obtuvieron a partir de las isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> a -196 °C utilizando un instrumento TriStar 3000 de Micromeritics. Antes de la medición, las muestras se calcinaron primero a 550 °C durante 5 h y luego se  
25 desgasificaron a 100 °C durante 24 h con un flujo de N<sub>2</sub>. Se asumió una geometría de poros tipo rendija para el cálculo de la distribución de tamaño de mesoporo (PSD) utilizando el modelo NLDFT.

Se realizaron análisis FTIR, utilizando la técnica de reflexión total atenuada (ATR), en  
30 un aparato de la serie Mattson Infinity en el intervalo de longitudes de onda de 4000 a 600 cm<sup>-1</sup> con un paso progresivo de 2 cm<sup>-1</sup> y recogiendo 64 barridos para cada análisis. Los patrones de XRD se registraron a partir de las muestras calcinadas en un difractómetro de polvo Philips X'PERT MPD equipado con radiación CuK $\alpha$ .

35 Los análisis termogravimétricos se realizaron bajo atmósfera de aire con un sistema Star Mettler Thermobalance en el intervalo de temperaturas de 40 a 800 °C a 5 °C min<sup>-1</sup>. Se

utilizó un potencial zeta NanoPlus DLS de Micromeritics para obtener los valores de potencial zeta de las suspensiones de partículas. Las muestras se suspendieron en agua de mili-Q con una concentración de  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  y se sometieron a ultrasonidos durante 30 min antes de la medición.

5

### **Propiedades físico-mecánicas de los adhesivos experimentales**

#### **Resistencia máxima a la tracción (UTS)**

Se prepararon diez especímenes ( $n=10$ ) de cada uno de los siguientes adhesivos utilizando moldes en forma de reloj de arena de  $10 \times 4 \text{ mm}$  (Odeme Dental Research).

10 Se colocaron en los moldes y se cubrieron con una tira de Mylar transparente y un portaobjetos.

- SB1XT: El adhesivo de grabado y lavado de dos etapas Scotchbond 1XT (3M Oral Care).

- SBUP: El adhesivo universal Scotchbond Universal Plus (3M Oral Care).

15 - Sin relleno: Un adhesivo experimental sin Arg-C<sub>18</sub> en MSNs.

- 0,5 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs: El mismo adhesivo experimental incorporando Arg-C<sub>18</sub> en MSNs al 0,5 % como relleno.

- 1 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs: El mismo adhesivo experimental incorporando Arg-C<sub>18</sub> en MSNs al 1 % como relleno.

20 - 2 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs: El mismo adhesivo experimental incorporando Arg-C<sub>18</sub> en MSNs al 2 % como relleno.

Todos se polimerizaron con luz con la unidad LED Elipar S10 (3M Oral Care) a  $1200 \text{ mW/cm}^2$  durante 20 segundos. Los extremos de los especímenes se adhirieron a una mordaza de ensayo con un pegamento de cianoacrilato y se sometieron a una prueba de resistencia a la tracción en una máquina de ensayo universal (Instron 3345, Instron Co, Canton, MA, EE.UU.) a una velocidad de travesaño de  $0,5 \text{ mm/min}$ . La resistencia máxima a la tracción (UTS) se calculó en MPa utilizando la fórmula  $UTS=F/A$ , donde F era la resistencia a la tracción (N) y A el área de la sección transversal ( $\text{mm}^2$ ). Esta última se determinó con un calibre digital (Fino GmbH, Mangelsfeld, Alemania) después de la fractura.

25

30

#### **Resistencia a la flexión (FS) y módulo de elasticidad (E)**

Se prepararon diez muestras de forma rectangular de cada uno de los adhesivos detallados anteriormente utilizando moldes de silicona de  $10 \times 2 \times 2 \text{ mm}$  (Odeme Dental Research, Luzerna, SC, Brasil). Los moldes se rellenaron con los adhesivos y se

35

cubrieron con una tira de acetato y un cubreobjetos. A continuación, se curaron con luz durante 20 segundos con la unidad LED Elipar S10. Los especímenes se almacenaron durante 24 h a 37 °C. La anchura (B) y la altura (H) en mm de los especímenes se determinaron para los cálculos posteriores con un calibre digital. Los especímenes se

5 sometieron a una prueba de resistencia a la flexión (FS) en tres puntos en una máquina de ensayo universal (Instron 3345) con una velocidad de travesaño de 0,5 mm/min. Se anotó la carga máxima a la fractura (F) en N, y se determinó la FS con la siguiente fórmula  $FS = 3FL/(2BH^2)$ , en la que L era la distancia entre soportes. También se calculó el valor del módulo de elasticidad (E) mediante una ecuación convencional  $E =$

10  $L^3F/4wH^3d$ , en la que L es la longitud de tramo de soporte (mm), w es la anchura del espécimen en mm, y d es la deflexión (mm) a la carga F.

#### **Dureza Vickers (VHN)**

Se prepararon cinco especímenes en forma de disco de cada adhesivo experimental utilizando moldes de silicona de 5 x 1 mm. Los moldes se colocaron en un portaobjetos de microscopio y se rellenaron con los diferentes adhesivos que se cubrieron con una tira de acetato y se prensaron con un portaobjetos transparente para eliminar el exceso de adhesivo. Todos los especímenes se curaron con luz como se ha descrito anteriormente y se retiraron de los moldes 20 min después de su preparación. Se

15 almacenaron durante 24 h en seco a 37 °C y se pulieron con un disco de OPA. Las mediciones de microdureza se realizaron mediante un microdurómetro digital Vickers (Buehler 2101, Lake Bluff, IL, EE.UU.). Se registraron diez indentaciones en cada espécimen aplicando una carga constante de 50 g durante 30 segundos.

#### **Grado de conversión (DC)**

Se prepararon cinco especímenes de cada adhesivo. Cada espécimen se midió antes y después de la fotopolimerización durante 20 segundos con la unidad de luz de curado Elipar S10. El DC se determinó con un espectrómetro de infrarrojos con transformada de Fourier (Excalibur Series 3100, Varian; Walnut Creek CA, EE.UU.). El espectro de

25 absorbancia incluyó 16 barridos con una resolución de 2  $\text{cm}^{-1}$ . Para analizar los especímenes no curados, se depositó una gota de cada adhesivo en el sensor de la máquina y se analizó. Una vez terminado, la misma muestra se curó con luz durante 20 segundos y se volvió a analizar. El DC de cada adhesivo se calculó de acuerdo con la ecuación  $DC (\%) = \{1 - (X_a/Y_a)/(X_b/Y_b)\} \times 100$ , donde  $X_a$  (polimerizado) y  $X_b$  (sin

30 polimerizar) representan las bandas de los dobles enlaces alifáticos polimerizables  $C=C$  (vinilo) ( $1635 \text{ cm}^{-1}$ ), y  $Y_a$  (polimerizado) e  $Y_b$  (sin polimerizar) representan las bandas de

los dobles enlaces aromáticos C=C (1608 cm<sup>-1</sup>).

### **Prueba de resistencia adhesiva a la microtracción ( $\mu\text{tbs}$ )**

Una vez obtenida la aprobación del Comité de Ética de la Universidad Rey Juan Carlos  
5 (Madrid, España), se seleccionaron 30 terceros molares humanos sanos y se  
almacenaron en una solución de timol al 0,1 % a 4 °C durante un máximo de 3 meses.  
La dentina media se expuso seccionando la corona paralela a la unión amelocementaria  
con un diamante a baja velocidad refrigerado con agua (IsoMet 5000 Linear Precision  
Saw, Buehler, Lake Bluff, IL, EE.UU.). La dentina se pulió con un disco abrasivo de SiC  
10 de 600 grit (Buehler) durante 60 segundos para crear una capa de barrillo dentinario  
estandarizada. Los dientes se asignaron aleatoriamente a seis grupos experimentales,  
siendo los mismos descritos para las pruebas mecánicas. Todos los adhesivos se  
aplicaron con una técnica de grabado y lavado. Por lo tanto, la dentina se grabó durante  
15 segundos con ácido fosfórico al 36 % (DeTrey Conditioner 36, Dentsply Sirona), se  
15 enjuagó durante otros 15 segundos y se secó al aire. Todos los adhesivos se aplicaron  
activamente frotándolos durante 20 segundos con una brochita, y los disolventes se  
evaporaron utilizando una ligera corriente de aire. Los adhesivos se fotopolimerizaron  
durante 20 segundos con la unidad de curado LED Elipar S10. Las coronas se  
restauraron con el composite universal Ceram. X Spectra ST (Dentsply Sirona) en 3  
20 incrementos de 2 mm cada uno. Cada capa se fotopolimerizó durante 20 segundos con  
la misma unidad de curado. El área central de la superficie oclusal de composite se  
dibujó con un rotulador permanente. La dentina periférica se dibujó con otro color, así  
como el esmalte. Los especímenes se mantuvieron en agua destilada durante 24 h a  
37 C. Los dientes se seccionaron perpendicularmente en las direcciones X e Y con un  
25 a sierra de diamante de baja velocidad refrigerado con agua (IsoMet 5000 Linear  
Precision Saw) para obtener especímenes con una sección transversal de  $0,9 \pm 0,2$   
mm<sup>2</sup>.

Cada espécimen se fijó individualmente a una pletina de Geraldeli de acero inoxidable  
30 con muescas utilizando un pegamento de cianoacrilato y se traccionó hasta la fractura  
en una máquina de ensayo universal Instron 3345 (Instron) con una velocidad de  
travesaño de 0,5 mm/min. La carga a la fractura se registró en Newtons (N) y se dividió  
por el área de cada espécimen para calcular los valores de la resistencia adhesiva a la  
microtracción en MPa. El área de adhesión se determinó con un calibre digital en mm<sup>2</sup>.

35

### Estudios de administración de L-arginina

El estudio de administración de fármacos de DSDA que contenía L-arginina de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs se realizó suspendiendo las nanopartículas en agua de milli-Q a 37 °C con agitación. En determinados momentos, se extrajo 1 ml de la solución para su monitorización. Después de la centrifugación, la concentración del DSDA en la solución se obtuvo utilizando un espectrómetro UV (JASCO V-630) a un máximo de 196 nm. 1 ml de la solución extraída se devolvió luego al medio original directamente después de la medición de UV-vis.

Los experimentos de liberación de DSDA de los adhesivos dentales que contenían Arg-C<sub>18</sub> en MSNs (Arg-C<sub>18</sub> en MSNs en DAdh) se efectuaron de la siguiente manera. Los especímenes de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs en DAdh experimental con una longitud de 30 mm, una anchura de 10 mm y un espesor de 2-3 mm se curaron con luz durante 20 segundos. Estos especímenes se cortaron en fragmentos más pequeños de 1-2 mm de longitud, anchura y espesor. Se sumergieron 120 mg de estos especímenes en H<sub>2</sub>O de mili-Q con agitación a 37 °C y se tomaron alícuotas de 120 min a 1 semana para determinar la concentración de DSDA utilizando UHPLC/MSMS.

### Actividad antibacteriana de los adhesivos

#### Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las bacterias utilizadas en este estudio fueron *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus gordonii* ATCC 33399 y *Lactobacillus casei* ATCC 393. Las bacterias se mantuvieron en tubos que contenían agar infusión cerebro corazón (BHI) (Scharlau Chemie SA, Barcelona, España), a 4°C para su uso adicional en los experimentos. A partir del subcultivo de cada cepa, se preparó una suspensión convencional de 1 McFarland en caldo BHI y se diluyó posteriormente para obtener una suspensión de aproximadamente 1×10<sup>7</sup> unidades formadoras de colonias por mililitro (CFUs/ml) (Ruiz-Linares *et al. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2014; 20:13:41.).

#### Prueba de actividad antibacteriana

La actividad antimicrobiana de los materiales se evaluó como se ha descrito previamente (Zhang *et al. J. Endod.* 2009; 35:1051-5; Ruiz-Linares *et al. Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014; 20:13:41) mediante una prueba de contacto directo (DCT) con algunas modificaciones. Los adhesivos (n = 8/grupo) se insertaron en la pared lateral de los 96 pocillos de placas de microtitulación (Nunclon Delta Surface, Nunc, Roskilde, Dinamarca), uno para cada cepa microbiana. El área se delimitó en dos puntos en el borde de los pocillos separados por 4 mm y se recubrió con aproximadamente 30

5  $\mu$ l de cada adhesivo utilizando una punta de pipeta estéril y un microcepillo. A continuación, los adhesivos se curaron con luz durante 20 segundos y, más tarde, se colocó cuidadosamente una suspensión bacteriana de 10  $\mu$ l en la superficie de cada adhesivo. Las suspensiones bacterianas colocadas en la pared de los pocillos no recubiertos se utilizaron como control.

10 Después de la incubación en el 100 % de humedad a 37°C durante 60 min, se añadieron a cada pocillo 200  $\mu$ l de BHI. A partir de ahí, se mezclaron suavemente con una pipeta durante 1 minuto 100  $\mu$ l de la suspensión bacteriana de cada pocillo, se colocaron en tubos Eppendorf y se rellenaron los pocillos de cada placa de microtitulación con 100  $\mu$ l de BHI para incubar la suspensión microbiana con los adhesivos durante un período de 7 días.

15 Se determinó la viabilidad bacteriana, después de 1 h y 7 días, mediante el ensayo de trifosfato de adenosina (ATP) (BacTiter-Glo™, Promega, Madison, WI, Estados Unidos). Para el ensayo de ATP, se añadieron 100  $\mu$ l de suspensión bacteriana a 100  $\mu$ l de reactivo BacTiter-Glo en una placa de 96 pocillos de paredes opacas (Greiner, Monroe, NC, EE.UU.) y a continuación se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. La luminiscencia producida se midió con un luminómetro (GloMax™, Promega) y se expresó como el porcentaje de reducción de las unidades relativas de luz (RLUs) en cada grupo con respecto al control utilizando la siguiente fórmula:  $(1 - [pruebaRLUs/controlRLUsmedia]) \times 100$  (Solana *et al.*, 2017).

### **Análisis estadístico**

25 La estadística descriptiva de los valores obtenidos en las diferentes pruebas se realizó utilizando la media como medida de tendencia central y la desviación típica como medida de dispersión. En cuanto a los datos de microdureza, se consideró como unidad estadística la media de los valores de cada espécimen.

30 Los datos obtenidos en las pruebas de UTS, FS, E, VHN, DC y  $\mu$ tbs se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA de una vía para detectar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. Previamente, la distribución normal de cada variable fue confirmada con el test de Shapiro-Wilk. Las comparaciones post-hoc se analizaron utilizando la prueba de Tukey.

35

Antes del análisis estadístico, los datos del porcentaje de reducción de las RLUs

en todos los grupos se sometieron a la transformación de Anscombe. Los datos después de 1 h de contacto para *S. mutans*, *S. gordonii* y *L. casei* determinados por Shapiro-Wilk no eran gaussianos y se realizó una comparación general mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Los datos de los 7 días siguieron una distribución de Gauss y hubo  
5 diferencias significativas de varianzas entre los grupos mediante la prueba de Levene. La comparación general se determinó mediante ANOVA y la prueba post-hoc de Games-Howell.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un alfa preestablecido de 0,05  
10 utilizando el paquete IBM SPSS Statistics 27 (IBM Corporation, Armonk, Nueva York, EE.UU.).

## Resultados y análisis

### Síntesis y caracterización de N-oleoil-L-arginina (Arg-C<sub>18</sub>)

15 Un derivado lipídico de la arginina, N-oleoil-L-arginina (Arg-C<sub>18</sub>), se sintetizó por primera vez para que actuara como agente director de la estructura con actividad farmacológica (DSDA), es decir, una plantilla con actividad farmacológica para estimular la formación de MSNs. Con este propósito, el DSDA debe tener un carácter anfipático, un grupo de cabeza hidrófila y una cola hidrófoba, para abordar la formación de micelas en el agua.  
20 La L-arginina tiene varios grupos funcionales polares que pueden constituir el grupo de cabeza polar, para poder actuar como DSDA, ha de añadirse una cadena lipídica a la estructura.

Para sintetizar el DSDA, la L-arginina reaccionó con cloruro de oleoil para insertar una  
25 larga cadena alifática en la molécula. Por tanto, N-oleoil-L-arginina (Arg-C<sub>18</sub>) con carácter anfífilico, grupo de cabeza polar y cadena lipídica, se obtuvo satisfactoriamente y se confirmó indudablemente utilizando <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C RMN. El compuesto también se caracterizó utilizando HPLC-MS y espectroscopía FTIR. El espectro de masas mostró la masa correcta de N-oleoil-L-arginina (Arg-C<sub>18</sub>) y el espectro FTIR reveló picos que  
30 sugerían la formación satisfactoria del producto.

El tensioactivo sintetizado tiene un grupo ácido carboxílico y un grupo guanidinio (Figura 2). A un pH fisiológico, el ácido estaría cargado negativamente (pKa = 3,70) y el guanidinio positivamente (pKa = 12,14), por lo que la molécula estaría en un estado  
35 zwitteriónico con una carga neta nula. En cambio, la L-arginina estaría cargada positivamente a un pH fisiológico debido al grupo amino extra que ha sido sustituido en

N-oleoil-L-arginina. Con el fin de evaluar la correcta formación del producto, se realizaron mediciones del potencial Z. Se obtuvo un valor de 1,40 mV, muy cercano a cero, lo que confirma que el tensioactivo DSDA se encuentra en forma zwitteriónica.

## 5 **Síntesis y caracterización de nanopartículas de sílice mesoporosa con DSDAs de arginina (Arg-C<sub>18</sub> en MSNs).**

Tras la síntesis y caracterización del tensioactivo que contiene L-arginina (DSDA de Arg-C<sub>18</sub>), se prepararon las nanopartículas de MSNs por autoensamblaje con el DSDA. El carácter anfífilo de la molécula de DSDA le permite formar micelas en contacto con el agua. Estas micelas actúan como la plantilla alrededor de la cual la fuente de sílice, tetraetilortosilicato (TEOS), se polimeriza mediante autoensamblaje supramolecular para crear la estructura de las nanopartículas de sílice mesoporosa. Para neutralizar el DSDA de Arg-C<sub>18</sub>, que está en su forma aniónica, (3-aminopropil)trietoxisilano (APTES) se ha utilizado como co-agente director de la coestructura (CSDA).

15

La morfología y el tamaño de las MSNs sintetizadas con DSDA de Arg-C<sub>18</sub> se investigaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y transición. El análisis por TEM muestra nanopartículas con morfología esférica de envoltura hueca con tamaños que varían entre 100 nm y 240 nm (Figura 4A). Las mediciones de DLS de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs confirmaron un diámetro promedio de nanopartícula de 170 nm, y un potencial zeta de 1,5 mV en solución salina tamponada con fosfato.

20

Las propiedades texturales de las nanopartículas se investigaron utilizando los experimentos de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> del material calcinado (Figura 4B). La isoterma de N<sub>2</sub> presentó un valor de área superficial BET de 318 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> y un volumen total de poro de 0,42 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>. La distribución de tamaño de poro mostró un máximo en un intervalo entre 2,2 y 5,1 nm, lo que reveló una morfología de materiales mesoestructurados. El gran ciclo de histéresis y la amplia distribución de tamaño de poro sugieren la adsorción de moléculas de N<sub>2</sub> en los vacíos intrapartícula que se corresponde con el hueco interno de estas partículas (Martínez-Erro *et al.* Inter J Mol Sci 2021, 22, 7968). El patrón de difracción de rayos X de bajo ángulo del material calcinado mostró un pico de XRD a 1,6 (2 $\theta$ ), lo que sugiere una distribución ordenada de los poros en la nanoestructura de las MSNs (Figura 4C). La Figura 4D muestra el análisis termogravimétrico de las nanopartículas de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs antes y después de su calcinación. El TGA mostró una pérdida de peso del 44 % para los componentes orgánicos (DSDA y APTES), calculado restando el valor en peso de ambas muestras a

30

35

800 °C.

El material también se caracterizó mediante espectroscopia FTIR. El espectro mostró una banda fuerte e intensa característica a  $1037\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a la absorción de Si-O-Si. Este hecho indica que la reacción de condensación entre los grupos siloxano de APTES y TEOS ha tenido lugar satisfactoriamente. Es más, también se puede observar en el espectro la presencia de las bandas correspondientes al DSDA, confirmando de nuevo la incorporación satisfactoria en las MSNs.

#### 10 **Propiedades físico-mecánicas de los adhesivos dentales experimentales**

A continuación, se incorporaron diferentes cantidades de 0,5, 1 y 2 % en peso de Arg-C<sub>18</sub> en MSN a los adhesivos dentales experimentales y se evaluaron sus propiedades físico-mecánicas. De acuerdo con los resultados obtenidos, la incorporación de Arg-C<sub>18</sub> en MSN a diferentes concentraciones en un adhesivo genérico no tuvo ningún efecto perjudicial sobre las propiedades físicas y mecánicas (Tabla 1). Esto es de suma relevancia, ya que el desarrollo de propiedades antibacterianas suscita preocupación porque puede comprometer las propiedades físico-mecánicas de los adhesivos dentales experimentales, la capacidad de adhesión, o su biocompatibilidad debido a la lixiviación de los ingredientes o partículas (Geraldini *et al. J. Dent* 2017; 63: 72-80).

20 En general, los valores obtenidos para UTS, FS, E, VHN y DC con estos adhesivos dentales experimentales cargados con Arg-C<sub>18</sub> en MSNs fueron superiores o estuvieron en el intervalo de los determinados para los dos adhesivos comerciales analizados sin relleno. Por lo tanto, los adhesivos experimentales que contienen Arg-C<sub>18</sub> en MSNs pueden ser capaces de soportar las tensiones interfaciales debido a la contracción por polimerización del propio adhesivo y del composite de resina, y, asimismo, las complejas fuerzas masticatorias.

30 En el presente estudio, los adhesivos comerciales, SB1XT y SBU, se utilizaron como control y referencia de acuerdo con investigaciones anteriores (Moussa *et al., Clin Oral Invest* 2021; 25: 2877-2889). SB1XT es un adhesivo de grabado y lavado de dos etapas que ha demostrado un buen rendimiento en estudios clínicos. SBUP es la versión modificada del adhesivo Scotchbond Universal, que fue el primer adhesivo universal lanzado al mercado y el más probado. Es más, las Arg-C<sub>18</sub> en MSN se añadieron a un adhesivo genérico en lugar de a uno comercial, con el fin de tener información y control de todos los ingredientes incluidos, ya que la composición completa no es revelada por

los fabricantes y puede afectar a los resultados.

A pesar de los valores físico-mecánicos adecuados determinados para el adhesivo analizado, los resultados de UTS, FS, E, UTS,VHN y DC no fueron similares y se  
5 detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p < 0,001$ ). La UTS es la tensión máxima a la que el adhesivo sufre un fallo cohesivo. En el presente estudio, los valores más altos de UTS fueron producidos por SBUP sin diferencias estadísticas con los del material adhesivo al 2 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs en DAdh. El adhesivo dental experimental sin relleno y la versión del 0,5 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSN en Dadh arrojaron  
10 valores intermedios y similares sin diferencias con el adhesivo al 1 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSN 2DAdh. Los valores más bajos de resistencia máxima a la tracción se obtuvieron para SB1XT.

En cuanto a los resultados de FS, el adhesivo experimental sin relleno arrojó valores  
15 significativamente más altos que el resto de los adhesivos analizados, seguido de los adhesivos al 0,5 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSN y al 1 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSN, y significativamente más altos que los obtenidos para el adhesivo al 2 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSN. Los mayores valores de FS determinados para el adhesivo experimental sin relleno pueden explicarse por su composición homogénea, ya que contiene principalmente monómeros de  
20 metacrilato. Los valores más bajos los registró el adhesivo comercial SBUP, sin diferencias estadísticas con SB1XT. Esta tendencia también se observó en los resultados de E, ya que todos los adhesivos experimentales, sin relleno o cargados con nanopartículas de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs, arrojaron valores similares y significativamente superiores a los de los adhesivos comerciales SB1XT y SBUP.

25

Por lo tanto, el aumento de la cantidad de Arg-C<sub>18</sub> en MSN en el adhesivo genérico no afectó a los resultados de UTS ni del módulo E. Se considera que la incorporación de nanopartículas mejora las propiedades mecánicas de los adhesivos dentales, como aumentar su viscosidad, evitar la formación de capas adhesivas finas y conferir  
30 radiopacidad. Por consiguiente, ambos adhesivos comerciales incluyen nanocargas de sílice tratadas con silano en diferentes concentraciones, específicamente, 10-20 % para SB1XT y 5-15 % para SBUP. No obstante, los adhesivos dentales, a diferencia de los composites de resina, no pueden tener un relleno elevado para mantener su humectabilidad. Es más, la adición de carga no parece ser el principal factor que influye  
35 en algunas propiedades mecánicas y la concentración óptima de estas partículas es difícil de establecer ya que las nanopartículas tienden a aglomerarse creando puntos

débiles que disminuyen la resistencia a la flexión (Azad *et al. Dent Mater* 2018; 34: 1263-1270.). De acuerdo con estos resultados, se detectó en nuestros resultados una tendencia a disminuir los valores de FS a medida que aumentaba la cantidad de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs.

5

Los valores de dureza más altos fueron registrados por el adhesivo experimental sin relleno y el que tenía un 2 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs. Los otros dos adhesivos experimentales con 0,5 % y 1 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs obtuvieron una dureza intermedia y similar. Ambos adhesivos comerciales mostraron una dureza significativamente menor, siendo SB1XT el más blando. Por consiguiente, los resultados del grado de conversión (DC) revelaron que los cuatro adhesivos experimentales mostraron porcentajes similares de grado de conversión, siendo los de la versión de 0,5 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs estadísticamente superiores a los registrados para ambos adhesivos comerciales. Los valores más bajos se obtuvieron de nuevo para el adhesivo comercial SB1XT.

10  
15

El grado de conversión de los adhesivos tras la fotopolimerización se determinó por FTIR, y también, indirectamente, mediante ensayos de microdureza. Los resultados obtenidos con ambas metodologías fueron similares, y no se vieron afectados negativamente por la inclusión de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs, independientemente de su concentración. Se considera que el grado de conversión predice las propiedades mecánicas del adhesivo e influye en su capacidad de adhesión. De acuerdo con nuestros resultados, los adhesivos experimentales alcanzaron un grado de curado que variaba de 35 a 40 %. Es más, el grado de conversión de nuestros adhesivos experimentales en las versiones sin relleno o cargadas con Arg-C<sub>18</sub> en MSNs fue significativamente mayor que el de los adhesivos comerciales, especialmente SB1XT. Ambos, SB1XT y SBU, contienen agua (SB1XT <5 % en peso y SBUP 10-15 % en peso) y etanol (SB1XT 25-35 % en peso y SBUP 10-15 % en peso) a diferencia de los adhesivos experimentales no solvatados. Ambos componentes actúan como disolventes que mejoran la miscibilidad de los componentes del adhesivo, mejoran la difusión de la resina dentro del sustrato dental y, específicamente, el agua permite la ionización de los monómeros ácidos incluidos en SBUP. Sin embargo, deben ser correctamente evaporados durante la aplicación clínica, ya que su presencia puede limitar el grado de curado de los adhesivos. En nuestro estudio, en los especímenes preparados para VHN y DC, los adhesivos se utilizaron en bloque y no en capas finas como se utilizan en una situación clínica. Por lo tanto, el agua y el etanol pueden haber

20  
25  
30  
35

quedado atrapados en el polímero con un impacto negativo en su grado de conversión (Dressano *et al. J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2020;110:103875)

5 **Tabla 1.** Valores medios (desviación típica) de las propiedades mecánicas y físicas de los adhesivos analizados

	<b>UTS (MPa)</b>	<b>FS (MPa)</b>	<b>E (MPa)</b>	<b>VHN</b>	<b>DC (%)</b>
<b>Adhesivos</b>	<i>Media (DT)</i>				
<b>SB1XT</b>	12,89 (2,94) d	37,61 (15,16) de	0,483 (0,14) b	2,40 (0,55) d	26,40 (3,43) c
<b>SBUP</b>	61,99 (1,78) a	25,54 (5,81) e	0,581 (0,11) b	6,31 (0,68) c	33,00 (6,89) bc
<b>Sin relleno</b>	47,90 (13,64) bc	178,5 (33,28) a	1,640 (0,29) a	11,68 (0,72) a	37,20 (4,09) ab
<b>0,5 % de Ag-C<sub>18</sub> en MSNs</b>	40,39 (7,61) bc	109,17 (31,38) b	1,839 (0,19) a	9,84 (0,38) b	40,40 (1,14) a
<b>1 % de Ag-C<sub>18</sub> en MSNs</b>	39,98 (13,73) c	82,15 (25,25) bc	1,707 (0,17) a	9,09 (1,44) b	36,92 (1,98) ab
<b>2 % de Ag-C<sub>18</sub> en MSNs</b>	51,81 (4,95) ab	62,02 (16,29) cd	1,766 (0,13) a	11,44 (0,19) a	35,84 (1,06) ab

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre los adhesivos analizados ( $p < 0,05$ ).

#### 10 **Prueba de resistencia adhesiva a la microtracción**

Los valores medios y la desviación típica de la  $\mu$ tbs a la dentina de los adhesivos analizados se muestran en la Tabla 2. Los datos se analizaron sin tener en cuenta los fallos pre-test. Los valores más altos se determinaron cuando el composite de resina se adhirió con ambos adhesivos comerciales, SB1XT y SBUP. SBUP, un adhesivo universal, puede ser utilizado en modo grabado y lavado, autograbado o autograbado con grabado selectivo del esmalte. En el presente estudio, se utilizó después de grabar la dentina con ácido fosfórico, así como los adhesivos experimentales, con el fin de

15

estandarizar la estrategia adhesiva, en función de la eliminación completa de la capa de barrillo dentinario.

5 Se produjeron valores inferiores y similares con los adhesivos experimentales sin Arg-C<sub>18</sub> en MSN o en una concentración de 0,5 % y 1 %. Los resultados más bajos se determinaron para el adhesivo experimental con 2 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs, sin diferencias estadísticas con la versión sin relleno del adhesivo experimental y la que tiene un 1 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs.

10 **Tabla 2.** Valores medios del ensayo de resistencia adhesiva a la microtracción con los adhesivos experimentales.

	<b>µtbs (MPa)*</b>	<b>Fallos pre-test (%)</b>	<b>N</b>
Adhesivos			
<b>SB1XT</b>	35,9 (13,9) a	23	67
<b>SBUP</b>	36,4 (18,7) a	31	60
<b>Sin relleno</b>	20,0 (9,3) bc	37	61
<b>0,5 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs</b>	22,6 (9,6) b	32	64
<b>1 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs</b>	20,9 (10,3) bc	59	39
<b>2 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs</b>	15,3 (7,5) c	52	43

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre los adhesivos analizados (p<0,05).

15

Por lo tanto, la incorporación de este prebiótico en las MSN cargadas permitió alcanzar valores adecuados de fuerza de adhesión en contraste con los resultados informados por Geraldeli *et al.* (*J. Dent.* 2017; 63: 72-80), quienes incluyeron arginina libre al 5, 7 y 10 % en un adhesivo genérico de grabado y lavado obteniendo bajos valores de resistencia a la microtracción. Aunque se considera que las nanocargas aumentan las propiedades mecánicas de la capa adhesiva, ayudando a distribuir las tensiones debido a la contracción por polimerización del adhesivo y del composite de resina, este efecto positivo no se observó en nuestro estudio. Por el contrario, se observó un efecto perjudicial en la resistencia adhesiva a la microtracción cuando se aumentó la cantidad

20

de las partículas hasta un 2 % en peso, como se observó en los resultados de FS. Las nanopartículas a altas concentraciones pueden aglomerarse, dificultando la difusión en la dentina grabada y en los túbulos dentinarios. Hay autores que han atribuido las limitadas propiedades adhesivas de los adhesivos experimentales con nanocargas a una reducción en el grado de curado que afecta a sus propiedades mecánicas. Sin embargo, en el presente estudio, esta relación no se observó, ya que los valores de DC y VHN fueron mayores para los adhesivos experimentales rellenos que los determinados para los adhesivos comerciales, que dieron los valores más altos de resistencia adhesiva. La resistencia adhesiva a la microtracción de los adhesivos parece estar más relacionada con los valores de E que con otras propiedades mecánicas y, por consiguiente, los adhesivos experimentales mostraron un comportamiento distinto y más frágil que SB1XT y SBUP.

#### **Estudios de liberación de L-arginina**

La liberación del DSDA de L-arginina de Arg-C<sub>18</sub> en MSN se investigó sumergiendo el material en agua de mili-Q a 37 °C y calculando la concentración en la solución a diferentes tiempos. Los mg de DSDA liberado por gramo de MSN se representaron en gráficas frente al tiempo para construir el perfil de la liberación (Figura 5). El material mostró una liberación lenta y mantenida durante varios días hasta unos 210 mg de DSDA por gramo de MSNs. Después de 6 h, el material liberó 110 mg de DSDA, que corresponde a alrededor del 25 % de la liberación máxima teórica del material. En 2 días, la cantidad aumentó a 180 mg de DSDA y alrededor del 40 % de la liberación acumulada. El DSDA siguió liberándose después de 7 días, aunque en una tasa muy baja cuando la liberación se mantuvo en torno al 44 % de la liberación máxima teórica. Se puede concluir que las nanopartículas permiten una liberación lenta y constante del DSDA. El fármaco puede avanzar desde el interior de la nanopartícula hasta el medio y la liberación máxima se establece en torno a la mitad de la cantidad inicial de DSDA en las MSNs.

Posteriormente, después de incorporar diferentes cantidades de Arg-C<sub>18</sub> en MSN en los adhesivos dentales, se estudió la liberación del DSDA de Arg-C<sub>18</sub> de la matriz adhesiva. Las tres resinas diferentes con cantidades de 0,5 % en peso, 1 % en peso y 2 % en peso de Arg-C<sub>18</sub> en MSN se suspendieron en agua de mili-Q a 37 °C. Se tomaron alícuotas a los 1, 2, 4 y 7 días para calcular la cantidad de DSDA liberado de las resinas y se determinó mediante UHPLC/MSMS. La Figura 6 muestra que el adhesivo dental experimental con 0,5 % en peso de Arg-C<sub>18</sub> en MSN liberó 13 ppm al cabo de 1 día, 24

ppm a los 2 días y 33 y 63 ppm de DSDA a los 4 y 7 días, respectivamente. La cantidad de DSDA liberado aumentó en consecuencia a medida que se analizaron los adhesivos de 1 y 2 % en peso en los experimentos de liberación. El adhesivo dental al 1 % en peso experimentó una liberación de 24 ppm de DSDA al cabo de 1 día y de 60 ppm y 105 ppm a los 4 y 7 días, respectivamente. El adhesivo al 2 % en peso liberó concentraciones de 57, 249 y 229 ppm de DSDA al cabo de 1, 4 y 7 días, respectivamente. Estos resultados indican la capacidad de DSDA de Arg-C<sub>18</sub> de dispersarse desde el interior de la nanopartícula a la resina y finalmente desde allí al medio acuoso. Por lo tanto, la matriz adhesiva polimérica no solo permite la liberación de DSDA de Arg-C<sub>18</sub>, sino que también ralentiza significativamente su administración, lo que alarga significativamente la actividad antibacteriana proporcionada por la arginina con el tiempo.

#### **Actividad antibacteriana**

Los resultados del porcentaje de reducción de URLs se muestran en las Tablas 3 y 4 para cada cepa bacteriana. A 1 h no hubo diferencias estadísticas entre los grupos. Después de 7 días, el mayor porcentaje de reducción de URLs se obtuvo para una cantidad de 2 % en peso de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs en el adhesivo dental. La tendencia en todos los casos fue de aumento de la actividad antimicrobiana con el aumento de la concentración de nanopartículas, aunque cabe señalar que no hubo diferencias significativas entre los grupos para *S. gordonii*, ni para los adhesivos dentales sin relleno, ni para el 0,5 % en peso de Arg-C<sub>18</sub> en MSN para *S. mutans*, mientras que hubo diferencias estadísticas significativas para todos los grupos con Arg-C<sub>18</sub> en MSNs en comparación con la versión sin relleno para *L. casei*.

En el presente estudio, la L-arginina se incorporó a las MSNs dando lugar a las nanopartículas de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs y, a su vez, estos sistemas de administración de fármacos se incorporaron en diferentes concentraciones, por primera vez, hasta donde se sabe, en un adhesivo dental experimental. Este sistema de Arg en MSN en Dadh proporciona una actividad antibacteriana adecuada y sostenida con el tiempo, actuando como modificador de biopelículas, ya que solo se suprimieron las bacterias cariogénicas. Este efecto no fue evidente de forma inmediata, sin embargo, se observó una reducción significativa del porcentaje de RLUs para *S. mutans* y *L. casei* después de 7 días. La actividad antibacteriana frente *L. casei* se observó incluso con la concentración más baja de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs. No obstante, en el caso de *S. mutans*, se requirió una cantidad de 1 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs para obtener una reducción significativa del porcentaje de

RLUs. Es más, no se detectó un efecto antibacteriano significativamente mayor cuando la concentración de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs aumentó al 2 % en peso. A pesar de ello, el porcentaje de RLUs de *S. gordonii*, los microorganismos bucales responsables del efecto de incremento del pH de la biopelícula bucal, no se vio afectado por la inclusión de Arg-C<sub>18</sub> en MSN en los adhesivos experimentales.

La inclusión de un aminoácido natural, como L-arginina, en lugar de agentes antibacterianos, limita la posibilidad de resistencia antimicrobiana en los patógenos al tiempo que promueve el crecimiento de bacterias beneficiosas que pueden mantener o restaurar la homeostasis en las biopelículas adyacentes a las restauraciones de composite de resina. Esto inhibiría o limitaría la progresión de las lesiones de caries secundarias.

El adhesivo dental sin relleno también mostró un potencial antibacteriano, aunque más limitado que en el caso del sistema de Arg-C<sub>18</sub> en MSN en DAdh, lo que podría atribuirse a la actividad antibacteriana de los componentes no polimerizados del adhesivo, que son tóxicos para las bacterias.

Tabla 3. Media y (desviación típica) del porcentaje de reducción de RLUs con el ensayo de ATP tras 1 h de contacto de los adhesivos con las bacterias.

Media (DT). n=16/grupo.

Adhesivos	% de reducción de RLUs		
	<i>Streptococcus mutans</i> **	<i>Streptococcus gordonii</i> **	<i>Lactobacillus casei</i> **
<b>Sin relleno</b>	19,30 (29,10)	17,80 (27,81)	8,74 (13,36)
<b>0,5 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs</b>	22,36 (32,97)	13,82 (25,13)	6,65 (10,96)
<b>1 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs</b>	14,30 (26,59)	17,10 (26,10)	12,77 (12,39)
<b>2 % de Arg-C<sub>18</sub> en MSNs</b>	16,50 (24,46)	15,36 (21,40)	11,41 (17,78)
0,9 % de SS <sup>#</sup>	-	-	-

\*Valores de control de RLUs: media (desviación típica): *S. mutans* 2167(426); *S. gordonii* 2426 (603); *L. casei*:2022 (234).

\*\*Comparación general entre grupos determinada por Kruskal-Wallis: *S. mutans* ( $P = 0,603$ ); *S. gordonii* ( $P = 0,326$ ); *L. casei* ( $P = 0,438$ )

SS: solución salina. RLUs: unidades relativas de luz.

Tabla 4. Media y (desviación típica) del porcentaje de reducción de RLUs con el ensayo de ATP tras 7 días de contacto de los adhesivos con las bacterias.

Media (DT). n=16/grupo.

Adhesivos	% de reducción de RLUs		
	<i>Streptococcus mutans</i> **	<i>Streptococcus gordonii</i> **	<i>Lactobacillus casei</i> **
Sin relleno	32,56 (18,59) <sup>a</sup>	34,47 (27,16) <sup>a</sup>	23,58 (24,02) <sup>a</sup>
0,5 % de Arg-C <sub>18</sub> en MSNs	40,98 (17,53) <sup>a</sup>	34,66 (26,30) <sup>a</sup>	42,36 (21,76) <sup>b</sup>
1 % de Arg-C <sub>18</sub> en MSNs	56,52 (11,11) <sup>b</sup>	44,85 (24,65) <sup>a</sup>	55,32 (20,98) <sup>b</sup>
2 % de Arg-C <sub>18</sub> en MSNs	58,59 (8,83) <sup>b</sup>	50,66 (31,16) <sup>a</sup>	56,73 (25,10) <sup>b</sup>
0,9 % de SS <sup>#</sup>	-	-	-

\*Valores de control de RLUs: media (desviación típica): *S. mutans* 5524(1886); *S. gordonii* 5246 (303); *L. casei*: 6131(1648).

\*\*Comparación general entre grupos determinada por la prueba ANOVA ( $P < 0,001$ ) con la corrección de Welch. La misma letra en superíndice leída verticalmente indica diferencias que no fueron estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Games-Howell.

SS: solución salina. RLUs: unidades relativas de luz.

<sup>a,b</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre los adhesivos analizados ( $p < 0,05$ ).

**REIVINDICACIONES**

1. Nanopartículas de sílice mesoporosa caracterizadas por que comprenden N-oleoil-L-arginina dispuesta dentro de los poros de dichas nanopartículas.  
5
2. Nanopartículas de sílice mesoporosa, de acuerdo con la reivindicación 1, que tienen un diámetro entre 100 y 300 nm.
3. Nanopartículas de sílice mesoporosa, de acuerdo con la reivindicación 1 o 2,  
10 donde los mesoporos tienen un diámetro entre 2 y 10 nm.
4. Nanopartículas de sílice mesoporosa, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichas nanopartículas comprenden entre un 20 y un 50 % en peso de N-oleoil-L-arginina.  
15
5. Procedimiento de obtención de las nanopartículas de sílice mesoporosa descritas en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:  
a) reacción de L-arginina y cloruro de oleoil en una solución de H<sub>2</sub>O y acetona para  
20 formar N-oleoil-L-arginina a pH básico,  
b) dispersión de la N-oleoil-L-arginina en agua en presencia de (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES) mediante agitación a una temperatura entre 60 y 90 °C durante 12-24 h,  
c) adición de tetraetilortosilicato (TEOS), como fuente de sílice, a la dispersión formada  
25 en la etapa b), manteniendo la mezcla formada a un pH básico, a una temperatura entre 60 y 100 °C y durante un tiempo entre 1 y 3 días, obteniendo así nanopartículas de sílice mesoporosa.
6. Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 5, donde la reacción en la etapa  
30 a) se lleva a cabo a un pH entre 10 y 11.
7. Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, donde la reacción en la etapa a) se lleva a cabo durante un tiempo entre 1 y 2 h.
- 35 8. Procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde los mmol de APTES utilizados en la etapa b) son entre 1,1 y 1,5 veces superiores a los

de la N-oleil-L-arginina.

9. Procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde la reacción en la etapa c) se lleva a cabo a un pH 9,5.

5

10. Procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, donde los mmol de TEOS utilizados en la etapa c) son entre 10 y 12 veces superiores a los de la N-oleil-arginina.

10 11. Composición que comprende las nanopartículas descritas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

12. Composición, de acuerdo con la reivindicación 11, donde la composición es un adhesivo dental.

15

13. Composición, de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, donde las nanopartículas están en una concentración entre 0,1 y 2 % en peso en la composición.

20 14. Nanopartículas de sílice mesoporosa, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 13, para su uso como medicamento o adhesivo dental.

25 15. Nanopartículas de sílice mesoporosa, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 13, para su uso en la prevención de la caries secundaria.



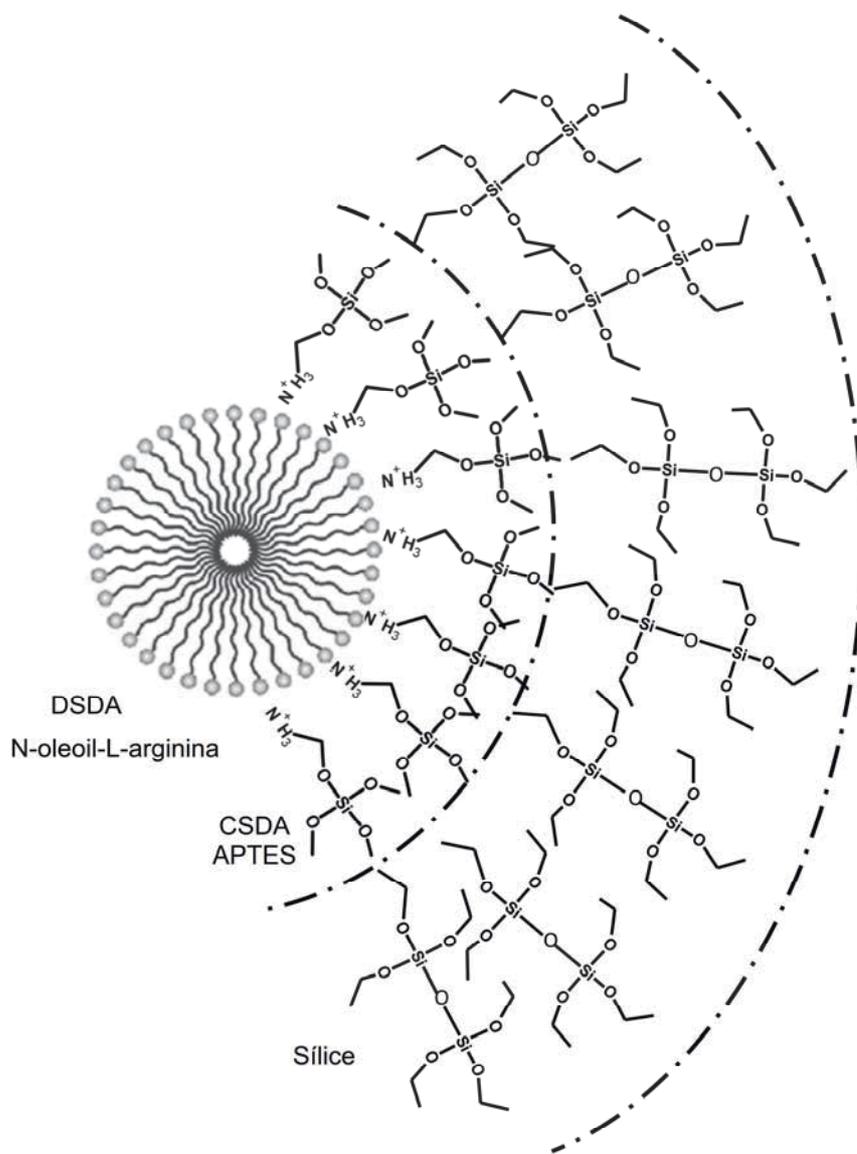


FIG. 3

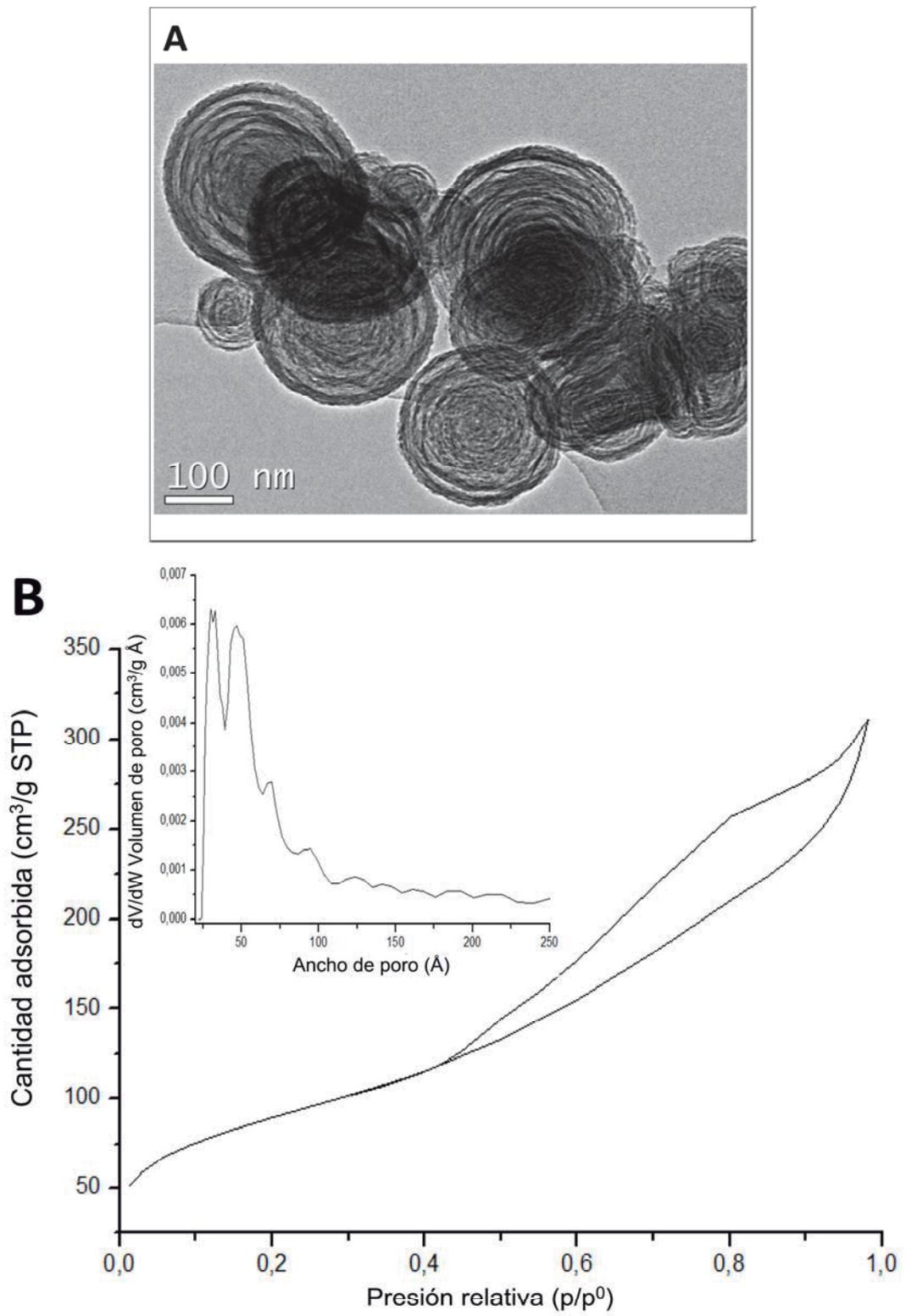


Fig. 4

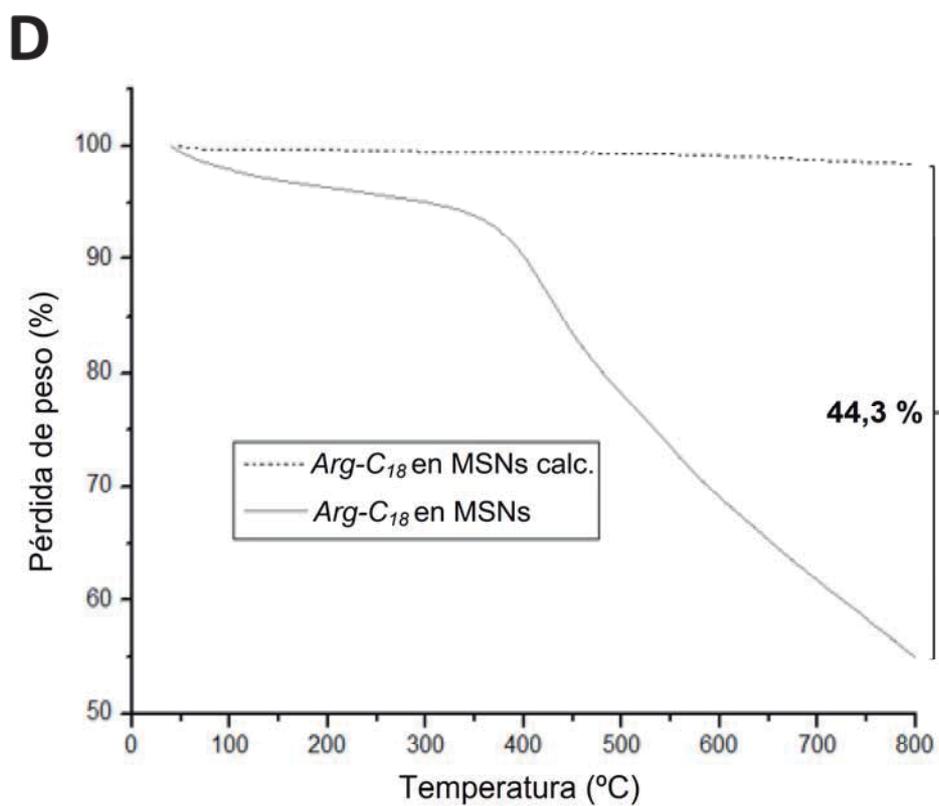
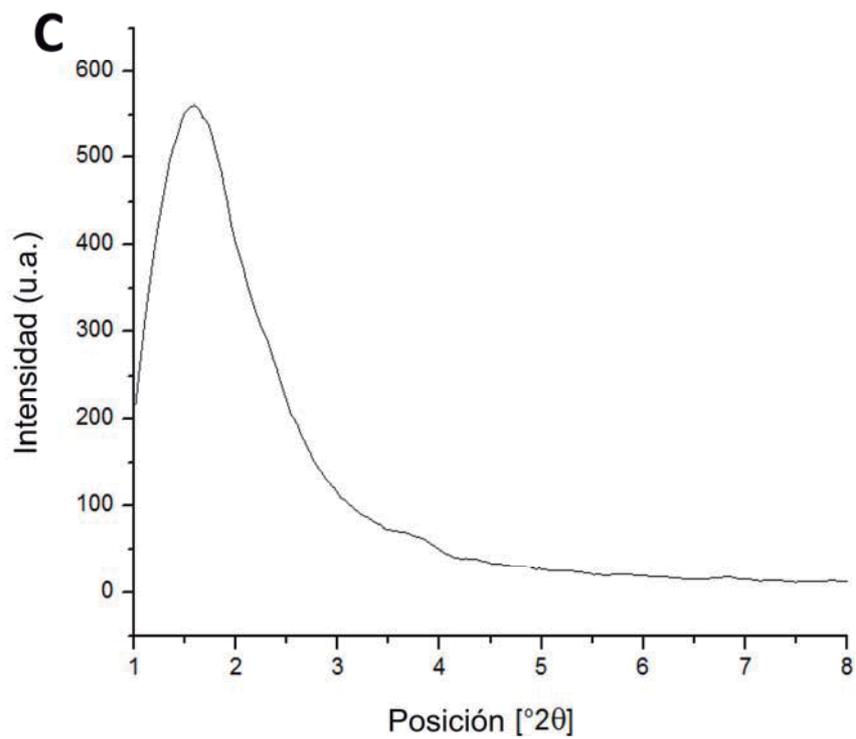


Fig. 4 cont.

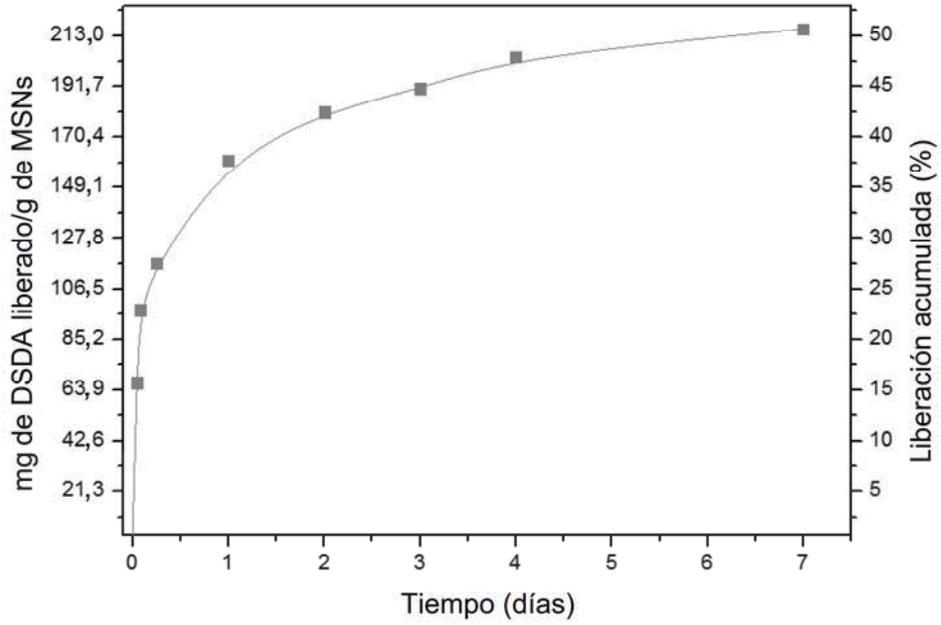


Fig. 5

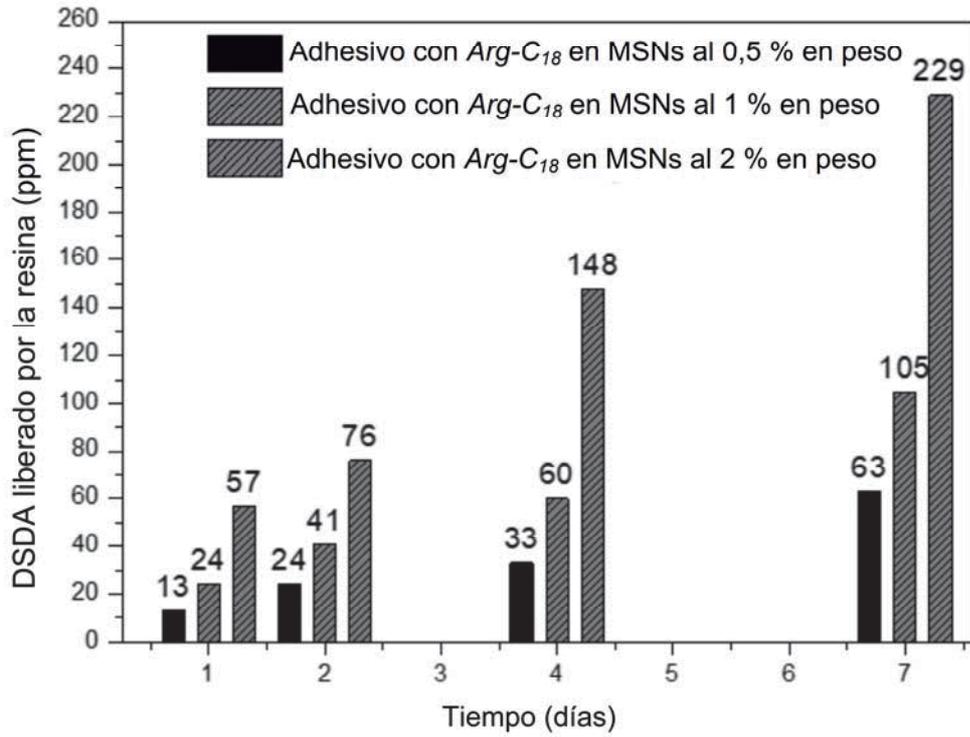


Fig. 6



- ②① N.º solicitud: 202230570  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.06.2022  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	YAN, H. et al. Effects of Chlorhexidine-Encapsulated Mesoporous Silica Nanoparticles on the Antibiofilm and Mechanical Properties of Glassionomer Cement. <i>Molecules</i> , 2017, Vol. 22, Páginas 1-14 [en línea] [recuperado el 17/01/2023]. Recuperado de Internet <URL: <a href="http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28753997/">http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28753997/</a> >, <DOI: 103390/molecules22071225>. <strong>Apartados 1, 2.2 y 4. </strong>	1-15
A	GERARDELI, S. et al. A new arginine-based dental adhesive system: formulation, mechanical and anticaries properties. <i>J. Dent.</i> 2017, Vol. 63, Páginas 72-80 [en línea] [recuperado el 17/01/2022]. Recuperado de Internet <URL: <a href="http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28587978/">http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28587978/</a> >, <DOI: 10.1016/j.dent.2017.05.024>. Resumen, apartado 5	1-15
A	XUE, Y. et al. Effect of toothpaste containin arginine on dental plaque. A randomiced controlled in situ study.. <i>J. Dent.</i> 2017, Vol. 67, Páginas 88-93 [en línea] [recuperado el 17/01/2023]. Recuperado de Internet <URL: <a href="http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28987625/">http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28987625/</a> >, <DOI: 10.1016/j.dent.2017.10.001>. Resumen.	1-15
A	MORALES, M. et al. Microporous and Mesoporous Materials, 2018, Vol. 264, Páginas 43-54 [en línea] [recuperado el 17/01/2023]. Recuperado de Internet <URL: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387181118300052">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387181118300052</a> >, <DOI: 10.1016/j.micromeso.2018.01.005>. Resumen.	1-15

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
20.01.2023

Examinador  
J. López Nieto

Página  
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K9/51** (2006.01)

**A61K31/195** (2006.01)

**A61K47/02** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, INTERNET