

Evaluación de la citotoxicidad en la incorporación de nanopartículas de óxido de zinc en polimetilmetacrilato (PMMA) para base de dentaduras completas

Evaluation of cytotoxicity in the incorporation of zinc oxide nanoparticles in polymethylmethacrylate (PMMA) for complete denture bases

Fotografía tomada por el grupo de trabajo

MCO Elsa Elizabeth Riojas Méndez¹,
Dra Sandra Cecilia Esparza González¹,
Dra Rebeca Betancourt Galindo²
Dra. Aide Saenz Galindo³
Dr. Jorge Ortíz¹

¹Universidad Autónoma de Coahuila, Posgrado de prostodoncia avanzada,
Avenida Dra. Cuquita Cepeda de Dávila s/n. Col. Adolfo López Mateos C.P.
25125. Saltillo, Coahuila, México.

²Centro de Investigación en Química Aplicada. Enrique Reyna H. 140, San José de los
Cerritos, 25294 Saltillo, Coah.

³Facultad de Ciencias Químicas. Blvd. Venustiano Carranza 935, República, 25280
Saltillo, Coah.

Correspondencia para autor: Esparza González Sandra C
sandraesparzaqonzal@uadec.edu.mx

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue investigar en qué medida la incorporación de nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) en polimetilmetacrilato (PMMA) puede ser citotóxico para las células *in vitro* (NIH/3T3), además de evaluar si la modificación superficial para lograr una mejor dispersión de las nanopartículas cambia la citotoxicidad. El primer grupo sin modificación se presenta como PMMA con nanopartículas de óxido de zinc en las en concentraciones de 0.1, 0.3 y 0.5 %, el segundo grupo se realizó con modificación superficial del PMMA para conseguir un efecto de dispersión de las nanopartículas en la matriz polimérica, en concentraciones de 0.1, 0.3 y 0.5 % de nanopartículas de óxido de zinc. Se evaluó mediante ensayo *in vitro* de reducción de sales de tetrazolio (MTT). Los resultados arrojaron, tanto para la muestra sin modificación y de incorporación de 0.1 %m de NPs ZnO y los modificados con incorporación de 0.3 y 0.5 %m de NPs ZnO no mostraron ningún efecto citotóxico del óxido de zinc en comparación con el grupo de control (células sin tratamiento). Se observó efecto citotóxico en la concentración de nanopartículas al 0.5 %m de 64.02%, y para la concentración de 0.5%_m de 53.1%, las cuales fueron significativas en comparación con el grupo control. El grupo sin y con modificación a la concentración del 0.5 %_m redujeron significativamente la viabilidad celular en comparación con el grupo control ($p < 0.05$). Por lo tanto, de acuerdo con los resultados y la norma ISO 10993- 5:2009, se sugiere una seguridad en el uso de nanopartículas de ZnO como material aditivo para base de dentaduras postizas sin ejercer un efecto citotóxico sobre las células del huésped, principalmente las modificadas con concentraciones de NPs ZnO hasta de un 0.3%_m en la matriz de PMMA.

Palabras claves: PMMA; NPs ZnO; citotoxicidad

ABSTRACT

The objective of this work was to investigate to what extent the incorporation of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) in polymethylmethacrylate (PMMA) can be cytotoxic to cells in vitro (NIH/3T3), in addition to evaluating whether the surface modification to achieve better dispersion of the nanoparticles changes the cytotoxicity. The first group without modification is presented as PMMA with zinc oxide nanoparticles in concentrations of 0.1, 0.3 and 0.5%, the second group was made with PMMA surface modification to achieve a dispersion effect of the nanoparticles in the polymer matrix. , in concentrations of 0.1, 0.3 and 0.5 % of zinc oxide nanoparticles. It was evaluated by means of an in vitro assay for the reduction of tetrazolium salts (MTT). The results showed, both for the sample without modification and incorporation of 0.1 %m of ZnO NPs and those modified with incorporation of 0.3 and 0.5 %m of ZnO NPs did not show any cytotoxic effect of zinc oxide compared to the control group (cells without treatment). A cytotoxic effect was observed in the concentration of nanoparticles at 0.5%_m of 64.02%, and for the concentration of 0.5%_m of 53.1%, which were significant compared to the control group. The group without and with modification at the concentration of 0.5 %_m significantly reduced cell viability compared to the control group ($p < 0.05$). Therefore, according to the results and the ISO 10993-5:2009 standard, a safety in the use of ZnO nanoparticles as an additive material for denture base is suggested without exerting a cytotoxic effect on the host cells, mainly those modified with concentrations of ZnO NPs up to 0.3% m in the PMMA matrix.

Key words: PMMA; NPs ZnO; cytotoxicity

INTRODUCCIÓN

El edentulismo es una enfermedad que afecta a la mayoría de la población de la tercera edad, se define como la condición o estado oral sin ninguna pieza dental. Existen tratamientos para contrarrestar el problema, sin embargo es una condición irreversible (Cunha y Nadanovsky, 2007). Aunque la pérdida de dientes ha ido disminuyendo con el paso del tiempo, el edentulismo sigue siendo una enfermedad que no se ha podido erradicar por completo y de las más importantes en todo el mundo, especialmente entre los adultos mayores (Douglas y col., 2002). Aunado a esto, la pérdida dental afecta el habla, la masticación y llega a provocar una mala estética la cual tiende por afectar la calidad de vida de los pacientes (Stober y col., 2012; Emami y col., 2013).

Para poderles ofrecer una mejor calidad de vida, se les puede ofrecer a los pacientes la colocación de implantes para devolver funcionalidad y estética, sin embargo no todos los pacientes son candidatos o cuentan con la solvencia económica para poder recibir este tipo de tratamiento, por lo tanto se opta por tratamientos como prótesis totales o parciales (Mohammed, 2020; Allen y McMillan, 2003).

Este tipo de tratamientos son fabricados en base a resina acrílica de polimetilmetacrilato (PMMA), sin embargo, este material presenta algunos inconvenientes en cuanto a las propiedades de la superficie, como rugosidad de la superficie la cual puede ser colonizada por *Candida Albicans* (Gallegos y Bernal Cahuata, 2018). Además, al entrar en contacto con la mucosa bucal puede actuar como reservorio para la adherencia bacteriana. Se ha mencionado que los métodos de limpieza mecánicos son inadecuados para reducir por completo los microorganismos de la superficie de las dentaduras. Diferentes enfoques se han tomado para disminuir la adhesión de microorganismos al usar diferentes revestimientos, o incorporar aditivos antifúngicos en el PMMA de la base de la dentadura (Gallegos y Bernal Cahuata, 2018).

Los nanomateriales han sido utilizados ampliamente en el campo de la nanomedicina y las ciencias biomédicas debido a sus excelentes propiedades físicas y químicas (Gómez-Quintero y col., 2012). Entre las nanopartículas podemos encontrar los óxidos metálicos que son valiosos por sus características fisicoquímicas, además por su efecto antibacteriano (Mohammed, 2017). El óxido de zinc, un óxido metálico, se usa ampliamente en odontología como material de cementación restauradora, material de obturación del conducto radicular y restauración temporal. Este óxido metálico varía de tamaño de partícula, con tamaños que van desde micrómetros hasta nanómetros. Muchos de los estudios demostraron la eficacia de estas partículas inhibiendo el crecimiento de hongos y bacterias. La inhibición dependió del tamaño de partícula, la concentración y el tipo de microorganismos. Teniendo los mejores efectos antimicrobianos empleando partículas pequeñas menores a 150 nm de tamaño y altas concentraciones (1000 $\mu\text{g/mL}$) de ZnO (Kird y col., 2017). Las nanopartículas liberadas del biomaterial pueden penetrar en el tejido y ejercer el efecto terapéutico. Por lo tanto, para lograr efectos terapéuticos y preventivos, la concentración de ZnO liberado no puede ser menor que la concentración inhibitoria mínima (CMI) relativa a los patógenos, pero tampoco puede ser tan alta como para poder generar un efecto citotóxico en las células huésped, como se demostro empleando cultivos primarios de células humanas a partir de la mucosa nasal (Kumar y col., 2016; Kamonkhantikul y col., 2017; Hackenberg y col., 2011). Otro de los problemas de usar nanopartículas es la aglomeración por lo cual se utilizaron nanopartículas modificadas que previamente ya se han estudiado que mejoran la incorporación de éstas en una matriz de PMMA, sin embargo pueden incrementar la citotoxicidad de las nanopartículas (Ramasamy y col., 2014).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es el de determinar si la incorporación de nanopartículas de óxido de zinc modificadas al polimetilmetacrilato puede llegar a ser citotóxico en células NIH/3T3 (fibroblastos de ratón) *in vitro*.

Material y métodos

Para el presente estudio se utilizó PMMA termocurado, monómero ácido metilmetacrílico para termocuración de la casa comercial Nic - Tone color rosa. Siendo este el más utilizado para la elaboración de prótesis totales y parciales en el ámbito odontológico.

Se utilizaron nanopartículas de ZnO, las cuales fueron sintetizadas en CIQA (Centro de investigación en Química Aplicada), donde fueron caracterizadas para llevar a cabo esta investigación. Las empleadas fueron obtenidas de la ATCC con el código NIH/3T3 CRL-1658™ (células de fibroblastos de ratón).

Síntesis de las nanopartículas de ZnO

Se colocaron 1×10^{-3} moles de acetato de zinc dihidratado $(O_2CCH_3)_2(H_2O)_2$ disueltos en 225 mL de agua destilada. De forma separada se mezclaron 3×10^{-3} moles de trietanolamina $(C_6H_{15}NO_3)$ y 2×10^{-3} moles n-propilamina (C_3H_9N) con agitación en 1275 mL de etanol (C_2H_6O) , hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente ambas soluciones se mezclaron en un matraz de tres bocas soportado por unas pinzas y colocado en un baño de recirculación y agitación constante 450 rpm, se dejó que la temperatura de reacción alcanzara los $80^\circ C$, se mantuvo dicha temperatura por 6 horas contando estas últimas a partir de la primera gota precipitada. El producto obtenido se centrifugó durante 6 min a 5000 rpm y se lavó tres veces con etanol, para eliminar el exceso de reactivos que no terminaron de reaccionar al momento de llevarse a cabo la síntesis de nanopartículas. Posteriormente se dejó secar el precipitado durante 68 h a temperatura ambiente para después recuperar el producto sintetizado el cual tuvo un rendimiento del 88%.

Caracterización fisicoquímica de las NPs de ZnO

Difracción de Rayos X (XRD)

Para evaluar las propiedades de las nanopartículas de ZnO se realizó la caracterización química empleando un difractómetro Rigaku radiación $K\alpha Cu$ (25

mA, 35 kV) a temperatura ambiente en un intervalo de barrido de 10 a 80 grados en la escala 2θ . A una velocidad de 0.02 grados/s. Cada muestra fue colocada en un portamuestras de acero inoxidable con una capacidad de 0.3 g para su respectivo análisis.

Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión FEI-Titan 80–300 kV($C_s=1.25$ mm) operaterado a 300 kV para observar la morfología y evaluar el tamaño de las de las NZnO. Los polvos estudiados fueron evaluados dispersando un poco de la muestra en etanol, de la cual posteriormente se colocó una pequeña gota en una rejilla de cobre especial para realizar el análisis en el microscopio, dejando secar la gota y por último introducirla al microscopio para apreciar la estructura obtenida.

Espectroscopia de Infrarojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros de infrarrojo de las nanopartículas de ZnO se obtuvieron preparando pastillas de KBr-nanopartícula. Por medio de esta técnica se identificó la estructura química de las nanopartículas, así como la presencia de las especies absorbidas en su superficie. Espectrofotómetro Nicolet Magna 550, utilizando el método ATR en la región de 4000 a 500 cm^{-1} .

Preparación del PMMA

Se prepararon 35 discos de resina acrílica termopolimerizable (PMMA). De los cuales se hicieron 5 muestras para las diferentes concentraciones de nanopartículas, así como también para las modificaciones las cuales se realizaron para conseguir una mejor dispersión, estas también se dividieron de acuerdo a su concentración de nanopartículas.

Tabla I. Muestras empleadas en el estudio

Muestra	Cantidad de PMMA	Cantidad de Nanopartícula	Con o sin modificación
PMMA	7.5 mL (monómero) + 0.60mg (activador)	Ninguna	Ninguna
0.1%	7.5 mL (monómero) + 0.60mg (activador)	7.5 μ g	Ninguna
0.3%	7.5 mL (monómero) + 0.60mg (activador)	22.5 μ g	Ninguna
0.5%	7.5 mL (monómero) + 0.60mg (activador)	37.5 μ g	Ninguna
0.1%	7.5 mL (monómero) + 0.60mg (activador)	7.5 μ g	Presente
0.3%	7.5 mL (monómero) + 0.60mg (activador)	22.5 μ g	Presente
0.5%	7.5 mL (monómero) + 0.60mg (activador)	37.5 μ g	Presente

Después se llevaron a un sonificador para dispersar las nanopartículas mediante ultrasonido. Posteriormente se mezcló con el polvo prepolimerizado en una proporción polvo/líquido de 3:1. Se siguieron las instrucciones del fabricante de la

resina acrílica para la termopolimerización mediante un proceso de emulsión utilizando yeso tipo 3 y tipo 2 como revestimiento y moldes de Silicona Z Labor Zermarck en forma de discos. Las muflas se colocaron a baño de agua en una cubeta metálica a 74°C durante dos horas y después se elevó la temperatura a 100°C durante una hora. Los 20 discos fueron estandarizados en tamaño y forma así como pulidos mediante un sistema de acabado para acrílicos.

Ensayo de citotoxicidad

Se evaluó el efecto tóxico de la incorporación de nanopartículas de óxido de zinc sobre las células de fibroblastos de ratón (3T3) utilizando un formato de contacto directo de acuerdo con las especificaciones de la norma ISO-10993-5: 2009. Para la prueba de citotoxicidad, se preparó la suspensión celular de 10,000 células/mL a partir del cultivo de células. Lixiviados de las muestras se obtuvieron colocándolas en medio DMEM suplementado (suero 10%, antibiótico-antimicótico 1x, L-glutamina 25mM y aminoácidos no esenciales 1x) por 24 horas. A partir de éstos, fueron estimuladas las células sembradas en placas de 96 pocillos y se colocaron en contacto directo con los lixiviados generados por las muestras (100 µl de lixiviado). Se utilizaron 5 pocillos vacíos con células en crecimiento para fines de control (células sin estimular creciendo en DMEM).

La morfología celular se observó visualmente con un microscopio (LabMed) invertido evaluando la calidad de la monocapa celular alrededor de la muestra (10x). La viabilidad celular se determinó utilizando la prueba de reducción de sales de tetrazolio (MTT) que se basa en la capacidad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial (SDH) para reducir el anillo de tetrazolio (color amarillo) en un subproducto lineal llamado formazano (azul insoluble). La cantidad de formazán es directamente proporcional al número de células viables [6]. Después de que las células fueron incubadas 24 horas con los lixiviados de las muestras, se retiró el sobrenadante y se agregaron 10 µl de MTT (5mg/mL), para posteriormente incubar

durante 5 horas y después colocar 100 microlitros de DMS con la finalidad de disolver los cristales de formazano. Por último se llevó al lector de microplacas (Microscan Thermofisher) y se leyó a 570 nm. La densidad óptica se convirtió en un porcentaje de viabilidad de las muestras comparando con los controles que representan el 100 % de viabilidad. En relación a la norma ISO-10993-5: 2009 un efecto citotóxico se considera cuando el dispositivo/material empleado induce disminución de la viabilidad debajo de 70%.

Análisis estadístico

Los efectos del porcentaje de incorporación de nanopartículas de óxido de zinc y el tiempo de incubación sobre la viabilidad celular se evaluaron utilizando el ANOVA bidireccional con software estadístico (GraphPad Prism 5.0). Se utilizó el análisis post hoc de Tukey para definir diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. La significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

Resultados

Caracterización de las Nanopartículas

En la figura 1 se muestra el patrón de difracción de rayos X del ZnO obtenido de la base de datos del equipo (JCPDS). La muestra para el estudio fue obtenida a partir del uso de etanol a 80 °C. En el difractograma se observan los picos característicos del óxido de Zinc, que corresponden a la estructura hexagonal tipo wurtzita de la estructura del ZnO.

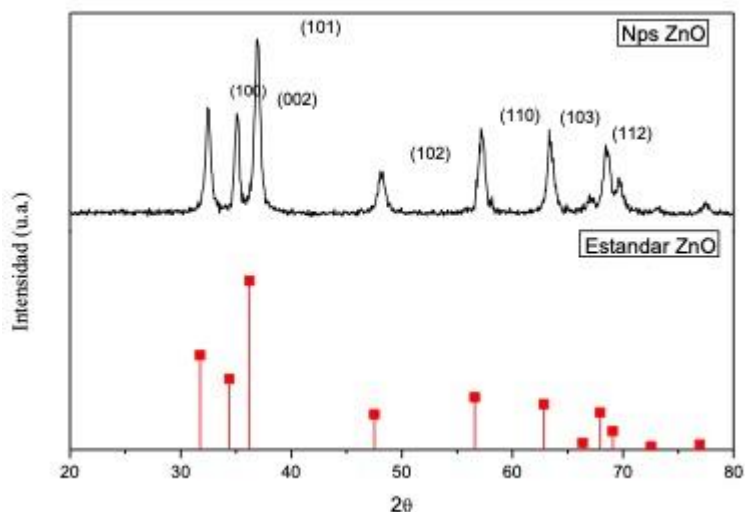


Figura 1. Difractograma de las nanopartículas de óxido de Zinc.
 Espectroscopia de Infrarrojo

En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos del análisis de FTIR realizado a las nanopartículas de ZnO, donde se observa una banda más intensa a los 500 cm^{-1} correspondiente al enlace ZnO, característico de este tipo de nanopartículas.

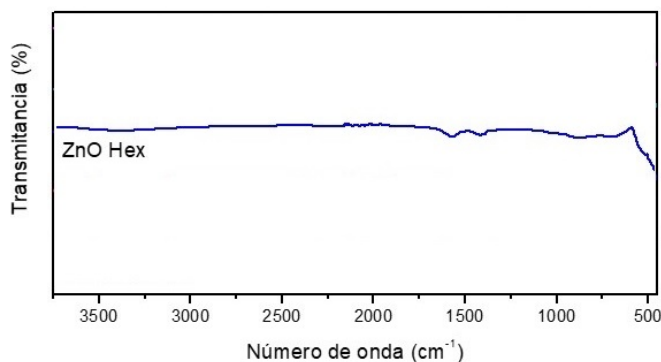


Figura 2. Espectro de infrarrojo de las nanopartículas de ZnO.

En la Figura 3 se puede apreciar la micrografía TEM tomada a las nanopartículas de ZnO sintetizadas mediante hidrólisis química, en donde se observa que las nanopartículas presentaron una morfología hexagonal. Las nanopartículas de ZnO

presentaron un tamaño de 2.1 micras. No apreciando porosidad en la superficie de la nanopartícula.

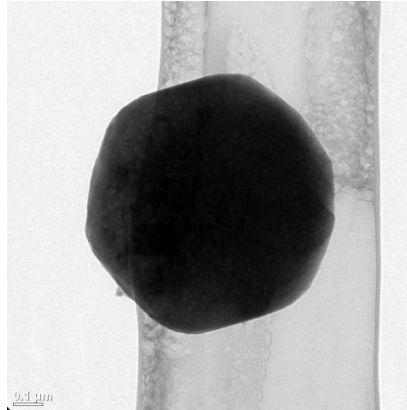
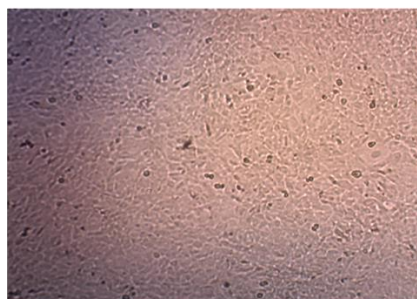


Figura 3. Micrografía TEM de las nanopartículas de ZnO.

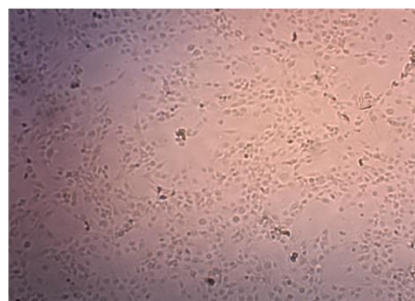
Ensayo de citotoxicidad de las películas de PMMA incorporando a las nanopartículas

La viabilidad celular de los materiales bajo estudio fue obtenida mediante el ensayo MTT y microscopía óptica para observar la morfología de las células (NHI/3T3) (Figura 4). De acuerdo con las características morfológicas en el campo claro tienen un crecimiento normal cubriendo toda la superficie con la monocapa de células (100 % de confluencia celular). En el control, que es el PMMA sin nanopartículas las células tienen una morfología normal, pero presentan espacios con lo cual se observa un retraso en el crecimiento, alcanzando el 50% de confluencia celular. En las células que estuvieron en contacto con las muestras con nanopartículas podemos observar como las células cambian con las concentraciones de 0.3 y 0.5 %m. Las células se observan sin forma regular y con baja adherencia y con baja confluencia celular, lo que sugiere que existen efectos citotóxicos que producen la muerte celular. Estos mismos fenómenos los podemos observar en las células que estuvieron en contacto con las nanopartículas modificadas y este cambio se observa

que va en relación a la concentración. A mayor contenido de NPs de ZnO en las resinas de PMMA los efectos citotóxicos para los fibroblastos incrementan.



Células sin tratamiento
nanopartículas



Células en PMMA sin

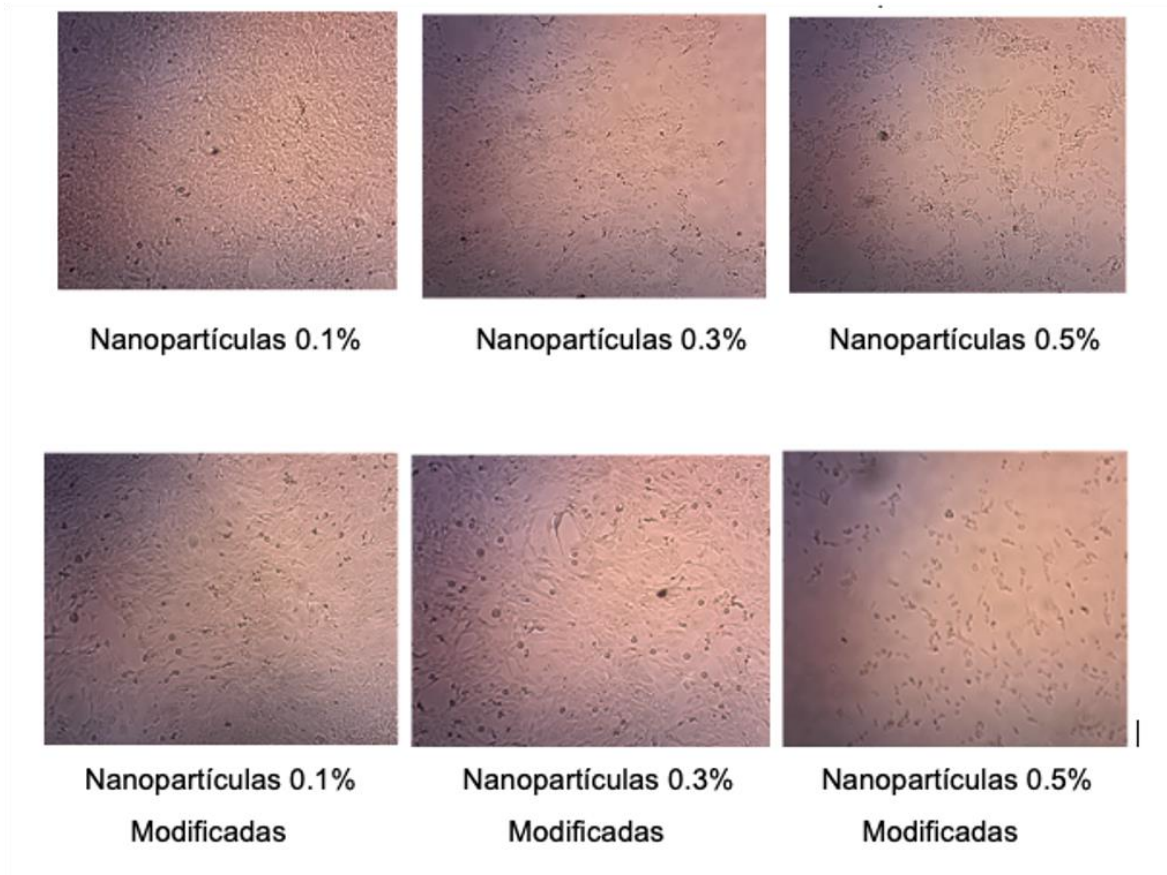


Figura 4. Micrografías de campo claro de fase invertida de las células (NHI/3T3) tratadas con PMMA con nanopartículas de óxido de Zinc con y sin modificar.

En la figura 5 se muestran los resultados del ensayo de MTT se observa que la citotoxicidad está relacionada con la concentración de las NPs de ZnO, ya que a la mayor concentración de 0.5 %m se observa la mayor muerte de las células.

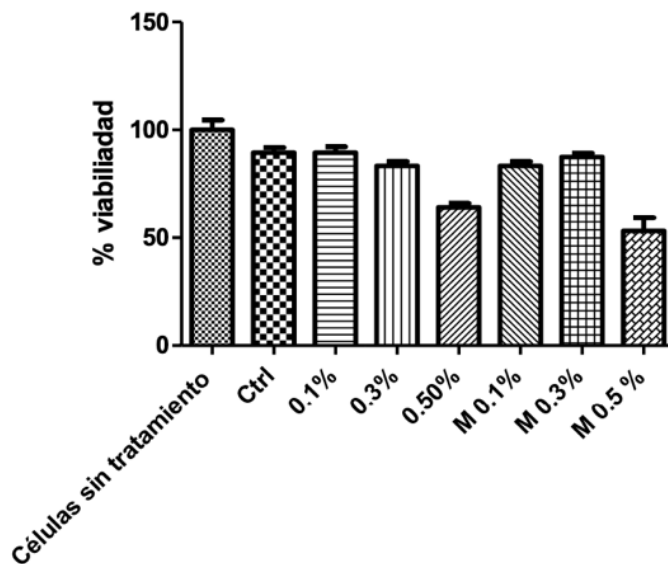


Figura 5. Viabilidad Celular. Las células 3T3 fueron estimuladas con los acrílicos incorporando las nanopartículas de ZnO a diferentes concentraciones. Los experimentos fueron realizados con 5 réplicas cada uno.

El efecto citotóxico más significativo sobre la viabilidad celular fue producido por el grupo de muestra modificado, con un porcentaje 53.18 % de viabilidad (M 0.5%) mientras que el grupo con menor efecto significativo fue la muestra con incorporación de nanopartículas al 0.1% sin modificación (0.1%) con 89.39 % de viabilidad, comparado con respecto al control (células creciendo en DMEM).

Discusión

El objetivo de la presente investigación fue el de evaluar los efectos citotóxicos de la incorporación de nanopartículas de óxido de zinc en películas de PMMA sobre los fibroblastos *in vitro* para su posterior incorporación en bases para dentaduras. Con los estudios fisicoquímicos se logró caracterizar las nanopartículas de óxido de Zinc. El presente estudio mostró que los niveles de citotoxicidades aumentaron a

mayor concentración de nanopartículas sin tomar en cuenta la modificación. El valor mas alto de citotoxicidad fue dado por la muestra con modificacion con concentración de 0.5%. Los resultados obtenidos indicaron que el óxido de zinc no es un material inerte y puede provocar respuestas biológicas. Estos resultados son similares a los logrados por Paszek y col. (2012) en el que se observó el efecto citotóxico sobre las células endoteliales humanas de los vasos sanguíneos a la concentración de nanopartículas de ZnO de 30 mg/L. Así mismo los resultados del presente estudio tambien se asemejan a los obtenidos por Cierech y otros, en el que los resultados demostraron que la viabilidad de las células disminuyeron significativamente al aumentar las concentraciones de nanopartículas (Cierech y col., 2019; Sirelkhatim y col., 2015).

Es por esto que se implementó el uso de microscopía, en la que la observación de la morfología de las células y su estructura reveló un efecto adverso de las nanopartículas de óxido de zinc para los grupos sin modificación a medida que disminuía la concentración de nanopartículas. Por lo tanto, se confirma los resultados que se obtuvieron mediante el ensayo por MTT. Es relevante el hallazgo que tanto en el estudio de imagen como en el ensayo por MTT, los grupos tanto con o sin modificación con concentraciones de 0.1 %m, 0.3 %m no revelaron efectos adversos de las nanopartículas en las células.

CONCLUSIONES

La incorporación de nanopartículas de ZnO en resinas de PMMA a la concentración de 0.5 %m fueron citotóxicas en las células NHI/3T3 como se demostró tanto en la actividad mitocondrial de la célula correlacionado con la morfología. Por lo tanto, se sugiere el uso de nanopartículas como material aditivo para base de dentaduras postizas sin ejercer un efecto citotóxico sobre las células, principalmente las modificadas con concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc al 0.3 %m que fueron las que exhibieron una menor citotoxicidad y mayor viabilidad celular.

Referencias

Allen, P., McMillan, A. (2003). A review of the functional and psychosocial outcomes of edentulousness treated with complete replacement dentures. *Journal of the Canadian Dental Association*, 69:662.

Babayevska, N., Przysiecka, Ł., Iatsunskyi, I., Nowaczyk, G., Jarek, M., Janiszewska, E., & Jurga, S. (2022). ZnO size and shape effect on antibacterial activity and cytotoxicity profile. *Scientific reports*, 12(1): 8148. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12134-3>

Cierech, M., Wojnarowicz, J., Kolenda, A., Krawczyk-Balska, A., Prochwicz, E., Woźniak, B., ... & Mierzwińska-Nastalska, E. (2019). Zinc oxide nanoparticles cytotoxicity and release from newly formed PMMA–ZnO nanocomposites designed for denture bases. *Nanomaterials*, 9(9): 1318.

Cunha-Cruz, J., Nadanovsky, P. (2007). Secular trends in socio-economic disparities in edentulism: USA, 1972–2001. *Journal of Dental Research*, 86:131-136.

Douglass, C.W., Shih, A., Ostry, L. (2002). Will there be a need for complete dentures in the United States in 2020? *Journal of Prosthetic Dentistry*, 87:5-8.

Emami, E., Freitas de Souza, R., Kabawat, M., Feine, J.S. (2013). The Impact of Edentulism on Oral and General Health. *International Journal of Dentistry*, 2013:1-7.

Gallegos Puma, V. C., & Bernal Cahuata, R. C. (2018). Estudio comparativo in vitro del efecto antifúngico de dos productos comerciales desinfectantes de prótesis removibles sobre *Candida albicans*, Cusco-2017. Universidad Andina del Cusco. Disponible: <https://repositorio.uandina.edu.pe/handle/20.500.12557/1744>

Gómez-Quintero T., Acosta-Torres L.S., Hernández-Padrón G., Campos P., de la Fuente, Castaño V.M. (2012). Nanopartículas con efecto antifúngico en prótesis dentales, *Ide@s CONCYTEG*, 7 (87):1101 – 1112.

Hackenberg, S., Scherzed, A., Technau, A., Kessler, M., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Burghartz, M., Hagen, R., & Kleinsasser, N. (2011). Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 25(3): 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.003>

Kamonkhantikul, K., Arksornnukit, M., Takahashi, H. (2017). Antifungal, optical, and mechanical properties of polymethylmethacrylate material incorporated with silanized zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 12:2353–2360.

Kumar, R., Umar, A., Kumar, G. y Nalwa, S. (2016). Antimicrobial Properties of ZnO Nanomaterials: A Review. *Ceramics International*, 43(5):3940-3961. DOI: [10.1016/j.ceramint.2016.12.062](https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.12.062)

Mohammed, A.A.-R. (2020). The epidemiology of edentulism and the associated factors: A literature Review. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 9: 1841-1843.

Mohammed, M.G., Al-Thobity A.M., Yshahin, S., Alsaqer B.T., Aiman, A. (2017). Inhibitory effect of zirconium oxide nanoparticles on *Candida albicans* adhesion to repaired polymethyl methacrylate denture bases and interim removable prostheses: a new approach for denture stomatitis prevention. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 5409–5419.

Paszek, E., Czyz, J., Woźnicka, O., Jakubiak, D., Wojnarowicz, J., Łojkowski, W., & Stępień, E. (2012). Zinc oxide nanoparticles impair the integrity of human umbilical vein endothelial cell monolayer in vitro. *Journal of biomedical nanotechnology*, 8(6): 957-967.

Ramasamy, M., Das, M., An, S. S., & Yi, D. K. (2014). Role of surface modification in zinc oxide nanoparticles and its toxicity assessment toward human dermal

fibroblast cells. *International journal of nanomedicine*, 9: 3707–3718.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S65086>

Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N.H., Ann, L.C., Bakhori, S.K., Hasan, H., Mohamad, D. (2015). Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7(3):219-242.

Stober, T., Danner, D., Lehmann, F., Séché, A.C., Rammelsberg, P., Hassel, A.J. (2012). Association between patient satisfaction with complete dentures and oral health-related quality of life: two-year longitudinal assessment. *Clinical Oral Investigations*, 6(1):313-318. doi: 10.1007/s00784-010-0483-x