



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

TESIS

Efecto de la actividad bactericida de las nanopartículas de plata
y quitosano sobre *Enterococcus faecalis in vitro*

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud

PRESENTA

C.D. Elizabeth Nava Juárez

Director (a)

Dr. Horacio Islas Granillo

Codirector (a)

Dr. José de Jesús Navarrete Hernández

Comité tutorial

Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez

Dr. Carlos Enrique Cuevas Suárez

Dr. Eduardo Guzmán Olea

Pachuca de Soto, Hidalgo, 2025



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias de la Salud

School of Medical Sciences

Área Académica de Medicina

Department of Medicine

16/06/2025

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar
Presente.

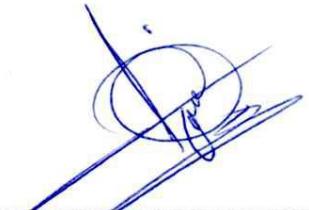
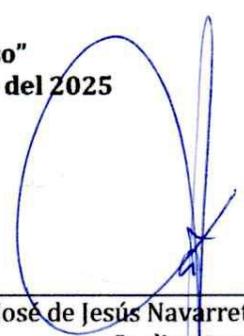
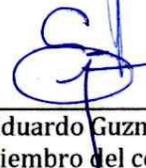
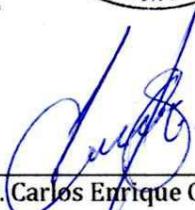
El Comité Tutorial de la **TESIS** del programa educativo de posgrado titulada **"Efecto de la actividad bactericida de las nanopartículas de plata y quitosano sobre *Enterococcus faecalis in vitro*"**, realizado por la sustentante **Elizabeth Nava Juárez**, con número de cuenta 286943 perteneciente al programa de **Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"
Pachuca, Hidalgo a 16 de junio del 2025

El Comité Tutorial

 _____ Dr. Horacio Islas Granillo Director		 _____ Dr. José de Jesús Navarrete Hernández Co director
 _____ Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez Miembro del comité		 _____ Dr. Eduardo Guzmán Olea Miembro del comité
	 _____ Dr. Carlos Enrique Cuevas Suárez Miembro del comité	

Circuito ex-Hacienda la Concepción s/n Carretera
Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo,
México. C.P.42168
Teléfono: 52(771)7172000 Ext. 41556 y 41557
medicina@uaeh.edu.mx

"Amor, Orden y Progreso"



uaeh.edu.mx

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 825676 y número de CVU 122696.

Durante el periodo Julio-diciembre de 2023 se realizó una estadia nacional de investigación en la Universidad Politécnica del Estado de Morelos (UPEMOR), en Jiutepec, Morelos, apoyada por Beca Mixta del CONACyT.

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo con el folio de dictamen número 174.

Agradecimientos Institucionales

A mi comité tutorial

Por proporcionarme herramientas, recursos y profesores de excelencia, por el apoyo y enseñanza tanto académica como personal, por el tiempo brindado para la evaluación de este proyecto.

A la Ing. en Biotecnología Karla Andrea Hernández Gil

Por apoyarme en toda la parte experimental, por acudir al laboratorio a pesar de la distancia y lo peligroso del trayecto a la Universidad, por invertir su tiempo contribuyendo en la capacitación del uso y manejo de los equipos, en la síntesis de nanopartículas de plata, en la preparación de las diluciones de quitosano y en la parte microbiológica, en la activación de la cepa liofilizada y las pruebas de susceptibilidad bacteriana, por proveerme de recursos y guías que permitieron terminar este proyecto.

Al Dr. José Luis Rivera Corona (Profesor tiempo completo UPEMOR)

Por la revisión, asesoría y aportaciones del presente trabajo, por su tiempo, paciencia, por capacitarme, por compartirme consejos para evitar errores, por la búsqueda de conocimientos, sin pedir reconocimiento. Por el compromiso brindado para terminar y aumentar los objetivos del presente trabajo.

A la Universidad Politécnica del Estado de Morelos (UPEMOR)

Por darme la oportunidad de hacer uso de sus laboratorios, equipo e insumos durante mi estadía, por el apoyo y la asesoría metodológica recibida por la Mtra. Diana Diaz Garrido, responsable del área de laboratorios, a Cinthia Durango Escobar, técnico de apoyo, y a Víctor Méndez Benunea, supervisor de vigilancia de los laboratorios UPEMOR.

INDICE

Contenido

.....	1
INDICE.....	5
INDICE GENERAL.....	7
INDICE DE FIGURAS.....	7
RESUMEN	8
I INTRODUCCIÓN	9
II ANTECEDENTES.....	10
2.1 Generalidades.....	10
Infecciones persistentes, un problema emergente en salud pública.....	10
Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	10
Reinfecciones endodónticas: Microbiota asociada al fracaso endodóntico.....	11
Soluciones actuales.....	11
Soluciones alternativas: Nanotecnología.....	11
Nanopartículas en Odontología	12
Nanopartículas de plata.....	12
Mecanismos de acción.....	12
Toxicidad de las nanopartículas de plata	13
Métodos de síntesis de nanopartículas de plata.....	13
Síntesis biológica y su papel en la síntesis de nanopartículas de plata	13
Quitosano	14
2.2 Antecedentes del problema.....	14
2.3 Planteamiento del problema	14
III JUSTIFICACIÓN	16
IV HIPOTESIS	17
V OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general	17
5.2 Objetivos específicos	17
VI MATERIALES Y METODOS	17
6.1 Contexto de la investigación.....	17
6.1.1 Tipo y diseño de estudio	17
6.2 Selección de la población, criterios de inclusión y exclusión	17
6.3 Tamaño de muestra y muestreo	18
Placas agar soya tripcaseína	18

6.4	Diagrama de diseño experimental	18
6.5	Definición de variables (dependientes, independientes)	19
6.	Prueba (principio y procedimiento)	19
	Agente reductor y estabilizador Nanopartículas de plata (AgNP's)	22
	Preparación de soluciones de Nitrato de plata AgNO ₃	22
	Síntesis AgNP's	22
	Purificación de las AgNP's.....	22
	Formulación de soluciones con AgNP's.	23
	Pruebas microbiológicas.....	23
	Obtención de las cepas.	23
	Susceptibilidad antimicrobiana.....	23
	Método de difusión de disco.	24
7.	RESULTADOS.....	24
	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
VIII	DISCUSIÓN.....	31
	8.1 Estandarización de nanopartículas de plata a partir del extracto acuoso de semilla de mango	31
	8.2 Pruebas microbiológicas AgNP's, quitosano y su interacción	31
IX	CONCLUSIÓN	32
X	REFERENCIAS	33
XI	ANEXOS.....	35
	12.1 Formatos, cuestionarios, encuestas, etc	35
	Oficio aprobación CEI-ICSA.....	35
	Artículo: Biological effects of chitosan in Dentistry	36
	36
	Feria Internacional de la Salud.....	37
	Estadía: Universidad Politécnica del Estado de Morelos (UPEMOR).....	38

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Antibiograma por difusión de disco. AgNPs sintetizadas con 0.001M de AgNO_3 sobre *Enterococcus faecalis*. Se utilizaron cinco concentraciones diferentes de AgNPs con agua destilada: $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$ y $1:10^{-5}$ $\mu\text{g/ml}$.

Figura 2. Antibiograma por difusión de disco. Chitosan 448869 sobre *Enterococcus faecalis*. Se utilizaron cinco concentraciones diferentes de Chitosan con solución salina estéril: $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$ y $1:10^{-5}$ $\mu\text{g/ml}$.

Figura 3. Antibiograma por difusión de disco, AgNPs sintetizadas con 0.001M de AgNO_3 y Chitosan 448869 sobre *Enterococcus faecalis*.

RESUMEN

Actualmente los nanomateriales representan un área de aplicación prometedora en la Odontología, utilizados para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades de la mucosa bucal, estructuras óseas y dentales; gracias a sus grandes propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad y gran potencial antimicrobiano. Asimismo, *Enterococcus faecalis* (*E. Faecalis*), considerado un microorganismo patógeno resistente a la penetración de agentes antibacterianos comunes, capaz de sobrevivir en ambientes extremos, presente comúnmente en los casos de reinfeción endodóntica. El objetivo fue evaluar el efecto bactericida de las nanopartículas de plata (AgNP's) y quitosano sobre *E. faecalis*. Se realizó un estudio *in vitro* de cultivos liofilizados de la cepa bacteriana *E. faecalis* (ATCC- 29212), en medio agar soya tripcaseína utilizando diferentes diluciones de quitosano y nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extracto acuoso de *mangifera caesia jack ex wall* (*mango ataulfo*), se realizó la prueba de susceptibilidad bacteriana en los grupos de AgNP's, y su combinación con quitosano. Se encontró que el extracto acuoso de mango es eficaz en la obtención de nanopartículas de plata, utilizando concentraciones de Nitrato de plata (AgNO₃) de 0.001 M, con una completa síntesis biológica y ecológica. Las nanopartículas de plata (AgNP's) y quitosano mostraron actividad bactericida directamente proporcional al aumento de concentración, su mayor efecto bactericida a concentración de 1:10⁻¹ µg/ml, esto sugerido por la zona de inhibición en los discos.

I INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es la comprensión y el control de la materia en dimensiones de entre aproximadamente 1 y 100 nanómetros, donde se pueden alcanzar fenómenos únicos para aplicaciones novedosas. Las nanopartículas que tienen actividad antimicrobiana han recibido atención dentro de muchos campos, incluyendo la medicina y odontología. Esta actividad se atribuye a al tamaño y la relación superficie-volumen de las partículas, que son combinadas con polímeros para proveer una variedad de aplicaciones antimicrobianas y antiadherente dentro de la cavidad oral. Ciertos nanomateriales muestran la capacidad de controlar biofilms orales, de los cuales, las AgNP's son las más efectivas contra los patógenos orales (1)

Una de las teorías más aceptadas, con respecto al mecanismo de acción del efecto bactericida de las nanopartículas de plata es que se une a las proteínas de membrana bacterianas, causando cambios estructurales en membranas intracelulares y nucleares, lo que lleva a la distorsión celular, interrupción de la respiración celular y la desnaturalización de ADN conduciendo a la apoptosis. (2)

Los microorganismos patógenos son los responsables de muchas enfermedades infecciosas a nivel mundial, de las cuales, las enfermedades bucales representan un alto porcentaje siendo un problema que afecta a la población. *E. faecalis* microorganismo que se incluye dentro de las bacterias prioritarias para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos considerada por la OMS como de prioridad elevada. (3)

Debido a que muchos de los procesos para la síntesis de nanopartículas metálicas utilizan procesos costosos o generan subproductos tóxicos para el medio ambiente. Se opta por utilizar síntesis biológica, creada por la agencia de protección ambiental de E.U.A hace dos décadas, debido a la creciente demanda de procesos más sostenibles y amigables con el medio ambiente. La biotecnología facilita la obtención de nanomateriales que cumplan su función, buscando el aumento de la eficiencia y reducción de costos, fusionando materiales de origen biológico y no biológico a nivel nanométrico. (4)

Este documento se divide en dos secciones, en la primera sección se describen las generalidades, propiedades y mecanismo de acción de las nanopartículas de plata y quitosano, así como sus antecedentes, planteamiento del problema y justificación, en la segunda sección incluye la metodología utilizada y los resultados obtenidos, discusión, así como la conclusión de este proyecto.

II ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

Infecciones persistentes, un problema emergente en salud pública.

La introducción de los antibióticos en la práctica clínica representó una de las intervenciones más importantes para el control de las enfermedades infecciosas. Los antibióticos han salvado millones de vidas y también han supuesto una revolución en la medicina. Sin embargo, una amenaza creciente ha deteriorado la eficacia de estos fármacos, la resistencia bacteriana a los antibióticos, que se define aquí como la capacidad de las bacterias para sobrevivir en concentraciones de antibióticos que inhiben/matan a otras de la misma especie. (5,6)

La Organización Mundial de la Salud define a la resistencia a los antimicrobianos como “la resistencia de un microorganismo a un medicamento antimicrobiano al que originalmente era vulnerable”, esto se ha vuelto un grave problema de salud pública en todo el mundo, ya que los antibióticos se vuelven ineficaces con consecuente persistencia de los agentes bacterianos en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación de la infección, además de complicar el estado de salud del portador, sin dejar de lado el importante incremento de los costos del proceso de atención médica que se brinda a los usuarios, ya que se eleva en número y duración las hospitalizaciones, así como la necesidad de tratamientos cada vez más agresivos, invasivos y costosos. (7,8)

Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos

Enterococcus faecalis.

Bacteria inmóvil, anaerobia facultativa, capaz de sobrevivir en ambientes extremos que incluyen pH altamente alcalino de 9,6 y elevadas concentraciones de sal. Habitan en el interior del tracto gastrointestinal, genitourinario y en la saliva. Dentro del género *Enterococcus* se ha dado un nuevo enfoque y se ha propuesto el término «enterococos y estreptococos intestinales» refiriéndose a las bacterias indicadoras de contaminación fecal. Entre éstas se encuentra el grupo *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*). (9)

Tiene la capacidad de adaptarse para sobrevivir en entornos hostiles y formar biopelículas, habita en el interior del tracto gastrointestinal, pueden encontrarse también en el tracto genitourinario y en la saliva, es capaz de vivir en un pH alcalino extremo. Estas capacidades hacen *E. faecalis* resistente en su eliminación. Por otro lado, las nanopartículas han demostrado propiedades antimicrobianas de amplio espectro, debido a su pequeño tamaño y buena capacidad antibiopelícula. (10)

Permitir el desarrollo de nuevas estrategias para reducir su producción y, en consecuencia, mejorar los enfoques terapéuticos. (11)

Reinfecciones endodónticas: Microbiota asociada al fracaso endodóntico

La principal razón del fracaso endodóntico es la presencia de algunas especies de bacterias dentro del sistema de conductos radiculares. Algunas bacterias son más resistentes a los agentes desinfectantes, provocando una infección intrarradicular o extrarradicular persistente. Existen también otros factores, como obturación deficiente, sellado coronal inadecuado (filtraciones) y conductos no tratados (canales omitidos). (12)

Soluciones actuales.

Uno de los avances médicos más importantes del siglo XX, es la terapia antibiótica; sin embargo, la propagación de la resistencia en los entornos sanitarios y en la comunidad amenaza los enormes logros conseguidos gracias a la disponibilidad de la terapia antibiótica. Las infecciones causadas por bacterias resistentes provocan tasas de resultados adversos hasta dos veces superiores a las de infecciones similares causadas por cepas sensibles. Estos resultados adversos pueden ser clínicos o económicos y reflejan principalmente el fracaso o el retraso del tratamiento antibiótico. La magnitud de estos resultados adversos será más pronunciada a medida que aumente la gravedad de la enfermedad, la virulencia de la cepa o la vulnerabilidad del huésped. Las repercusiones negativas de la resistencia a los antibióticos pueden medirse a nivel del paciente por el aumento de la morbilidad y la mortalidad, a nivel de la asistencia sanitaria por el aumento de la utilización de recursos, el aumento de los costes y la reducción de la actividad hospitalaria y a nivel de la sociedad por las directrices de tratamiento antibiótico que favorecen una terapia empírica de espectro cada vez más amplio. (13,14)

Soluciones alternativas: Nanotecnología

La nanotecnología surge en la segunda mitad del siglo XX. Representando un área de investigación en expansión, que involucra estructuras, dispositivos y sistemas con propiedades y funciones novedosas debido a la disposición de sus átomos en la escala de 1-100 nm. Cabe destacar que en los últimos años la nanotecnología se ha aplicado a la salud humana con resultados prometedores, especialmente en el campo del tratamiento del cáncer. Sus dimensiones nanométricas, alta energía superficial y densidad de carga permiten a las nanopartículas atravesar la membrana celular, penetrando fácilmente en una célula patógena y así inducir su muerte. (15)

Se le han encontrado aplicaciones en biomedicina, electrónica, energía, medio ambiente, alimentos, fotoelectrónica, industria textil, automovilística, construcción, entre otros. Un área de aplicación prometedora de los nanomateriales compuestos es la medicina, incluida la odontología, en la que se utilizan para el diagnóstico, prevención y el tratamiento de enfermedades de la mucosa bucal y los tejidos duros de la cavidad oral. Estos materiales pueden reproducir las propiedades mecánicas, fisicoquímicas y estéticas de los tejidos duros de los dientes y, a menudo, los superan en características de resistencia. Se pueden realizar restauraciones dentales con buenas características estéticas, idénticas a las de los tejidos dentarios duros, ya que poseen mejores propiedades ópticas. La disminución de la acción microbiana en los órganos de la cavidad bucal es un tema importante en la prevención y el tratamiento de enfermedades bucales. (16)

Actualmente el uso de la nanotecnología en el área de salud ha dado pie al desarrollo de nuevas posibilidades en medicina y en odontología, siendo ahora más común su uso, esta nanotecnología es aplicada principalmente en nuevas técnicas que buscan aliviar el dolor. La aplicación de la nanotecnología en el campo de las ciencias de la salud, ofrece el potencial para estudiar sistemas biológicos a nanoescala, y para resolver problemas médicos que afectan a millones de pacientes en todo el mundo. (17)

Nanopartículas en Odontología

Recientemente se ha introducido en la Odontología; el uso de las nanopartículas, que permite diagnosticar, tratar y prevenir enfermedades, dando resultados beneficiosos gracias a sus grandes propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad y gran potencial antimicrobiano. Se ha introducido el uso de nanopartículas principalmente a base de plata en diferentes materiales con el fin de mejorar sus propiedades, ya que es bien sabido que la plata tiene efectos antibacterianos y por ello al ser aplicado en materiales de uso odontológico ayudan a que estos, tengan mejores propiedades y resultados. (18)

Nanopartículas de plata

Nanopartículas metálicas biocompatibles de forma esférica con un tamaño controlable en el rango de 3 a 35 nm. Se pueden sintetizar a partir de una variedad de técnicas que incluyen rutas físicas, químicas y biológicas. Se han utilizado ampliamente como nanomateriales para la fabricación de productos cosméticos y sanitarios, textiles antimicrobianos, apósitos para heridas, fármacos antitumorales, etc. debido a sus excelentes propiedades antimicrobianas. También han demostrado una propiedad antibacteriana eficaz contra *E. faecalis*. (19)

Mecanismos de acción.

Existen algunas teorías sobre su mecanismo de acción. La primera teoría es que las nanopartículas de plata tienen la capacidad de anclarse e introducirse a la pared celular, causando cambios estructurales en la membrana, como su permeabilidad, provocando su muerte. La formación de radicales libres por las nanopartículas es considerado otro mecanismo. que demuestran que estos radicales tienen la habilidad de dañar la membrana celular, haciéndola porosa, lo que lleva a la muerte celular. También se ha propuesto que puede existir una liberación de iones de plata por las nanopartículas, y estos pueden interactuar con varias enzimas vitales e inactivarlas. (20,21)

Toxicidad de las nanopartículas de plata

La toxicidad está determinada por la vía de exposición, absorción, transporte, distribución, acumulación en el organismo y el tipo de mecanismo de entrada a nivel celular. Cuando las nanopartículas de plata son administradas por contacto dérmico, vía oral, inhalación o circulación sanguínea, pueden tener un nivel de toxicidad que depende de los iones de plata liberados, el tamaño, forma, solubilidad, la carga superficial y el estado de aglomeración que tengan. La toxicidad de las nanopartículas de plata afecta principalmente a la mitocondria, ya que induce a la liberación mitocondrial del citocromo C al citosol, además provocan la pérdida del potencial de membrana mitocondrial dando como resultado la activación de la vía intrínseca de apoptosis. (22)

Métodos de síntesis de nanopartículas de plata

Síntesis biológica y su papel en la síntesis de nanopartículas de plata

La táctica emergente de la valorización de desechos de frutas es una estrategia para minimizar la dependencia de solventes tóxicos y productos químicos comúnmente utilizados en la preparación de nanopartículas de plata (AgNP's). Proceso interesante y sostenible que implica la reducción de iones de plata a escala nanométrica utilizando extractos de materiales orgánicos como agentes reductores y estabilizadores. (23)

La síntesis biológica de nanopartículas es un método eficaz para la síntesis de nanopartículas utilizando microorganismos, plantas o sus extractos y también con ciertas biomoléculas. Lo que representa una alternativa limpia, no tóxica, amigable con el medio ambiente y que sobrepasa en la mayoría de las veces a otros métodos de síntesis como los físicos o los químicos tradicionales en cuanto a costo, cantidad y calidad de las nanopartículas obtenidas. En la actualidad el uso de plantas o sus extractos ha captado la atención ya que en algunos estudios se ha demostrado que son buenos agentes reductores y estabilizantes. Estos evitan efectos no deseados como la agregación en soluciones acuosas y prolongan la vida útil de las nanopartículas, además de ser amigables con el medio ambiente, no tóxicos y de fácil implementación. (24)

Además, el uso de extractos de plantas para este propósito es potencialmente ventajoso sobre el uso de microorganismos debido a la facilidad de mejora, un proceso menos peligroso y sin mantenimiento de cultivos celulares. Diversos metabolitos vegetales, incluidos terpenoides, polifenoles, azúcares, alcaloides, los ácidos fenólicos y las proteínas juegan un papel importante en la bioreducción de iones metálicos, produciendo nanopartículas. (25)

Quitosano

Uno de los grandes retos de la biomedicina actual, es desarrollar y evaluar nuevos biomateriales que permitan transportar al tejido blanco moléculas con aplicación terapéutica. Los polímeros naturales o biopolímeros, constituyen un grupo de biomoléculas que están siendo ampliamente estudiadas con ese objetivo. Sin embargo aunque existe una gran variedad de ellos, el quitosano ha destacado y despertado el interés de diversos grupos de investigación. El quitosano es un polisacárido de origen natural derivado de la desacetilación alcalina de la quitina, presente en los caparazones de los crustáceos, formado por N-acetil-D glucosamina y D-glucosamina. (26)

La quitina también puede presentarse en ciertos hongos de la familia Mucoracea y en levaduras, formando parte de su pared celular. Se ha encontrado que no tiene respuesta antigénica e incluso tiene propiedades antiinflamatorias. El efecto hemostático del quitosano también es una característica importante, principalmente porque puede inducir la adhesión y agregación plaquetaria y activar la coagulación sanguínea endógena. El quitosano también puede controlar el sangrado mediante la adsorción de plasma y la coagulación de glóbulos rojos. Es uno de los biopolímeros que, por su capacidad de asociarse, encapsular y proteger al ADN, puede ser utilizado como un vehículo para la liberación de fármacos. (27)

Debido a que el quitosano tiene biodegradabilidad, biocompatibilidad, propiedades hidrofílicas, antimicrobianas, actividad biológica y otras propiedades, y tiene diferentes formas de procesamiento (solución, mezcla, esponja, película, gel, pasta, tableta, microesferas y micropartículas, etc.), tiene muchas aplicaciones biomédicas, incluida la cicatrización eficaz de heridas, la regeneración de tejidos, la regeneración ósea, etc. Dado que proviene de recursos naturales y renovables, no solo es un biopolímero natural económico, sino también rentable. (28,29)

2.2 Antecedentes del problema

Enterococcus faecalis: Principal patógeno asociado al fracaso endodóntico

Es esencial eliminar todos los tejidos pulpares, restos dentinarios y microorganismos viables del sistema de conductos radiculares durante el tratamiento de endodoncia. Dado que las bacterias y sus subproductos son los factores causantes de la inflamación pulpar y perirradicular, su eliminación es vital para un tratamiento de endodoncia exitoso. No eliminarlos eficazmente podría provocar una inflamación persistente y un deterioro de la curación. Aunque la instrumentación e irrigación adecuada del conducto, pueden disminuir la cantidad de bacterias, no pueden eliminar por completo algunas bacterias multirresistentes del conducto radicular. (30,31)

2.3 Planteamiento del problema

Hoy día, se postula que la verdadera causa de fracaso de muchos tratamientos aparentemente correctos es la permanencia de bacterias. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), microorganismo patógeno resistente a la penetración de agentes antibacterianos comunes que representa un reto no solo en infecciones crónicas en el área médica, sino también en el área odontológica; a pesar de los diversas técnicas asépticas y métodos terapéuticos. (32)

La nanotecnología aplicada en la salud ha representado un gran avance en la medicina y también en las diferentes áreas de la odontología donde ha tenido un gran impacto ya que ha revolucionado la forma en que se realizan los tratamientos cotidianos, mezclando diversas áreas de estudio con un mismo fin, la aplicación de nanopartículas para mejorar las propiedades de los materiales dentales, incrementando su eficacia para así obtener mejores resultados después de su aplicación. Se necesitan más estudios clínicos para conocer sus beneficios y lo que implica su uso para brindar una mejor calidad del tratamiento en este campo innovador. (33)

Asimismo, el quitosano es un biopolímero, usado como alternativa para aplicaciones quirúrgicas debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Algunos de sus propiedades incluyen el uso de quitosano como material adhesivo y antimicrobiano, como agente hemostático, así como para la reparación tisular. Se han desarrollado polímeros modificados a base de quitosano para brindar beneficios adicionales a estos materiales. (34)

El amplio campo de aplicaciones de los materiales que contienen nanopartículas de plata en Odontología se debe a su acción antiinflamatoria y capacidad no solo para dotar a los materiales dentales de propiedades antibacterianas y antifúngicas, sino también para mejorar sus propiedades mecánicas. (35)

A lo largo de la historia, la plata se ha utilizado continuamente en medicina por sus propiedades antibacterianas. Ahora se encuentra integrada en ropa y telas, acero quirúrgico, desodorantes, pasta de dientes, juguetes, humidificadores y mucho más; Se utiliza para retrasar el crecimiento de bacterias no deseadas. A pesar de esto existe poca información sobre el efecto de la combinación de ambos nanomateriales contra *E. Faecalis*. Se han realizado estudios sobre su actividad de manera aislada, contra algunos microorganismos que han demostrado resistencia bacteriana. (36)

En el presente trabajo las nanopartículas fueron administradas a diferentes concentraciones, de manera aislada y en combinación. Se evaluó su efecto bactericida en cultivos de cepas liofilizadas de *E. faecalis*.

¿La combinación de las nanopartículas de plata y quitosano tendrá un efecto bactericida contra *Enterococcus faecalis*?

III JUSTIFICACIÓN

En la actualidad los tratamientos utilizados para combatir patógenos multirresistentes tienen algunas desventajas. Por ejemplo, existen tratamientos odontológicos, quirúrgicos, antimicrobianos y todos los anteriores combinados, que generalmente no son efectivos, son económicamente elevados y los procesos de sanación son más lentos. Dentro de los tratamientos antimicrobianos más utilizados, se encuentran los antibióticos que generan en los microorganismos resistencia a los mismos debido a su mala administración y agravan el problema, por lo que se requiere desarrollar una alternativa que minimice el problema.

Este proyecto es innovador porque a partir de él se pretende reducir de manera importante la incidencia de las infecciones asociadas a *E. faecalis* en preserva y mejora de la salud publica utilizando herramientas y conocimientos moleculares.

Las investigaciones actuales en el mundo se han enfocado en realizar estudios de los nanomateriales antimicrobianos contra hongos y bacterias en el área médica, dejando un modelo de investigación emergente en la Odontología, existiendo escasa información. Por lo cual, a partir de este proyecto se aspira introducir nuevos materiales dentales con mayor eficacia y capacidad de penetración además de mejorar su biodisponibilidad. Por lo que se requiere seguir profundizando más sobre la actividad bactericida de estos nanomateriales que han demostrado propiedades bactericidas.

IV HIPOTESIS

La combinación de las nanopartículas de plata con quitosano, tendrán un efecto bactericida contra *E. faecalis in vitro*.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia bactericida de la combinación de las nanopartículas de plata y quitosano contra *E. faecalis*.

1. Determinar la concentración mínima bactericida de las nanopartículas de plata contra *E. faecalis*.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar la concentración mínima bactericida de las nanopartículas de plata contra *E. faecalis*.
2. Determinar la concentración mínima bactericida del quitosano contra *E. faecalis*.
3. Evaluar el efecto bactericida de la combinación de las nanopartículas de plata y quitosano contra *E. faecalis*.

VI MATERIALES Y METODOS

6.1 Contexto de la investigación

Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Politécnica del Estado de Morelos durante el periodo julio-diciembre 2023.

6.1.1 Tipo y diseño de estudio

Este proyecto de investigación fue de tipo

- ✓ Experimental
- ✓ Cuantitativo
- ✓ Prospectivo
- ✓ Descriptivo

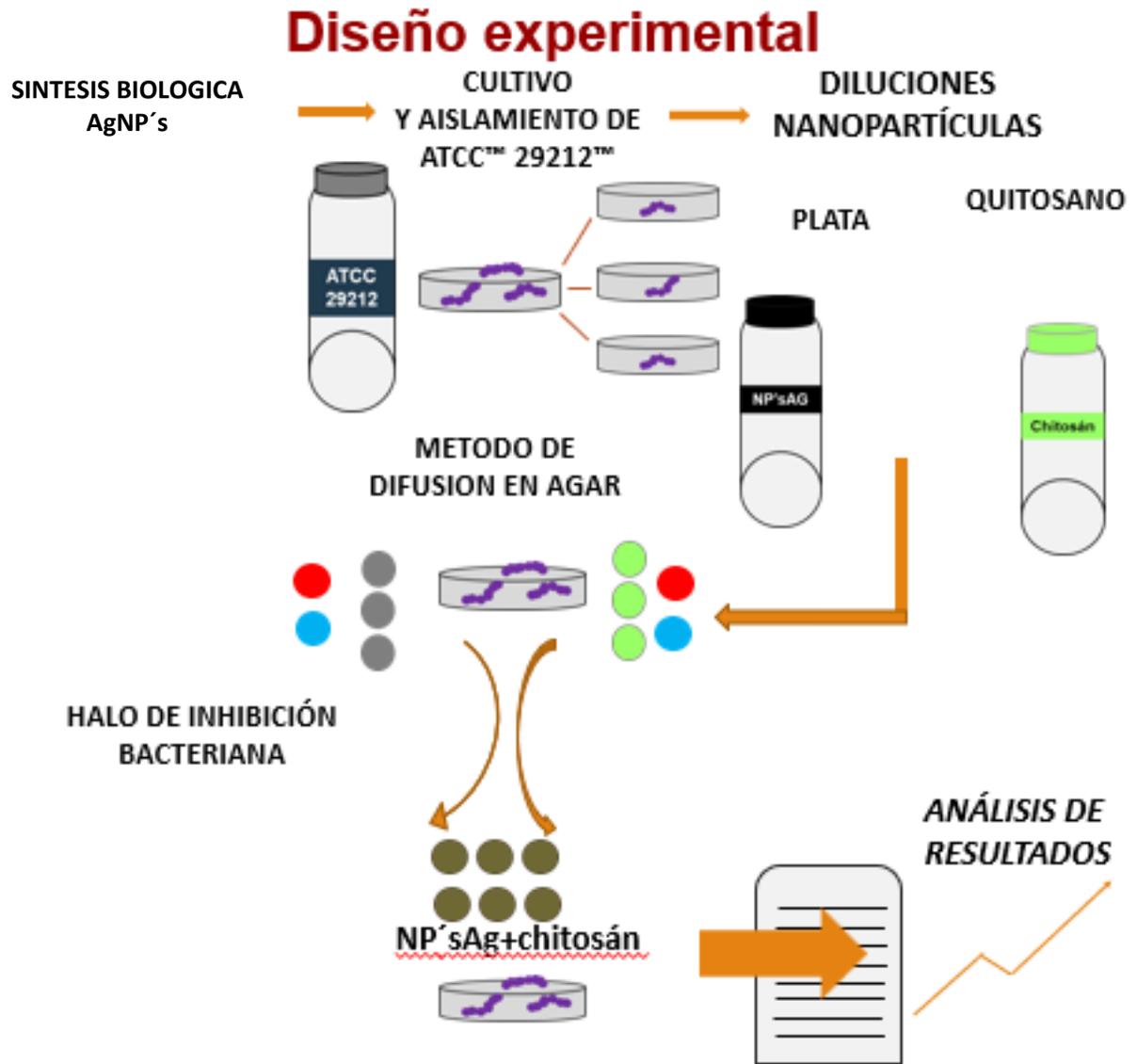
6.2 Selección de la población, criterios de inclusión y exclusión

Criterios de Inclusión	Criterios de exclusión
Cultivos viables de la cepa ATCC 29212 <i>E. faecalis</i> en agar soya tripcaseína.	Cultivos con ausencia de crecimiento de halo de crecimiento bacteriano.

6.3 Tamaño de muestra y muestreo

Placas agar soya tripcaseína

6.4 Diagrama de diseño experimental



6.5 Definición de variables (dependientes, independientes)

Tabla 1. Variables			
Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional
Concentración mínima bactericida MBC	Independiente, cuantitativa	Concentración mínima de antimicrobiano capaz de matar un 99.9% de la población bacteriana inicial. (37)	Concentración mínima bactericida de las nanopartículas de plata y quitosano.
Halo de inhibición bacteriana	Dependiente, cuantitativo	Áreas en torno a un compuesto antibiótico en el que las bacterias no pueden crecer. (38)	Análisis del efecto bactericida de las nanopartículas de plata y quitosano, de manera aislada y en conjunto contra bacterias viables <i>Enterococcus Faecalis</i> .

6. Prueba (principio y procedimiento)

Equipo

Centrifuga de Alta Velocidad Thermo Scientific Sorvall LYNX™ 4000.

Catalogo 75006580, capacidad 4 x 1000 ml (4 L), máx. velocidad 24,000 rpm, refrigerado sí, amperaje 30 A, altura exterior 930 mm, longitud exterior 805 mm, peso neto 283 kg, intervalo de temperatura de - 10 a + 40 °C, anchura exterior 700 mm. Sistema de accionamiento motor de par de torsión alto, sin escobillas, tecnología ecológica modo ecológico, mín. velocidad 500 rpm. Exactitud de temperatura ± 2 °c, poder de 200 a 240 V, de 50 a 60 Hz.

Campana de flujo laminar vertical: Modelo CV-1, marca Ecoshel.

Descripción técnica: Altura de la superficie de trabajo 660 mm, velocidad del flujo de aire promedio de 0.3-0.5 m/s, velocidad del aire ajustable, ventana frontal manual con apertura máxima de 490 mm. Filtro HEPA 99.999% de eficiencia para 0.3um, pre-filtro de fibra de poliéster, lámpara UV de 20 W con emisión a 253.7 nm, luz blanca

por lámpara LED de 8 W. Dimensiones internas: 800 x 530 x 540 mm, dimensiones externas: 802 x 650 x 1550 mm, peso bruto: 116 kg. Consumo energético 350 W, fuente de alimentación: CA 110V±10%, 60Hz.

Espectroscopía UV-VIS.

La espectroscopía UV-VIS implica la absorción de luz ultravioleta / visible por una molécula que causa la promoción de un electrón desde un estado electrónico fundamental a un estado electrónico excitado. El cambio de un máximo de absorción hacia una longitud de onda más larga es llamado cambio batocromático, sin embargo, el cambio de un máximo de absorción hacia la longitud de onda más corta se llama desplazamiento hipsocrómico. Se puede utilizar como una herramienta excelente para caracterizar las propiedades de las nanopartículas metálicas, en particular el tamaño y concentración. Esto último es explicado por la ley de Lambert-Beer que relaciona la cantidad de radiación electromagnética absorbida por un analito con la concentración de este en solución. (39)

Espectrofotómetro DR 3900™

Descripción técnica: Modo de funcionamiento Transmittancia (%), absorbancia y concentración, exploración (longitud de onda, tiempo). Fuente de luz: Lleno de gas tungsteno (visible), Sistema óptico: Haz de referencia, espectral Rango de la longitud de onda 320 a 1100 nm. Exactitud de longitud de onda ± 1.5 nm (rango de longitud de onda de 340 a 900 nm). Reproducibilidad de longitud de onda 0.1 nm, resolución de longitud de onda 1 nm. Calibración de longitud de onda automática, selección de longitud de onda automática, basada en la selección del método. Ancho de banda espectral 5 nm, rango de medición fotométrica ± 3.0 Abs (rango de longitud de onda de 340 a 900 nm), precisión fotométrica 5 mAbs a 0.0 a 0.5 Abs 1 % a 0.50 a 2.0 Abs. Linearidad fotométrica < 0.5 % a 2 Abs ± 0.01 % 2 Abs con vidrio neutro a 546 nm. Luz difusa $< 0,1\%$ T a 340 nm con NaNO₂, pantalla 7 pulgadas WVGA (800 pix x 480 pix), registrador de datos 2000 valores medidos (Resultados, fecha, hora, ID de la muestra, ID de usuario).

Reactivos

Los reactivos utilizados para el desarrollo del proyecto fueron: Agar Soya Tripcaseina de la marca Britania con número de identificación, quitosano de la marca Sigma Aldrich con número de identificación 448869, nitrato de plata (AgNO₃) de la marca Merck millipore con número de identificación 101510 y cepa liofilizada de *E. faecalis* ATCC 29212.

Antibiograma

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana o antibiograma prueba la capacidad de los agentes antimicrobianos para inhibir el crecimiento de cepas microbianas, utilizando diferentes métodos, tal como, la difusión de disco. Este método se basa en un disco de papel de filtro impregnado con una concentración conocida de un compuesto

antimicrobiano colocado en una placa con agar. Al realizar un antibiograma, se obtiene un crecimiento simultáneo de la bacteria contra la difusión del compuesto antimicrobiano probando los efectos inhibitorios de este. (40)

Medios de cultivo.

Consta de una solución o agar que contiene nutrientes necesarios para permitir el crecimiento de microorganismos, dichos agares y caldos suelen contener nutrientes específicos, utilizándolos según la naturaleza de cada microorganismo, permitiendo analizar la presencia de este sobre alguna área o sustancia a analizar como punto de control. Estos nutrientes específicos suelen sujetarse a la concentración de monosacáridos o disacáridos o algún metabolito específico, sea orgánico o inorgánico que presenta sensibilidad ante la digestión del microorganismo determinado. (41)

Resultados.

Métodos.

Agente reductor y estabilizador Nanopartículas de plata (AgNP's)

La obtención de nanopartículas de plata se realizó por síntesis biológica utilizando como agente reductor y estabilizador extracto acuoso de hueso de mango *mangifera caesia jack ex wall (mango ataulfo)*, obtenido del mercado de Jiutepec, Morelos. Se preparó tomando 200g hueso de mango completamente lavado, cortado en porciones pequeñas. Dichos fragmentos fueron añadidos a 1L de agua destilada para su calentamiento a 80°C durante 1 hora. Después la solución se filtró utilizando una malla metálica con poros de 5 mm. Para clarificar el filtrado, este se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante.

Preparación de soluciones de Nitrato de plata AgNO₃.

Se preparó solución de AgNO₃ a la concentración: 0.001 M. equivalente a 0.08488 g de Nitrato de plata, diluidos en 500ml de agua destilada. La solución fue almacenada en frasco de vidrio cubierto en su totalidad con papel aluminio.

Síntesis AgNP's

En un vaso de precipitado de 50ml cubierto con papel aluminio se colocaron 40 ml de solución inicial de AgNO₃ y un volumen inicial de 1 ml de extracto acuoso de *hueso de mango*. Posteriormente el vaso fue colocado en una parrilla de calentamiento con agitación manteniendo una temperatura de 80°C y agitación constante por 1 hora.

Lo anterior se repitió bajo las mismas condiciones, cambiando el volumen de extracto por 1 ml, 2 ml, 4 ml y 6ml. Al término de cada experimento, se tomó una alícuota de 4 ml para la obtención de datos por medio de espectrofotometría de barrido (Espectrofotómetro DR 3900™), utilizando un rango de longitud de onda de 700 a 300 nm. Los datos obtenidos fueron graficados utilizando Excel, de Microsoft Office. Subsecuente se eligieron las condiciones con la cual la obtención de AgNP's fue mayor, descartando las pruebas de 1ml.

Purificación de las AgNP's.

La solución obtenida de la síntesis biológica fue colocada en frascos especiales para centrifugar las AgNP's con el fin de precipitarlas (Centrifuga de Alta Velocidad Thermo Scientific Sorvall LYNX™ 4000). Las condiciones utilizadas fueron 12,000 rpm por 30 minutos, realizando cuatro lavados con agua destilada. Una vez lavadas, las AgNP's se colocaron en crisoles para ser secadas en una estufa a 100°C. Ya secas, se rasparon de las paredes y fondo del crisol con una espátula. Para separarlas solo se requirió de un mortero con pistilo.

Formulación de soluciones con AgNP's.

Se realizaron diluciones para obtener soluciones de AgNP's a las concentraciones: $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$ y $1:10^{-5}$ µg/ml. Dichas soluciones fueron almacenadas en tubos Hatch para su uso en las pruebas microbiológicas.

Preparación de quitosano

Se utilizó quitosano (Sigma Aldrich) con número de identificación 448869, se preparó según las instrucciones del fabricante. Se realizaron diluciones para obtener soluciones de AgNP's a las concentraciones: $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$ y $1:10^{-5}$ µg/ml. Dichas soluciones fueron almacenadas en tubos Hatch para su uso en las pruebas microbiológicas.

Pruebas microbiológicas.

Determinación de la concentración mínima bactericida (MBC). Las concentraciones de las soluciones utilizadas para las determinaciones de MBC serán diferentes partiendo de la concentración soluble máxima de los nanomateriales. Una vez determinada la MBC de cada elemento se procederá a evaluar su efecto bactericida en conjunto, realizando un recuento total de unidades formadoras de colonias.

Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC): Método de recuento en placa, por este método se determina el número de microorganismos viables en una muestra en relación de la UFC/ml.

Obtención de las cepas.

La bacteria fue comprada en el cepario del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM. Siendo colocadas en tubos Hatch individuales con medio semisólido y cajas Petri estéril con medio de cultivo agar soya tripcaseina, incubadas a 37°C por 24 h.

Susceptibilidad antimicrobiana.

La susceptibilidad antimicrobiana de las AgNP's y quitosano se evaluó utilizando el método de difusión de disco y prueba de inhibición crecimiento. La técnica de césped fue empleada para el crecimiento bacteriano en las cajas Petri, utilizando 50 µL de inóculo preparado con 24 horas de antelación.

Método de difusión de disco.

Se utilizó el método de difusión de disco de Kirby-Bauer, utilizando agar soya tripcaseina, el agar se preparó según las instrucciones del fabricante. La superficie de las placas de agar fue inoculada con *E. faecalis*; Los discos de papel estériles hechos de papel de filtro, cargados con 25 μL de AgNP's y quitosano a diferentes concentraciones. Las placas se incubaron a 37 ° C durante 24 horas, después de lo cual fueron sometidas a un análisis visual.

7. RESULTADOS

A continuación, se describen los resultados obtenidos de la síntesis de nanopartículas de plata obtenida a partir de extracto de hueso de mango.

En la tabla 1, se muestra el efecto del volumen de extracto acuoso de hueso de mango sobre la formación de AgNP's utilizando 0.001M de AgNO_3 . Se observan picos entre 400 y 450 nm, el pico máximo se presentó con 4 y 6 mL de extracto. La banda de los sólidos suspendidos del extracto de mango muestra un pico en un rango de 250 a 300 nm. La mejor condición de volumen de reacción fue la obtenida utilizando 4ml y 6ml de extracto acuoso de mango, tomando para este estudio la condición de 2ml.

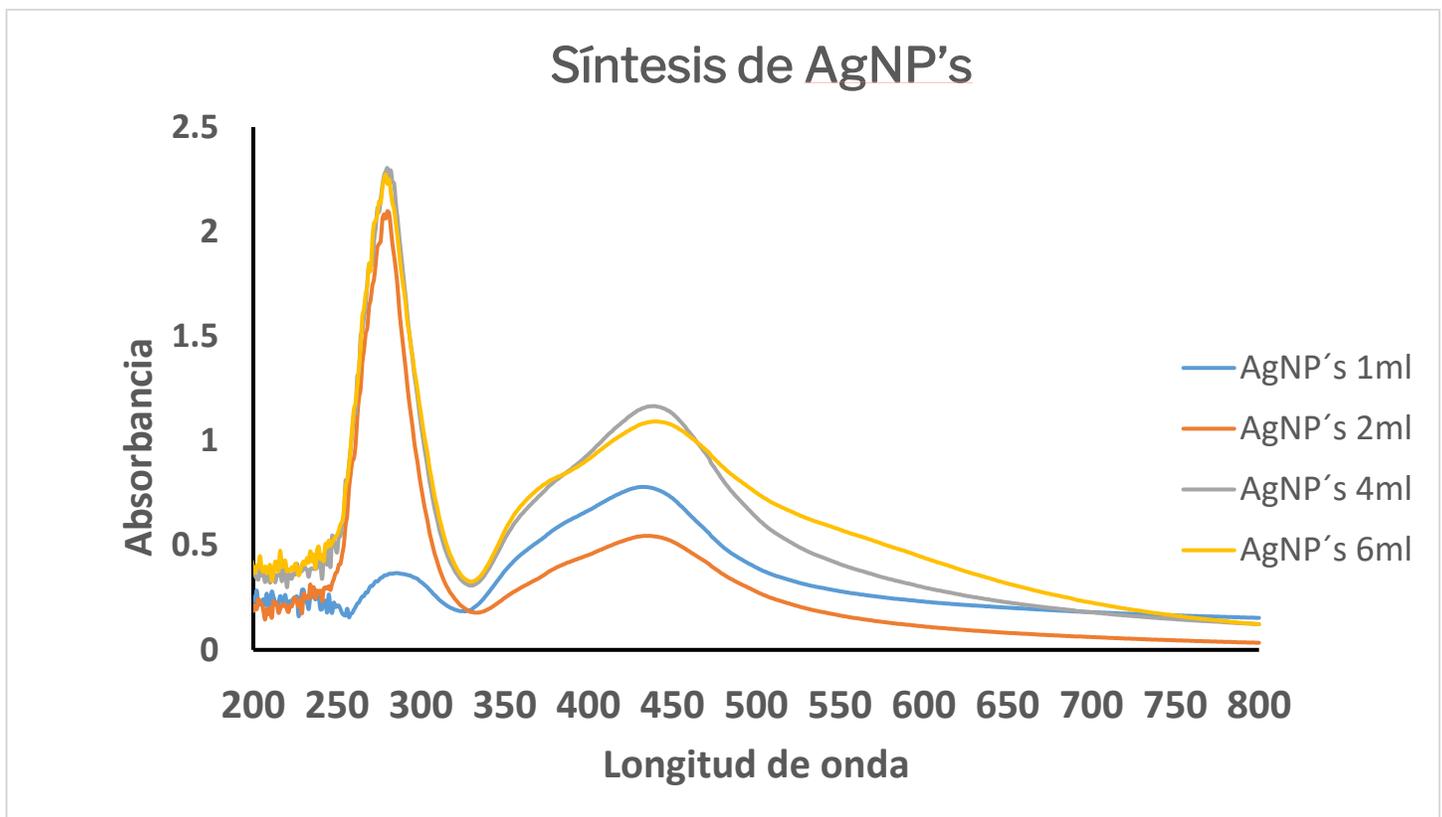


Tabla 1. Volumen de reacción por espectrofotometría de síntesis de AgNP's. Utilizando 0.001 M de AgNO_3 con 1, 2, 4, y 6 ml de extracto acuoso de mango

En la tabla 2, se muestra el efecto del tiempo y la temperatura sobre la formación de AgNP's utilizando 0.001M de AgNO₃. El pico máximo en 450 nm, se presentó a los 30min, 1hr y 1:30hrs a 80°C. La banda de los sólidos suspendidos del extracto de mango muestra un pico en un rango en 290 nm. La condición utilizada para este estudio fue la modificada por el tiempo y temperatura: 80°C; 30 min.

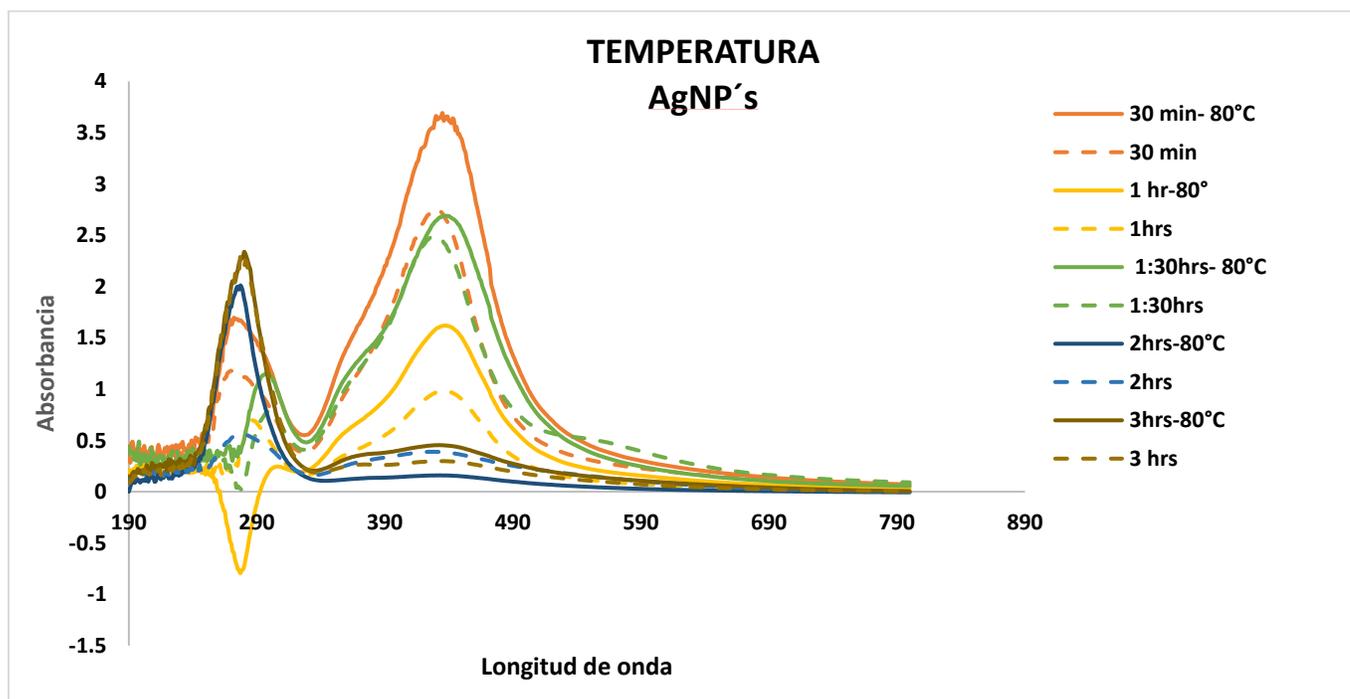


Tabla 2. Temperatura y tiempo de reacción por espectrofotometría de síntesis de AgNP's. Utilizando 4ml de extracto acuso de *Mangifera caesia jack ex wall*.

En la tabla 3, se muestra el efecto de la modificación del pH. Se observan picos entre 400 nm y 500nm, el pico máximo se presentó con un pH de 7 a las 2 y 3 hrs. La mejor condición de reacción fue la obtenida utilizando 2ml de extracto acuoso de mango, a 80°C y un pH de 7.

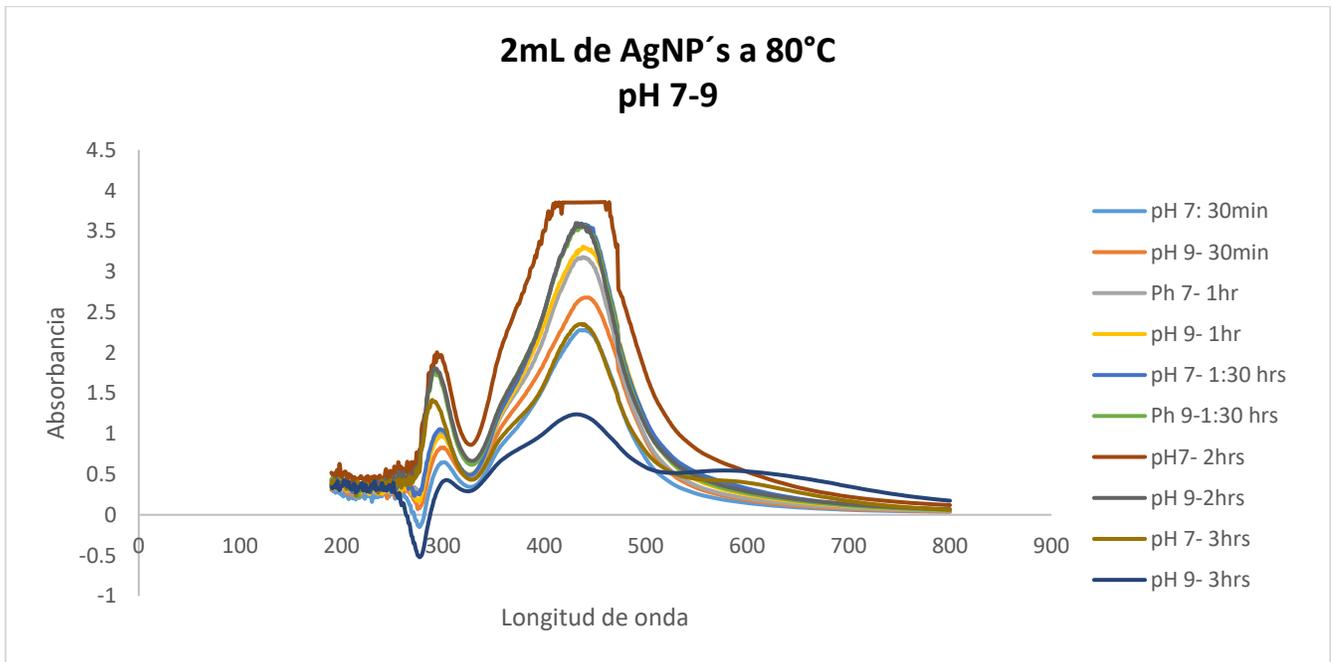


Gráfico 3. pH de reacción por espectrofotometría de síntesis de AgNP's. Modificación de pH7 y pH9.

Se determino la concentración bactericida de las AgNP's contra *E. faecalis*.

En la figura 1, se muestra un antibiograma por difusión de disco en el cual se utilizaron concentraciones de $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$ y $1:10^{-5}$ $\mu\text{g/ml}$. Las nanopartículas de plata mostraron actividad antimicrobiana directamente proporcional al aumento de concentración de las A AgNP's contra estos patógenos esto sugerido por la zona de inhibición. La concentración $1:10^{-1}$ $\mu\text{g/ml}$, tiene el mayor diámetro de inhibición.



Figura 1. Antibiograma por difusión de disco. AgNP's sintetizadas con 0.001M de AgNO_3 sobre *Enterococcus faecalis*. Se utilizaron cinco concentraciones diferentes de AgNPs: $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$ y $1:10^{-5}$ $\mu\text{g/ml}$

Dilución ($\mu\text{g/ml}$)	1:10-1	1:10-2	1:10-3	1:10-4	1:10-5
AgNP's	12 mm	10mm	8mm	8mm	6mm

Tabla 1. La concentración de $1:10^{-1}$ ($\mu\text{g/ml}$) tiene la mayor zona de halo de inhibición bacteriana (mm)

Se determino la concentración bactericida del quitosano contra *E. faecalis*.

En la figura 2, se muestra un antibiograma por difusión de disco en el cual se utilizaron concentraciones de $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$ y $1:10^{-5}$ $\mu\text{g/ml}$. El quitosano mostro actividad antimicrobiana directamente proporcional al aumento de concentración de quitosano contra estos patógenos esto sugerido por la zona de inhibición. La concentración $1:10^{-1}$ $\mu\text{g/ml}$., tiene la mayor zona de inhibición.



Figura 2. Antibiograma por difusión de disco. Quitosano 448869 sobre *E. faecalis*. Se utilizaron cinco concentraciones diferentes de quitosano: $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$ y $1:10^{-5}$ $\mu\text{g/ml}$.

Dilución ($\mu\text{g/ml}$)	1:10-1	1:10-2	1:10-3	1:10-4	1:10-5
Quitosano	9 mm	9mm	7mm	5mm	4mm

Tabla 2. Concentración de $1:10^{-1}$ ($\mu\text{g/ml}$) tiene la mayor zona de halo de inhibición bacteriana (mm)

Se evaluó el efecto bactericida de la combinación de las nanopartículas de plata y quitosano contra *Enterococcus faecalis*

En la figura 3, se muestra un antibiograma por difusión de disco en el cual se utilizaron concentraciones en combinación de $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$ y $1:10^{-5}$ $\mu\text{g/ml}$ de AgNP's. y quitosano. Se mostro actividad bactericida directamente proporcional al aumento de concentración de ambos nanomateriales contra *E. faecalis* esto sugerido por el diámetro del halo de inhibición bacteriano.

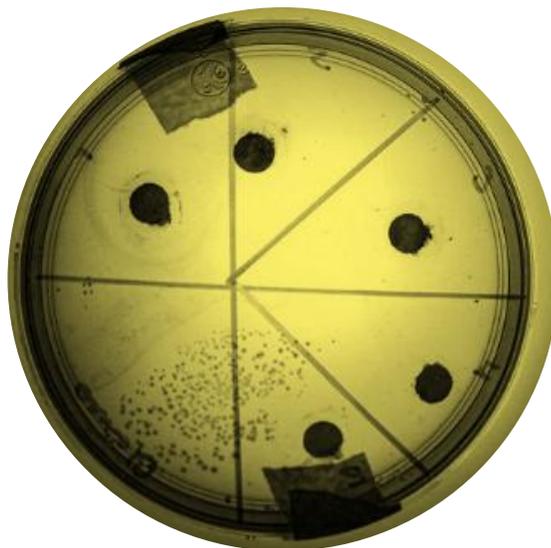


Figura 3. Antibiograma por difusión de disco, AgNP's sintetizadas con 0.001M de AgNO_3 y Chitosan 448869 sobre *E. faecalis*.

Dilución ($\mu\text{g/ml}$)	$1:10^{-1}$	$1:10^{-2}$	$1:10^{-3}$	$1:10^{-4}$	$1:10^{-5}$
AgNP's	12 mm	10mm	8mm	8mm	6mm
Quitosano	9 mm	9mm	7mm	5mm	4mm
AgNP's/Quitosano	19mm	14mm	13mm	10mm	8mm

La combinación de las nanopartículas mostro mayor efecto bactericida a concentración de $1:10^{-1}$ $\mu\text{g/ml}$ contra *E. faecalis*.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo de cada una de las variables estudiadas en estudio. En la evaluación, se describieron los halos de inhibición de las AgNP's, Quitosano, así como su interacción, de acuerdo con las 5 diluciones propuestas. La comparación de supuestos de los diferentes grupos de estudio, se realizó mediante la prueba Shapiro-Wilk con una significancia $p < 0.05$.

Todos los datos se expresaron en media aritmética con el error estándar de la media. Se realizó la comparación del promedio del halo de inhibición, en los diferentes grupos de estudio. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico Microsoft Excel 2018. La comparación entre los grupos, se realizó mediante un análisis de la varianza ANOVA de una vía. Los valores con una $p < 0.075$ se consideraron significativos. Todos los experimentos se realizaron cumpliendo con los requisitos de estudios experimentales de repetición, aleatorización y control.

VIII DISCUSIÓN

8.1 Estandarización de nanopartículas de plata a partir del extracto acuoso de semilla de mango

De acuerdo con lo reportado por Shujat et al. (año), la síntesis biológica de AgNP's a partir de plantas, frutas o desechos biológicos (cáscara o semillas), sin utilizar solventes tóxicos y productos químicos, se pueden obtener nanopartículas con acción bactericida. Según Serrato-Patiño et al., la semilla de mango como subproducto está generando un gran enfoque de investigaciones científicas, originando productos desarrollados a partir de semilla de mango (44).

Para nuestro estudio realizamos la síntesis de AgNP's a partir de extracto de semilla de mango, esta semilla contiene flavonoides; componentes que actúan promoviendo la formación de nanopartículas, reduciendo los iones de plata a átomos neutros, impidiendo su mayor crecimiento y aglomeración. Los grupos funcionales como grupos hidroxilo y aldehído, participan en la reducción de iones de plata, estabilizando la formación de AgNP's (Patil et al.). También contiene abundantes ácidos grasos como el ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmítico, el ácido linoleico (Jahurul et al.), la vitamina C (ácido ascórbico), y aminoácidos esenciales. (45)

En este estudio, el extracto acuoso de semilla de mango fue eficaz en la obtención de AgNP's, utilizando concentraciones de AgNO₃ de 0.001M. La reacción se controló mediante un cambio de color marrón visible registrado, este cambio de coloración sugiere la formación de nanopartículas de plata. La estandarización de las AgNP's requiere del monitoreo de la formación de estas en diferentes condiciones como el volumen de extracto de mango, el pH y la temperatura. En este estudio, se registraron los picos más altos a 400 y 450 nm con un volumen de 2, 4 y 6 mL de extracto, eligiendo un volumen de 2 mL como óptimo para la formación de AgNP's. Una vez obtenidas estas AgNP's, se consideraron cinco concentraciones con un rango de 1×10^{-1} – 1×10^{-5} µg/ml. (46)

8.2 Pruebas microbiológicas AgNP's, quitosano y su interacción

La obtención de AgNP's a partir de extractos frutas y plantas puede catalizar la descomposición del etileno, inhibiendo con éxito el crecimiento bacteriano. Algunos estudios han investigado la preparación de materiales compuestos de revestimiento antibacteriano utilizando nanomateriales (Lan et al.). Xing et al. revisó la preparación, las propiedades antibacterianas y los mecanismos de las AgNP's sintetizadas a partir de diferentes plantas, exhibiendo una actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, destacando que la principal bacteria causante de las re-infecciones endodónticas es una bacteria Gram positiva, por lo que la viabilidad como tratamiento para pacientes con estos padecimientos bucodentales es alta. (Xing et al). Se ha informado en previos estudios *in vitro*, que las nanopartículas tienen una mayor actividad antibacteriana, debido a la mayor superficie que permite lograr un mayor grado de interacción con la superficie cargada negativamente de las células bacterianas. (47)

En este trabajo, en la prueba microbiológica con la cepa *E. faecalis*, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el halo de inhibición con las diferentes concentraciones de AgNP's. Este hallazgo contrasta con Dastan et al quienes mostraron que al aumentar la concentración de AgNP's mejoraba el efecto antibacteriano. Sin embargo, estas propiedades pueden verse afectadas por la concentración del agente reductor y estabilizador (extracto acuoso de mango), lo que a su vez afecta el efecto antibacteriano de las AgNP's.

Por otro lado, el quitosano, un polímero biodegradable cuyas propiedades fisicoquímicas y de biocompatibilidad, han permitido utilizarlo en diversas terapias médicas. Previamente, Shankar et al. indicó que las membranas compuestas de quitosano mostraron una fuerte actividad antibacteriana contra *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, y *Aspergillus niger*. (48)

IX CONCLUSIÓN

Previamente se ha descrito que el quitosano exhibe actividad antimicrobiana contra una variedad de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y algunos virus. Se cree que esta actividad se debe a la interacción del quitosano con la membrana celular de los microorganismos, lo que puede provocar la ruptura de la membrana y la muerte celular. (49)

Nuestra propuesta fue generar la interacción in vitro de las nanopartículas de plata y quitosano, como estrategia terapéutica contra *E. faecalis*. Este estudio determinó que la interacción del quitosano y de las AgNP's, mantienen sus propiedades antimicrobianas contra *E. faecalis*.

X REFERENCIAS

1. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. Vol. 25, *Molecules*. 2020.
2. Bonilla-Represa V, Abalos-Labruzzo C, Herrera-Martinez M, Guerrero-Pérez MO. Nanomaterials in dentistry: State of the art and future challenges. Vol. 10, *Nanomaterials*. 2020.
3. Sharma D, Kanchi S, Bisetty K. Biogenic synthesis of nanoparticles: A review. Vol. 12, *Arabian Journal of Chemistry*. 2019.
4. Raura N, Garg A, Arora A, Roma M. Nanoparticle technology and its implications in endodontics: a review. Vol. 24, *Biomaterials Research*. 2020.
5. Fernando S, Gunasekara T, Holton J. Antimicrobial Nanoparticles: applications and mechanisms of action. *Sri Lankan Journal of Infectious Diseases*. 2018;8(1).
6. Allaker RP, Memarzadeh K. Nanoparticles and the control of oral infections. Vol. 43, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2014.
7. Sánchez A. Uso, abuso y mal uso de los antibióticos. *Revista Enfermería CyL*. 2019;11(1).
8. Crispín Pérez V. Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Cienc Invest*. 2019;11(2).
9. Maria Teresa Pérez Gracia. Resistencia bacteriana a los antibióticos . 2021.
10. Alghamdi F, Shakir M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus*. 2020;
11. Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 2021.
12. Khanra K, Panja S, Choudhuri I, Chakraborty A, Bhattacharyya N. Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticle synthesized from root extract of *Asparagus Racemosus*. *Nano Biomed Eng*. 2016;8(1).
13. Bazán Suarez AK, Monjarás Avila AJ, Balderas Delgado C, Molina Trinidad EM. Uso y aplicación de Nanopartículas de plata en Odontología. *Educación y Salud Boletín Científico Instituto de Ciencias de la Salud Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*. 2020;8(16).
14. Yudaev P, Chuev V, Klyukin B, Kuskov A, Mezhuev Y, Chistyakov E. Polymeric Dental Nanomaterials: Antimicrobial Action. Vol. 14, *Polymers*. 2022.
15. Acevedo-Contreras A, Acosta-Torres LS, Morales- Zavala CA, Castaño Meneses VM. Citotoxicidad y efecto antifúngico de nanopartículas de plata para uso de odontológico. *Mundo Nano Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*. 2014 Mar 10;5(9).
16. Thaya R, Vaseeharan B, Sivakamavalli J, Iswarya A, Govindarajan M, Alharbi NS, et al. Synthesis of chitosan-alginate microspheres with high antimicrobial and antibiofilm activity against multi-drug resistant microbial pathogens. *Microb Pathog*. 2018;114.
- M K. Chitosan-Properties and Applications in Dentistry. *Adv. Tissue Eng. Regen. Med*. 2017;2(4): 205-211.
17. Jayash SN, Hashim NM, Misran M, Baharuddin NA. In vitro evaluation of osteoprotegerin in chitosan for possible applications in bone defects applications. *PeerJ*. 2016;(4).
18. Sánchez A, Sibaja M, Vega J, Rojas M. Utilización de soportes de hidrogel de quitosano obtenidos a partir de desechos del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) para el crecimiento “in vitro” de fibroblastos humanos. *Rev. Iberoam. Polim*. 2007;8(5): 347-362.
19. Ribeiro JS, Münchow EA, Ferreira EA, Wellington O, Bottino MC. Antimicrobial Therapeutics in Regenerative Endodontics: A Scoping Review. *J. Endod*. 46(9S): S115–S127.
20. Aydin ZU, Akpinar KE, Hepokur C, Erdönmez D. Evaluation of the toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan, and propolis in fibroblast cells. *Braz. Oral Res*. 2018;32.
21. Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr Res*. 2004 Nov 15;339(16):2693–700.
22. Divya K, Jisha MS. Chitosan nanoparticles preparation and applications. Vol. 16, *Environmental Chemistry Letters*. 2018.
23. Applications of Chitosan in Dentistry. *Indian J Public Health Res Dev*. 2020;
24. Roberto Vazquez Muñoz. Evaluación de las interacciones entre las nanopartículas de plata y microorganismos patógenos. [Ensenada, Baja California]: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior; 2017.
25. Zhao W, Karp JM, Ferrari M, Serda R. Bioengineering nanotechnology: Towards the clinic. Vol. 22, *Nanotechnology*. 2011.

26. Fernando Notario-Pérez AMIRCLRRC and MDV. Applications of Chitosan in Surgical and Post-Surgical Materials. Marine biomaterials with surgical applications . 2022 Jun;
27. Zienkiewicz- z łk , D ł -Marczewska A, Skorik YA, Petrova VA, Choma A, Komaniecka I. Silver nanoparticles on chitosan/silica nanofibers: Characterization and antibacterial activity. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1).
28. Arias-Alvarado F, Iriarte MR, Jordan-Mariño F, Quijano-Guauque S, Pérez LD, Baena Y, et al. Experimental Solution of Chitosan and Nanochitosan on Wettability in Root Dentin: Previous In Vitro Model of Regenerative Endodontics. *Int. J. Biomater.* 2021;2021.
29. Eftekhari R, Alam M, Tavakolizadeh S, Abbasi K. The Role of Biomaterials and Biocompatible Materials in Implant-Supported Dental Prosthesis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2021;3349433.
30. Mooduto L, Wahjuningrum DA, Agatha Prita A, Lunardi CG. Microbiol. Antibacterial effect of chitosan from squid pens against *Porphyromonas gingivalis* bacteria. *Iran. J. Microbiol.* 2019;11(2): 177–180.
31. Celikten B, Amasya G, Oncu A, Koohnavard M, Saklar F. Effects of chitosan-containing silver nanoparticles or chlorhexidine as the final irrigant on the bond strength of resin-based root canal sealers. *J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospects.* 2022;16(2): 118-122.
32. Supotngarmkul A, Panichuttra A, Ratisoontorn C, Nawachinda M, Matangkasombut O. Antibacterial property of chitosan against *E. Faecalis* standard strain and clinical isolates. *Dent. Mater. J.* 2020;39(3): 456–463.
33. Yadav P, Chaudhary S, Saxena RK, Talwar S, Yadav S. Evaluation of Antimicrobial and Antifungal efficacy of Chitosan as endodontic irrigant against *Enterococcus Faecalis* and *Candida Albicans* Biofilm formed on tooth substrate. *J. Clin. Exp. Dent.* 2017;9(3): 361-367.
34. Soares DG, Anovazzi G, Bordini EAF, Zuta UO, Silva Leite MA, Basso FG, et al. Biological Analysis of Simvastatin-releasing Chitosan Scaffold as a Cell-free System for Pulp-dentin Regeneration. *J. Endod.* 2018;44(6): 971-976.
35. Shenoi PR, Morey ES, Makade CS, Gunwal MK, Khode RT, Wanmali SS. In vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of chitosan and other endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Gen. Dent.* 2016;64(5): 60–63.
36. Zhou H, Li Q, Wei L, Huang S, Zhao S. A comparative scanning electron microscopy evaluation of smear layer removal with chitosan and MTAD. *Niger. J. Clin. Pract.* 2018; 21(1): 76-80.
37. Moraes G, Zambom C, Siqueira WL. Nanoparticles in Dentistry: A Comprehensive Review. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021;14(8): 752.
38. Thaya R, Vaseeharan B, Sivakamavalli J, Iswarya A, Govindarajan M, Alharbi NS, et al. Synthesis of chitosan-alginate microspheres with high antimicrobial and antibiofilm activity against multi-drug resistant microbial pathogens. *Microb. Pathog.* 2018;114: 17-24.
39. Chen IH, Lee TM, Huang CL. Biopolymers Hybrid Particles Used in Dentistry. *Gels.* 2021;7(1): 31.
40. Raura N, Garg A, Arora A, Roma M. Nanoparticle technology and its implications in endodontics: a review. *Biomater. Res.* 2020;24(1): 21.
41. Khrunyk Y, Lach S, Petrenko I, Ehrlich H. Progress in Modern Marine Biomater. *Res. Mar. Drugs.* 2020;18(12): 589.
42. Notario-Pérez F, Martín-Illana A, Cazorla-Luna R, Ruiz-Caro R, Veiga MD. Applications of Chitosan in Surgical and Post-Surgical Materials. *Mar. Drugs.* 2022;20(6): 396.
43. Piemjai M, Santiwarapan P. An Enamel Based Biopolymer Prosthesis for Dental Treatment with the Proper Bond Strength and Hardness and Biosafety. *Polymers (Basel).* 2022;14(3): 538.
44. Khan F, Nguyen Pham DT, Folarin-Oloketuyi S, Manivasagan P, Oh Junghwan, Kim-Mog Y. Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 2020;(185).
45. Thangavelu A, Stelin KS, Vannala V, Mahabob N, Bin Hayyan FM, Sundaram R. An Overview of Chitosan and Its Role in Periodontics. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2021;(18): S15–S18.
46. De la Fuente-Hernández J, Álvarez-Pérez MA, Sifuentes-Valenzuela MC. Uso de nuevas tecnologías en odontología. *Rev. Odont. Mex.* 2011; 15(3): 157-162.
47. Sanap P, Hegde V, Ghunawat D, Patil M, Nagaonkar N, Jagtap V. Current applications of chitosan nanoparticles in dentistry: A review. *Intern. J. Appl. Dent. Scienc.* 2020;6(4): 81–84.
48. Nimbeni SB, Nimbeni BS, Divakar DD. Role of Chitosan in Remineralization of Enamel and Dentin: A Systematic Review. *Int. J. Appl. Dent. Sci.* 2021;14(4): 562-568.
49. Katsarov P, Shindova M, Lukova P, Belcheva A, Delattre C, Pilicheva. Based Micro- and Nanosized Drug Delivery Systems for Potential Application in the Pediatric Dentistry. *Polymers.* 2021;13(19): 3342.

XI ANEXOS

12.1 Formatos, cuestionarios, encuestas, etc

Oficio aprobación CEI-ICSa



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias de la Salud
Institute of Medical Sciences
Coordinación de Investigación
Area of Research

San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo a 20 de marzo de 2023
Oficio Comité de Ética e Investigación (CEI-ICSa) n.º 172 x / 2023

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN.

Islas Granillo Horacio
Investigador Principal
Correo: na286943@uaeh.edu.mx

PRESENTE

Título del Proyecto: Efecto de la actividad bactericida de las nanopartículas de plata y quitosano contra Enterococcus Faecalis in vitro.

Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto de Ciencias de la Salud y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:

Decisión
Aprobado

Este protocolo tiene vigencia del 20 de marzo de 2023 al 20 de marzo de 2024.

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso de avance de su proyecto al menos 60 días antes de la fecha de término de su vigencia.

Le rogamos atender las indicaciones realizadas por el revisor, y enviar nuevamente una versión corregida de su protocolo para una nueva evaluación.

Atentamente

Dra. Itzia María Cazares Palacios
Presidenta del Comité



Para la validación de este documento, informe al siguiente código en la sección Validador de documentos del sitio web del Comité de Ética e Investigación del Instituto de Ciencias de la Salud: «4E37r3dJr»
<https://files.google.com/ynw6tmmfere-icsa/validador-de-documentos>



Ciudad de Hacienda La Concepción s/n
Carretera Pachuca Actopan, San Agustín
Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160
Teléfono: 52 (773) 71 726 00 Ext. 4308.
investigacion_icsa@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

Artículo: Biological effects of chitosan in Dentistry



<https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/MJMR/issue/archive>

Mexican Journal of Medical Research ICSa

Biannual Publication, Vol. 11, No. 22 (2023) 36-40



ISSN: 2007-5235

Biological effects of chitosan in Dentistry Efectos biológicos del quitosano en Odontología

Elizabeth Nava-Juárez ^a

Abstract:

Current research in the world has focused on biomaterials studies in the medical area, leaving an emerging research model in dentistry, with little information available. In this sense, there are several biomaterials with potential to be used in various areas of dentistry, mainly in endodontics. Chitosan is a versatile biomaterial from its production to its multiple properties, applications and benefits; it is a biomolecule with an average molecular weight of 100 to 500 kDa, obtained from the exoskeleton of arthropods such as crabs, shrimp, lobsters and mollusks (squid, oysters, cuttlefish). Its chemical structure is similar to that of cellulose, formed by amino and hydroxyl functional groups in its polymeric structure, soluble in aqueous media. Several studies have considered it a safe product for biomedical use. It is currently used in the food industry for its fat absorption capacity, helping in weight loss for the control of overweight-obesity, as well as in food preservation, cosmetics manufacturing, antioxidants, among others. Some of its properties in the medical area include its potent bactericidal, hemostatic and tissue regenerative effect. Giving better results thanks to its great properties of biocompatibility, biodegradability, low toxicity and great antimicrobial potential. However, more clinical studies are needed to know its benefits and what its use implies in the clinical area. Therefore, this manuscript aims to provide existing information on chitosan for the research and development of new, safer and more effective dental materials.

Keywords:

Chitosan, chitin, nanoparticles, dentistry

Resumen:

La investigación actual en el mundo se ha centrado en estudios de biomateriales en el área médica, dejando un modelo de investigación emergente en odontología, con poca información disponible. En este sentido, existen varios biomateriales con potencial para ser utilizados en diversas áreas de la odontología, principalmente en endodoncia. El quitosano es un biomaterial versátil desde su producción hasta sus múltiples propiedades, aplicaciones y beneficios; es una biomolécula con un peso molecular medio de 100 a 500 kDa, que se obtiene del exoesqueleto de artrópodos como cangrejos, gambas, langostas y moluscos (calamares, ostras, sepias). Su estructura química es similar a la de la celulosa, formada por grupos funcionales amino e hidroxilo en su estructura polimérica, soluble en medios acuosos. Varios estudios lo han considerado un producto seguro para uso biomédico. Actualmente se utiliza en la industria alimentaria por su capacidad de absorción de grasas, ayudando en la pérdida de peso para el control del sobrepeso-obesidad, así como en la conservación de alimentos, fabricación de cosméticos, antioxidantes, entre otros. Algunas de sus propiedades en el área médica incluyen su potente efecto bactericida, hemostático y regenerador de tejidos. Dando mejores resultados gracias a sus grandes propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad y gran potencial antimicrobiano. Sin embargo, son necesarios más estudios clínicos para conocer sus beneficios y lo que implica su uso en el área clínica. Por ello, el presente manuscrito pretende aportar la información existente sobre el quitosano para la investigación y desarrollo de nuevos materiales dentales más seguros y eficaces.

Palabras Clave:

Quitosano, quitina, nanopartículas, odontología

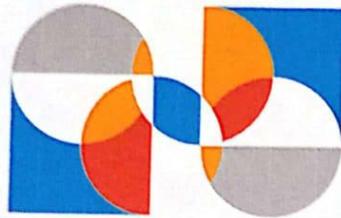
INTRODUCTION

In the last decade, advances in the scientific and healthcare fields have increased the quality of medical and dental care, mainly in terms of the techniques, protocols and materials used. This has

^a Corresponding author, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, <https://orcid.org/0000-0002-7928-4290>, Email: elizabeth_nava@uaeh.edu.mx



Feria Internacional de la Salud



FIS Feria Internacional de la Salud
2023



La Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Otorga el presente

CONSTANCIA

a

Elizabeth Nava Juárez

Por su participación en modalidad de póster en el XII Foro de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud con el tema "Efecto de la actividad bactericida de las nanopartículas de plata y quitosano contra *Enterococcus Faecalis* in vitro"

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Pachuca, Hidalgo; 23 – 24 de mayo de 2023.

MC Esp. Luis Carlos Romero Quezada
Jefe del Área Académica de Medicina

Dra. Rebeca María Elena Guzmán Saldaña
Directora del ICSa





ACM III

CARTA RESPONSIVA PARA PERMANECER EN LOS LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN IBT-ITA

DATOS DEL PROFESOR(A)		Profesor(a) de tiempo completo <input checked="" type="checkbox"/>	Profesor(a) de asignatura <input type="checkbox"/>
Nombre: José Luis Rivera Corona		Correo institucional: jr corona@upemor.edu.mx	
Teléfono: 229 35 33			
Nombre del proyecto: Compositos de ANP's y Quiturano con aplicaciones odontológicas			
DATOS DEL USUARIO			
Nombre: Elizabeth Nava Juárez			
Periodo de estancia: 18 Jul 23 - 25 Agosto 23	Horario: 09:00 - 17:00	Laboratorio o laboratorios*: LAB 05	
Alumno UPEMOR <input type="checkbox"/>	Alumno de otra institución <input type="checkbox"/>	Especificar: Maestría Ciencias Biomedicas UAEM	
Matricula: 286943	Carrera: Maestría en Ciencias Biomedicas	Cuatrimestre/Grupo: 201	
Teléfono: 771 124 7872	Correo institucional: na286943@uach.edu.mx		
Padecimientos crónicos: Ninguno			
Datos de un contacto en caso de emergencia: Genoveva Juárez Hingosa		Teléfono: 744 208 33 45	

Proyecto <input checked="" type="checkbox"/>	Estancia <input type="checkbox"/>	Estadio <input type="checkbox"/>	Servicio social <input type="checkbox"/>	Otros <input type="checkbox"/>
Equipos específicos que utilizará: Espectro fotométrico Estufas.				
Firma del Profesor		Nombre y firma de la Dirección Académica Leticia Méndez Zamora		
Firma del alumno		Nombre y firma del supervisor de vigilancia		
Nombre y firma del Técnico de Apoyo responsable María Guadalupe Durán Escobedo				

ESTA CARTA ES DE CONTROL INTERNO DE LOS LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN IBT-ITA

UPEMOR
18 JUL 2023
RECIBO
Laboratorio de Investigación de Biotecnología Industrial
Dr. K. Díaz