



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Odontología
Centro de Investigación y Estudios Avanzados en
Odontología “Dr. Keisaburo Miyata”

Caracterización, citotoxicidad y efecto antibacteriano de
nanopartículas poliméricas cargadas con antibióticos
y antisépticos de uso odontológico

TESIS

Para obtener el Grado de
Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

M.C.O Alejandra Itzel López Flores

Director

Dr. en C.S. Ulises Velázquez Enríquez

Co-director

Dr. en O. Rogelio José Scougall Vilchis

Tutora

Dra. en C. Laura Susana Acosta Torres

Toluca, Estado de México, diciembre 2025



ÍNDICE

No.	Contenido	Pág.
	Resumen	5
1	Antecedentes	7
	1.1 Concepto de caries dental	7
	1.2 Caries en el esmalte (incipiente)	7
	1.3 Concepto biopelícula	8
	1.4 Características y composición de una biopelícula	8
	1.5 Formación de una biopelícula	9
	1.6 Composición estructural y bacteriana de una biopelícula	9
	1.7 Biopelícula presente en el tratamiento de ortodoncia en la cavidad oral	10
	1.8 <i>Streptococcus mutans</i>	11
	1.9 Biopelículas presentes en el tratamiento de conductos en la cavidad oral	11
	1.10 <i>Enterococcus faecalis</i>	11
	1.11 Irrigantes en endodoncia	12
	1.12 Propiedades de un irrigante ideal	12
	1.12.1 Hipoclorito de sodio	12
	1.12.2 Clorhexidina	13
	1.12.3 Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	13
	1.13 Diferencias entre los irrigantes dentales	14
	1.14 Terapia antibiótica a nivel sistémico en endodoncia	14
	1.15 Terapia antibiótica a nivel local en endodoncia	14
	1.16 Terapia antibiótica intraconducto	14
	1.17 Pasta triple antibiótica	15
	1.18 Agentes remineralizantes	16
	1.19 Sistemas adhesivos utilizados en ortodoncia	17
	1.20 Nanotecnología	19
	1.21 Aplicaciones de la nanotecnología en odontología	19
	1.22 Nanopartículas orgánicas biodegradables	19
	1.23 Nanopartículas de quitosano (CHNPs)	20

1.24	Nanopartículas de PLGA	21
2	Planteamiento del problema	22
3	Justificación	24
4	Hipótesis	26
	4.1 Fase 1	26
	4.2 Fase 2	26
5	Objetivos	27
	5.1 Fase 1	27
	5.2 Fase 2	28
6	Materiales y métodos	29
	6.1 Fase 1	29
	6.1.1 Diseño de estudio	29
	6.1.2 Universo	29
	6.1.3 Muestra	29
	6.1.4 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	29
	6.1.5 Variables de estudio	30
	6.1.6 Procedimiento	31
	6.2 Fase 2	40
	6.2.1 Diseño de estudio	40
	6.2.2 Universo	40
	6.2.3 Muestra	40
	6.2.4 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	40
	6.2.5 Variables de estudio	41
	6.2.6 Procedimiento	42
	6.7 Consideraciones bioéticas	50
	6.8 Análisis estadístico	51
7	Resultados	52
8	Artículo: Resumen/Abstrac	54
9	Discusión	57

	9.1 Fase 1	57
	9.2 Fase 2	61
10	Conclusiones	66
	10.1 Fase 1	66
	10.2 Fase 2	67
11	Referencias	68

Resumen

Fase 1

Introducción: El uso de sistemas adhesivos en ortodoncia se ha convertido en el “gold estándar” para la cementación de brackets; sin embargo, la acumulación de biofilm y el exceso de adhesivo durante la cementación contribuyen a la formación de lesiones de mancha blanca. Modificar estos adhesivos con nanopartículas de PLGA abriría la posibilidad de mejorar sus propiedades biológicas.

Objetivo: Desarrollar PLGA-NPs cargadas con agentes antisépticos, aplicadas en un adhesivo de uso ortodóntico, para incrementar su efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* y evaluar su citotoxicidad en fibroblastos gingivales

Metodología: Se sintetizaron PLGA-NPs cargadas con clorhexidina (CHx) y quitosano (CH), y se analizaron por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de barrido (SEM), y por espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis). Se evaluó la concentración mínima inhibitoria mediante ensayos de difusión en agar y de microdilución, y se realizó un ensayo de citotoxicidad para establecer la dosis citotóxica media (CC50).

Resultados: Las PLGA-NPs mostraron una inhibición bacteriana que osciló en 54.05 % y 74.25 % y una CC50 de 3.75 µg/mL inmersas en el adhesivo y de 15 µg/mL en su forma libre. Las PLGA-NPs-CHx mostraron un mayor efecto antibacteriano, con una inhibición que osciló entre el 89.38 % y el 73.75 % y una CC50 utilizando 0.93 µg/mL, tanto en su forma libre como en el adhesivo. Las PLGA-NPs-CH mostraron un fuerte efecto en el ensayo de difusión en agar, con una inhibición del 83.11 % al 69.39 % y una CC50 de 1.87 µg/mL inmersas en el adhesivo y 7.5 µg/mL en su forma libre.

Conclusiones: Este estudio revela que las PLGA-NPs son un excelente vehículo en la administración de fármacos debido a que presentan una baja citotoxicidad y un buen efecto antibacteriano en *Streptococcus mutans* con un gran potencial para ser aplicadas mejorando las propiedades biológicas de los sistemas adhesivos.

Fase 2

Introducción: El uso de nanopartículas de quitosano (CHNPs) cargadas con antibióticos, aplicadas como irrigantes en endodoncia, ofrece una combinación única, demostrando actividad antibacteriana eficaz y baja toxicidad.

Objetivo: Desarrollar CHNPs cargadas con metronidazol, ciprofloxacino y minociclina, aplicadas como irrigantes endodónticos, para mejorar su actividad antibacteriana frente a *Enterococcus faecalis* y evaluar su citotoxicidad en células madre de pulpa dental humana (hDPSCs).

Metodología: Las CHNPs cargadas con antibióticos fueron sintetizadas y analizadas mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis). Se realizaron ensayos de difusión en agar y de microdilución para determinar la concentración mínima inhibitoria y un ensayo de citotoxicidad para establecer la dosis citotóxica media (CC50).

Resultados: Se identificaron picos correspondientes a los grupos funcionales de la estructura química del complejo quitosano-antibiótico. Las CH-NPs-Ciprofloxacino mostraron una mayor actividad antibacteriana frente a *Enterococcus faecalis*, tanto en ensayos de difusión en agar como en ensayos de microdilución. Las CH-NPs-Metronidazol presentaron una menor citotoxicidad frente a las hDPSC. Las CH-NPs-Minociclina mostraron un efecto antibacteriano superior al del quitosano en su forma simple en los ensayos de microdilución, aunque presentaron una mayor citotoxicidad.

Conclusiones: Actualmente, los irrigantes a base de nanopartículas de quitosano constituyen una alternativa con mejores propiedades farmacológicas y un excelente efecto antibacteriano.

1. Antecedentes

1.1 Concepto de caries dental

La caries dental es una enfermedad dinámica y multifactorial, regulada por la dieta y la formación de una biopelícula de origen polibacteriano, ya que el lipopolisacárido capsular, el ácido lipoteicoico y los subproductos bacterianos tienen la capacidad de penetrar el esmalte a través de los túbulos dentinarios, desencadenando una respuesta inflamatoria. Las lesiones incipientes de caries comienzan con la aparición de una mancha blanca en el esmalte, expresando un proceso de desmineralización latente, exponiendo la dentina a la invasión bacteriana a través de los túbulos dentinarios y la circulación sanguínea. La pulpa responde inicialmente mediante una respuesta inmunológica innata; si la agresión no es eliminada, se activa la inmunidad celular, lo que desencadena una inflamación pulpar. Sin un tratamiento oportuno, las bacterias pueden colonizar y provocar una necrosis por descomposición séptica del tejido pulpar, destruyendo la microvasculatura, las fibras nerviosas y el sistema linfático, y deteniendo los procesos metabólicos de la pulpa (1–6).

La inflamación comienza principalmente en el tejido pulpar, progresando hacia el ápice. La ausencia de una adecuada circulación sanguínea, sumada a la rigidez estructural de la dentina, favorece un entorno óptimo para una rápida evolución de una pulpitis hacia una necrosis pulpar, y su expresión varía según el tipo de lesión (7,8).

1.2 Caries en el esmalte

Actualmente la formación de caries dental se encuentra relacionada con la agresión ácida de una biopelícula bacteriana y con la estructura dental. Las lesiones en el esmalte se manifiestan clínicamente como lesiones de mancha blanca y se describen como “pigmentaciones de color blanquecino o grisáceo, pequeñas en la superficie del esmalte”. Su prevalencia aumenta considerablemente en el tratamiento de ortodoncia ya que la colocación de aparatología fija dificulta la higiene, reportando una incidencia postortodóntica del 96 %; las superficies que

expresan ser las m{as afectadas son las caras vestibulares alrededor de los brackets y superficies gingivales; determinando un mayor porcentaje de incidencia en los incisivos laterales (34 %), caninos (31 %), premolares (28 %) e incisivos centrales (17 %) sin embargo, también existen otros factores que favorecen su formación incluyendo la dieta, los factores genéticos y la composición de la saliva. Clínicamente, las lesiones de mancha blanca se pueden observar a partir de la segunda semana de formación y establecimiento de la biopelícula bacteriana, destacando la importancia de implementar ciertas medidas de prevención específicas para minimizar su desarrollo (7–12).

1.3 Concepto de biopelícula

Fue descrita por primera vez por Van Leeuwenhoek como una comunidad estructural bacteriana de origen multicelular, en la que los microorganismos que la conforman se encuentran inmersos en una sustancia polimérica extracelular, generando productos de desecho y moléculas señalizadoras (13–15).

1.4 Características y composición de una biopelícula

Los componentes orgánicos que rodean a los microorganismos bacterianos en una biopelícula son principalmente carbohidratos, proteínas, lípidos y de origen inorgánico son el calcio, fósforo, magnesio y fluoruro (4,16).

Es importante destacar que las bacterias que se encuentran presentes en una biopelícula expresan una capacidad por sobrevivir a las distintas condiciones de crecimiento que hay en la cavidad oral y factores ambientales, esta capacidad se debe a que:

- La estructura de la biopelícula es capaz de permitir el intercambio de nutrientes entre las células, favoreciendo la coexistencia de la misma especie.
- Tienen una buena capacidad de intercambiar material genético (4,17).

1.5 Formación de una biopelícula

Los tres componentes principales involucrados en la formación de una biopelícula de origen bacteriano son: células bacterianas, una matriz orgánica y una superficie sólida donde establecerse; estos se dividen en etapas y, dentro de estas, en fases (2,18).

Etapa 1/Formación de una capa acondicionante: Absorción de moléculas inorgánicas y orgánicas sobre una superficie sólida (esmalte-dentina, superficie gingival y epitelial), ya que durante la formación de esta placa la superficie de los dientes se encuentra acondicionada por la saliva (2,18).

Etapa 2/ Adhesión bacteriana: adhesión de las bacterias directamente sobre los órganos dentarios. Esta se divide en 3 fases:

- Formación de la biopelícula: las distintas especies bacterianas se adhieren al sustrato mediante fimbrias o flagelos.
- Fase inicial de adherencia microbiana-sustrato: se comienzan a formar uniones químicas a través de enlaces electrostáticos, enlaces covalentes, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares e interacciones hidrofóbicas.
- Fase de adherencia microbiana específica al sustrato: adhesión bacteriana específicamente sobre el sustrato (2,20).

Etapa 3/Crecimiento bacteriano: Las microcolonias que lograron establecerse sobre el sustrato atraen a bacterias colonizadoras secundarias, dando lugar a una biopelícula madura (2,18).

1.6 Composición estructural y bacteriana de una biopelícula

La estructura de una biopelícula bacteriana se encuentra conformada por una matriz extracelular compuesta por polisacáridos, ADN extracelular, proteínas, glicoproteínas, fosfolípidos y biopolímeros catiónicos, los cuales proporcionan protección y soporte estructural a la comunidad bacteriana (19).

Algunas de las bacterias reportan una mayor incidencia a nivel incluyen especies de los géneros *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Enterococcus*, reconocidas por su capacidad para formar comunidades estructuradas que contribuyen significativamente a la persistencia de infecciones crónicas en el contexto clínico (20).

1.7 Biopelícula presente en el tratamiento de ortodoncia en la cavidad oral

La colocación de la aparatología fija específicamente el proceso de cementación de brackets desencadena alteraciones tanto cuantitativas como cualitativas en la composición de la microbiota bucal. Específicamente, *Streptococcus mutans* es destacado como uno de los principales agentes causales en la formación de lesiones de mancha blanca en el esmalte, debido a su capacidad para producir ácido láctico, una alta tolerancia a ambientes ácidos y su interacción con otros microorganismos para establecer una biopelícula polibacteriana. Principalmente, brackets y su área periférica conforman parte de los sitios propicios para su desarrollo, dado que presentan una superficie irregular que favorece el rápido crecimiento de la biopelícula bacteriana (21,22).

Los *Streptococcus*, como colonizadores primarios, cuentan con proteínas receptoras en su superficie, llamadas adhesinas, la cual les permite interactuar con la saliva, la matriz extracelular y las células del huésped, conformando un paso esencial para la colonización. La matriz polimérica extracelular regula parte de la adaptación bacteriana a través de la adherencia superficial y la adhesión intercelular, formando un ambiente rico en nutrientes a través de un pH que promueve la formación de ecosistemas mediante interacciones electrostáticas adhesina-receptor específicas (23–25).

1.8 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)

Actualmente existen más de 100 especies reconocidas de *Streptococcus*, la palabra *Streptococcus* proviene del griego *strepto* (retorcido) y *coccus* (esférico), su clasificación se basa en el esquema de Lancefield, dicha clasificación se encarga de enfatizar y agrupar las cepas de *estreptococos* según su composición de carbohidratos presentes en su pared celular. Específicamente, *S. mutans* es una bacteria grampositiva, anaerobia facultativa asociada como uno de los principales agentes etiológicos en la formación de procesos cariosos debido a su capacidad de metabolizar la sacarosa y generar polisacáridos extracelulares (26).

1.9 Biopelículas presentes en el tratamiento de conductos en la cavidad oral

La progresión de la caries a través de los túbulos dentinarios es una de las principales vías de invasión bacteriana hacia la pulpa, englobando al tejido pulpar remanente y al exudado bacteriano que discurre hasta el foramen apical. Las biopelículas de origen endodóntico se clasifican en:

- Biopelículas intraconducto
- Biopelículas extrarradiculares
- Biopelículas periapicales
- Infecciones centradas en biomateriales (2,27).

1.10 *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)

Esta bacteria se encuentra principalmente como parte de los conductos radiculares en procesos cariosos profundos y es considerada uno de los agentes etiológicos principales en el fracaso en el tratamiento de los conductos, debido a la habilidad que posee para sobrevivir en un ambiente con escasos nutrientes y en un pH alcalino. Su alto potencial patógeno se debe principalmente a su gran capacidad para formar una biopelícula endodóntica, ya que está relacionada con el 65% de las infecciones bacterianas y es 1000 veces más resistente a los antibióticos (28,29).

1.11 Irrigantes en endodoncia

La irrigación en endodoncia se ha definido como un “lavado en estado líquido que facilita la introducción de agentes químicos con propiedades antibacterianas, en conjunto con la instrumentación mecánica, es capaz de disolver el material orgánico presente dentro de los conductos radiculares”. Entre los irrigantes más comunes se encuentran la clorhexidina (CHx), agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el hipoclorito de sodio (NaOCl) (29,32).

1.12 Propiedades de los irrigantes en endodoncia

Algunos requisitos que deben cumplir los irrigantes endodónticos para considerarse ideales en sus propiedades fisicoquímicas son los siguientes:

- Amplio espectro y capacidad adecuados para inactivar endotoxinas y ácidos lipoteicoicos que se encuentran presentes en la biopelícula.
- Buena capacidad de disolución del tejido pulpar.
- Expresar los menores efectos adversos de forma local (en la dentina y tejidos periapicales) ni sistémicamente (toxicidad, reacciones alérgicas).
- Bajo costo y alta disponibilidad (30).

1.12.1 Hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio es el irrigante más utilizado en endodoncia, ya que tiene la capacidad de disolver tejidos orgánicos mediante la oxidación e hidrólisis de proteínas. Sin embargo, se ha reportado que presenta ciertas desventajas al ser aplicado, algunas de ellas son:

- Alta citotoxicidad por extrusión accidental a través del foramen apical, causando hemólisis, inhibición de la migración de neutrófilos y daño a células endoteliales y fibroblásticas e incluso necrosis de los tejidos circundantes.
- Oxida la matriz orgánica de la dentina y desnaturaliza las fibras colágenas, reduciendo considerablemente sus propiedades mecánicas, específicamente el módulo de elasticidad, microdureza y resistencia a la flexión.

- Promueve la eliminación de fibras colágenas en la dentina; por lo tanto, provoca una reducción en la fuerza de unión de los sistemas adhesivos, impidiendo la formación de la capa híbrida que promueve una buena adhesión sobre el tejido dentinario.

Tomando en cuenta parte de sus limitaciones, actualmente se propone el uso de nanopartículas para el desarrollo de nuevos irrigantes de uso endodóntico que expresen bajos efectos citotóxicos a nivel celular y que presenten un amplio efecto antibacteriano (31,32).

1.12.2 Clorhexidina

La clorhexidina es considerada una bis-biguanida de origen catiónico que también se ha utilizado como irrigante endodóntico. Sin embargo, a pesar de no contar con la capacidad de disolución de tejidos orgánicos como el hipoclorito de sodio, presenta una excelente capacidad de adherencia sobre la dentina y ejerce un efecto antibacteriano prolongado; es efectiva contra bacterias Gram+ y Gram-, además de bacterias anaerobias facultativas, levaduras, hongos y algunos tipos de virus (incluyendo herpes y citomegalovirus), sin embargo, su efecto depende del pH, en un rango óptimo de 5.5 a 7 (31).

1.12.3 Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

El ácido etilendiaminotetraacético posee la capacidad de desmineralizar los componentes inorgánicos de la dentina mediante una reacción de quelación del calcio; no obstante, su aplicación directa como irrigante endodóntico resulta ineficaz en comparación con el hipoclorito de sodio y la clorhexidina. Esta es la principal razón por la que se indica el uso de un agente quelante en conjunto con un irrigante endodóntico. Actualmente, el EDTA es capaz de descalcificar la dentina intertubular a una profundidad de 20-30 μm durante los primeros 5 minutos de su aplicación. Sin embargo, su acción tras 24 horas de exposición logra alcanzar una profundidad de hasta 50 μm (31,33).

1.13 Diferencias entre los irrigantes dentales

En la Tabla 1 se describen las principales propiedades del NaOCl, CHx y EDTA como irrigantes endodónticos (33).

Tabla 1. Propiedades de los irrigantes y agentes quelantes.

Propiedades de los irrigantes	NaOCl	CHx	EDTA
Buen efecto antibacteriano	Si	Si	No
Buena capacidad de inactivas endotoxinas	Si	No	No
Actividad quelante	No	No	Si
Biocompatibilidad con los tejidos periapicales	No	Si	No
No interfiere en las propiedades físicas y adhesivas de la dentina	No	Si	Si

En. Gomes *et al.* 2023 (33)

1.14 Terapia antibiótica a nivel sistémico en endodoncia

La terapia antibiótica sistémica solo es necesaria si el proceso infeccioso se encuentra fuera de los conductos radiculares o si el paciente tiene alguna enfermedad sistémica crónico-degenerativa o congénita de importancia que requiera medicación. Ya que resulta eficaz como complemento en el tratamiento de conductos para prevenir la diseminación del proceso infeccioso, controlarlo y reducir parte de la sintomatología (34,35).

1.15 Terapia antibiótica a nivel local en endodoncia

Los antibióticos aplicados en contacto directo sobre los tejidos dentales a nivel local actualmente alcanzan concentraciones de 10 a 100 veces superiores a las de la administración sistémica, lo que reduce el riesgo de reacciones adversas como anafilaxia o resistencia bacteriana (36).

1.16 Terapia antibiótica intraconducto

Una de las terapéuticas más empleadas como medicación intraconducto es la aplicación de ciertos fármacos de forma local. Uno de ellos es el hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), actualmente reportado como parte de los medicamentos más utilizados en endodoncia; sin embargo, aún no se ha demostrado su eficacia en *Candida*

albicans y *Enterococcus faecalis*. Otra terapéutica comúnmente empleada de manera local en odontología es la aplicación de antibióticos de amplio espectro pulverizados aplicados intraconducto (metronidazol, ciprofloxacino y minociclina) que forman una pasta triple antibiótica conocida como pasta 3Mix indicada en casos con necrosis pulpar (30,37).

1.17 Pasta triple antibiótica

La aplicación de fármacos con propiedades antibacterianas en contacto directo con los órganos dentarios es uno de los métodos más efectivos para eliminar las bacterias residuales de los conductos radiculares, dado que resulta difícil eliminar las bacterias anaerobias obligadas que permanecen dentro de los túbulos dentinarios de la dentina interradicular. Los antibióticos más utilizados que conforman esta pasta triple antibiótica son el metronidazol, el ciprofloxacino y la minociclina (38,39).

El metronidazol es un antibiótico de amplio espectro que pertenece al grupo de los nitroimidazoles. Los nitroimidazoles son profármacos que se activan mediante una reacción reductiva (reducción del grupo nitro) en condiciones de baja oxigenación. Suelen utilizarse para desencadenar efectos antibacterianos o antiparasitarios. Este fármaco posee un amplio espectro, reporta un mecanismo de acción bactericida y se emplea en la cavidad oral contra bacterias anaerobias obligadas. Sin embargo, se ha demostrado que el metronidazol, por sí solo, a concentraciones superiores a 100 µg/mL, no es capaz de eliminar todas las bacterias presentes en una lesión de caries profunda. Por ello, se ha sugerido el uso de otros fármacos con acción antibiótica, como el ciprofloxacino y la minociclina (39).

El ciprofloxacino pertenece a la nueva generación de quinolonas llamadas fluoroquinolonas relacionadas en su estructura con el ácido nalidíxico, su principal mecanismo de acción es la inhibición del ADN girasa bacteriana, es un fármaco con acción antibacteriana de amplio espectro altamente susceptible a las bacterias

Gram⁻ y moderadamente susceptible a las bacterias Gram⁺ capaz de desarrollar pocos efectos secundarios (40,41).

La minociclina es una tetraciclina sintética de segunda generación. Una de sus principales desventajas es que su uso prolongado puede provocar pigmentación en los órganos dentarios, incluidos tejidos blandos como la mucosa del paladar y las mejillas dentro de la cavidad oral. Expresa un amplio espectro con un mecanismo de acción bacteriostático y presenta una alta actividad contra bacterias anaerobias Gram- y Gram+. Se une en gran medida a los ribosomas presentes en el interior de la membrana celular bacteriana, específicamente a la subunidad ribosomal 30S, y, una vez unida, interfiere con la unión del aminoacil-ARNt, directamente sobre el ARN de transferencia. Es soluble en lípidos y presenta pocos efectos secundarios (42,43).

Se ha reportado previamente que la combinación de estos tres antibióticos (metronidazol, ciprofloxacino y minociclina) en forma de pasta triple antibiótica, aplicada en los conductos radiculares, puede eliminar casi en su totalidad las bacterias presentes en lesiones cariosas, especialmente en dientes que han cursado necrosis pulpar o incluso un absceso o lesión preciapical (44).

Su modo de preparación se describe de la siguiente manera:

1. Eliminación del recubrimiento entérico de los antibióticos.
2. Con un mortero se pulverizan y se mezclan en la misma cantidad de cada fármaco en proporción 1:1:1 (metronidazol/ciprofloxacino/minociclina)
3. Los fármacos se mezclan con macrogol y propienglicol para formar una pasta y se colocan en los conductos radiculares (44).

1.18 Agentes remineralizantes

Otra alternativa de tratamiento odontológico aplicada en el control y prevención de caries mínimamente invasiva específicamente sobre las lesiones de mancha blanca

es la aplicación tópica de agentes remineralizantes, como el flúor, el quitosano o la clorhexidina, en pastas dentales, enjuagues bucales o en barniz (45).

El quitosano (CH) fue descubierto por C. Rougeot en 1859 y su estructura fue identificada por primera vez por Darmon y Rudall en 1950. Ya que destaca por su buen efecto antibacteriano, además de poseer una de las propiedades más estudiadas por su capacidad remineralizante en el esmalte y en la dentina, ya que la remineralización dentinaria implica la regeneración de una nueva matriz de fibras colágenas y la formación de cristales de hidroxiapatita que protegen el complejo dentino-pulpar (46,47).

Otro de los agentes antibacterianos comúnmente utilizado como agente remineralizante además de destacar por su empleo como irrigante endodóntico es la clorhexidina (CHx), ya que a distintas concentraciones logra un control químico que ofrece frente a la formación de cualquier biopelícula de origen bacteriano, gracias a su capacidad bactericida y bacteriostática, además de su baja citotoxicidad (48–50).

1.19 Sistemas adhesivos utilizados en ortodoncia

Durante más de tres décadas, se ha realizado una extensa investigación sobre el proceso de cementación de la aparatología fija en la superficie del esmalte dental, utilizando diversos tipos de cementos, como los ionómeros de vidrio y los sistemas adhesivos, con el objetivo de optimizar la retención mecánica y garantizar la biocompatibilidad. Sin embargo, para que un sistema adhesivo sea considerado idóneo, debe cumplir con una serie de criterios clínicos fundamentales, entre los cuales se destacan:

1. Fácil manipulación
2. De fácil acceso
3. Una buena relación costo-beneficio (51,52).

La adhesión de materiales dentales (resinas, aparatología fija, restauraciones directas) al esmalte o a la dentina actualmente representa uno de los desafíos considerables que se presentan durante la práctica clínica debido a las propiedades estructurales distintivas de los sustratos (esmalte, dentina). Los primeros avances se remontan en la década de 1960, con el desarrollo de los sistemas adhesivos de primera generación, que mostraban una eficacia limitada, baja durabilidad y alta solubilidad. Durante la década de 1970, se implementó la técnica de grabado ácido mediante el uso de un gel a base de ácido fosfórico, con el propósito de establecer una retención micromecánica. Sin embargo, esta técnica no se generalizó hasta la década de 1990, con la aparición de los sistemas adhesivos de cuarta generación, caracterizados por la aplicación de técnicas de grabado selectivo tanto en esmalte como en dentina. Posteriormente, estos sistemas se transformaron en adhesivos de quinta generación y actualmente se encuentran disponibles en versiones de sistemas autocondicionantes también conocidos como adhesivos de séptima generación, lo que simplifica el protocolo adhesivo al integrar el grado de ácido y el sistema adhesivo en un solo paso (53).

En la actualidad, en ortodoncia, los sistemas adhesivos que utilizan un grabado ácido, específicamente ácido ortofosfórico al 37%, son los más empleados para realizar una adecuada cementación brackets en el esmalte. Esto se debe a que el ácido ortofosfórico elimina selectivamente el esmalte interprismático, creando una capa permeable y rugosa de entre 5 y 50 μm de profundidad, facilitando la penetración de la resina y favoreciendo un mecanismo de unión micromecánica efectivo (54,55).

Uno de los cementos adhesivos a base de resina más utilizados en ortodoncia es Transbond XT (3M Unitek, Monrovia, CA, EE. UU.), este debe utilizarse según las indicaciones del fabricante debido a que este material humedece y penetra el esmalte protegiendo la superficie del diente que fue sometida al grabado con ácido ortofosfórico evitando su desmineralización a largo plazo y es fácil de manipular, su matriz está compuesta por bismetacrilato de (1-metiletiliden)bis[4,1- fenilenxi(2-

hidroxi-3,1-propanodilo)], dimetacrilato de 2,2-etilendioxidietilo (TEGDMA) e hidroquinona (56).

1.20 Nanotecnología

La palabra "nano" se deriva del griego "nannos", que significa "enano". Un nanómetro equivale a una millonésima parte de un metro (10^{-9}m). La nanotecnología ha sido aplicada directamente a los nanomateriales en el campo de la salud, clasificándolos según sus dimensiones en: cero dimensional, unidimensional, bidimensional y tridimensional. Asimismo, a lo largo de los años se han investigado diversos tipos de nanoestructuras, como nanopartículas, nanoporos, nanotubos, nanorrellenos, nanoesferas, nanofibras y nanoanillos. Actualmente estas estructuras destacan por sus propiedades antibacterianas y citotóxicas, así como por su adecuada biocompatibilidad con los tejidos (57).

1.21 Aplicaciones de la nanotecnología en odontología

El uso de nanopartículas en odontología comenzó realizando estudios con resinas compuestas y acrílicas, aparatos ortodónticos y estudiando los componentes de relleno para reducir la contracción de las resinas y así mejorar sus propiedades mecánicas. Hoy se usan en todas las áreas, como la periodoncia, la endodoncia, la odontopediatría, la prótesis, la implantología y la cirugía maxilofacial (58).

1.22 Nanopartículas orgánicas biodegradables

Las nanopartículas orgánicas suelen ser metabolizadas y eliminadas por el organismo con el tiempo. Para liberar fármacos de forma controlada, se requiere una matriz polimérica que responda a la degradación química. Sin embargo, su capacidad de liberación depende de su alta biodegradabilidad, de su compatibilidad con el pH del organismo y de su sensibilidad a la temperatura (58–60).

Los nanopolímeros biodegradables van a contribuir a la formación de nanopartículas orgánicas presentando una carga positiva en su superficie, que es capaz de interactuar de forma electrostática con la superficie negativa de la pared celular bacteriana interrumpiendo la permeabilidad de su membrana, ingresando al citoplasma y desencadenando la salida del líquido intercelular por consecuente su muerte de la célula bacteriana (61).

Parte de los polímeros más utilizados para la formación de nanopartículas orgánicas son:

- PLGA
- Ácido poliláctico
- Dextrano
- Quitosano
- Grafeno (60).

1.23 Nanopartículas de quitosano (CHNPs)

El quitosano es un polímero catiónico *formado por* unidades de glucosamina N-acetil β -(1,4)-ligadas por desacetilación de la quitina, y se encuentra de forma natural en los caparazones de los crustáceos; su estructura química está conformada por grupos hidroxilo y amino que se unen mediante enlaces covalentes mediante una reacción de amidación. Actualmente, las aplicaciones de las CHNPs en medicina se han destacado por su alta biocompatibilidad y baja toxicidad, y por su capacidad de presentar una atracción electrostática sobre la membrana celular de bacterias, virus y hongos; también han sido utilizadas como transportadoras de fármacos y para la cicatrización de heridas (62–64).

Existen diversos métodos para su obtención, entre ellos destacan la reticulación de la emulsión, la coalescencia de gotas de emulsión, la gelificación iónica o la coagulación del quitosano mediante el uso de soluciones de ácido acético o de tripolifosfato de sodio en diferentes concentraciones, las cuales, en conjunto,

conforman un complejo polimérico biológicamente activo, altamente biocompatible y biodegradable (62).

En odontología han sido estudiadas con el objetivo de ser aplicadas como vehículo para la administración de ciertos antibióticos como doxiciclina, amoxicilina con ácido clavulánico, clindamicina y ciprofloxacino, aplicadas como medicación intraconducto debido a que han demostrado una buena penetración en los conductos radiculares, asegurando una liberación prolongada del fármaco y disminuyendo la dosis terapéutica administrada (63,64).

1.24 Nanopartículas de PLGA

El ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) es un poliéster alifático aprobado por la FDA, formado por ácido poliláctico y ácido poliglicólico. Actualmente, es uno de los polímeros sintéticos más utilizados en el ámbito farmacéutico, gracias a su liberación controlada, biocompatibilidad, biodegradabilidad y alta estabilidad. Además, se destaca por sus propiedades mucoadhesivas, producto de las interacciones electrostáticas con el epitelio gingival. Su síntesis es sencilla, mantienen una buena actividad antibacteriana y reportan bajos efectos citotóxicos. La obtención del PLGA se realiza mediante técnicas como evaporación o extracción del solvente de la emulsión, precipitación salina, nanoprecipitación, emulsificación de membrana y tecnología de microfluidos, utilizadas en la encapsulación de medicamentos hidrófobos (65,66).

2. Planteamiento del problema

La caries dental surge por la interacción entre la agresión ácida de la biopelícula bacteriana y la susceptibilidad del tejido dental. Las lesiones incipientes comienzan en el esmalte y se expresan como lesiones de mancha blanca, su aparición es más frecuente en pacientes con aparatología ortodóntica fija, debido a la acumulación bacteriana en zonas de difícil acceso cambios en la composición de la saliva y la formación de superficies irregulares ocasionadas por un excedente de adhesivo en el momento de la cementación de los brackets. Clínicamente, estas lesiones pueden observarse a partir de las dos semanas en las que la biopelícula bacteriana se establece en el esmalte dental, reportando una mayor prevalencia en incisivos laterales (34%), caninos (31%), premolares (28%) e incisivos centrales (17%). Como parte de los principales agentes etiológicos involucrados en la formación de caries, se destaca al *Streptococcus mutans* por su capacidad para establecer diversas interacciones en su superficie que facilitan la formación de una biopelícula de carácter polimicrobiano en el esmalte, lo que puede desencadenar una hipersensibilidad dentinaria al exponer la dentina subyacente. No obstante, la invasión bacteriana a través de los túbulos dentinarios induce a una respuesta inmunitaria y su persistencia desencadena una inflamación pulpar que evoluciona a una necrosis por descomposición séptica en ausencia de un tratamiento oportuno; actualmente el tratamiento de elección a ese grado de avance es la endodoncia que involucra un desbridamiento del tejido pulpar y desinfección de los conductos radiculares mediante irrigantes de uso endodóntico obturando con un material inerte. Actualmente se han reportado tasas de fracaso del 14% al 16% en el tratamiento de conductos principalmente asociados a una resistencia bacteriana ocasionada por *Enterococcus faecalis* (67–71).

La aplicación de nanopartículas poliméricas cargadas en la matriz orgánica de los adhesivos de uso ortodóntico o aplicadas irrigantes de uso endodóntico es compleja debido a las limitaciones que se reportan respecto a su efecto antibacteriano y efectos citotóxicos por lo que en este proyecto de investigación se pretende sintetizar nanopartículas orgánicas cargadas con antibióticos como metronidazol, ciprofloxacino y minociclina y antisépticos como quitosano y clorhexidina debido a que ante un proceso

de caries incipiente o de origen endodóntico es indispensable eliminar parte de los microorganismos patógenos que conforman las diferentes biopelículas de origen bacteriano sin provocar efectos citotóxicos severos.

Por lo anterior se plantean las siguientes preguntas de investigación:

¿La incorporación de nanopartículas de quitosano cargadas con metronidazol, ciprofloxacino y minociclina aplicadas como irrigante endodóntico presentan efecto antibacteriano contra *Enterococcus faecalis* y una citotoxicidad media en células madre de la pulpa dental humana?

¿La interacción de nanopartículas de PLGA cargadas con quitosano y clorhexidina aplicadas en un adhesivo de uso ortodóntico presentan efecto antibacteriano en *Streptococcus mutans* y una citotoxicidad media en fibroblastos gingivales?

3. Justificación

En el campo de la odontología moderna, el control de la caries dental sigue siendo uno de los principales retos clínicos, especialmente en áreas como la ortodoncia y la endodoncia, donde el desarrollo de distintas biopelículas de origen bacteriano compromete la eficacia de los tratamientos y la preservación de la estructura dentaria. Bacterias como *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*, están ampliamente documentadas como agentes etiológicos clave en la formación de lesiones de mancha blanca en el esmalte y dentro de los conductos radiculares, respectivamente. La persistencia de estas bacterias se debe, en gran medida, a su capacidad de formar biopelículas que les confieren cierta resistencia a los agentes antibacterianos. En respuesta a estas problemáticas, se han propuesto diversas estrategias terapéuticas, entre las cuales destaca la aplicación tópica de fármacos, como antibióticos o antisépticos, con el fin de controlar la proliferación bacteriana. Por tanto, resulta esencial el desarrollo de sistemas de liberación controlada que permitan una administración localizada, prolongada y eficaz de estos agentes antimicrobianos (72–77).

En este contexto, la nanotecnología ha emergido como una alternativa prometedora. Las nanopartículas de quitosano o ácido poli(láctico-co-glicólico) han demostrado ser eficientes en la incorporación y liberación de fármacos, debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad para mejorar la biodisponibilidad y estabilidad de los principios activos. En particular, el quitosano presenta propiedades antibacterianas y capacidad para promover la remineralización dental, mientras que el PLGA se ha utilizado ampliamente en sistemas de liberación de fármacos debido a su comportamiento de degradación controlado. Por estas razones, la presente investigación se enfoca en la síntesis y aplicación de nanopartículas de PLGA cargadas con quitosano y clorhexidina, incorporadas en adhesivos de uso ortodóntico, así como la síntesis de nanopartículas de quitosano cargadas con antibióticos de amplio espectro (metronidazol, minociclina y ciprofloxacino) aplicadas como irrigante endodóntico. Estas formulaciones buscan optimizar la actividad antibacteriana localizada y reducir la citotoxicidad en los

tejidos circundantes, proporcionando una alternativa innovadora frente a los tratamientos convencionales. Dado que la evidencia científica sobre la aplicación de estos sistemas en el ámbito clínico odontológico aún es limitada, esta propuesta representa una contribución relevante al conocimiento actual, abriendo nuevas posibilidades para el diseño de materiales dentales bioactivos con capacidades antimicrobianas mejoradas. En última instancia, la implementación de estos sistemas podría traducirse en un impacto clínico positivo mediante la prevención de lesiones cariosas asociadas a aparatología fija y el aumento en la tasa de éxito de los tratamientos de conductos, mejorando la calidad de vida de los pacientes y reduciendo la necesidad de intervenciones invasivas (77,78).

4. Hipótesis

4.1 Fase 1

Hipótesis de Trabajo

- La interacción de las NPs-PLGA cargadas con quitosano y clorhexidina aplicadas en un adhesivo de uso ortodóntico mostrarán efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* y una citotoxicidad moderada en fibroblastos gingivales.

Hipótesis Nula

- La interacción de las NPs-PLGA cargadas con quitosano y clorhexidina aplicadas en un adhesivo de uso ortodóntico no mostrarán efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* y una alta citotoxicidad en fibroblastos gingivales.

4.2 Fase 2

Hipótesis de Trabajo

- Las nanopartículas de quitosano cargadas con metronidazol, ciprofloxacino y minociclina aplicadas como irrigante endodóntico mostrarán mayor efecto antibacteriano en *Enterococcus faecalis* y efectos citotóxicos moderados en células madre de la pulpa dental humana.

Hipótesis Nula

- Las nanopartículas de quitosano cargadas con metronidazol, ciprofloxacino y minociclina aplicadas como irrigante endodóntico no mostrarán efecto antibacteriano en *Enterococcus faecalis* y presentarán altos efectos citotóxicos en células madre de la pulpa dental humana.

5. Objetivos

5.1 Fase 1

Objetivo general:

- Desarrollar NPs-PLGA cargadas con agentes antisépticos aplicadas en un adhesivo de uso ortodóntico para incrementar su efecto antibacteriano en *Streptococcus mutans* y evaluar su citotoxicidad en fibroblastos gingivales

Objetivos específicos:

- Sintetizar nanopartículas de PLGA
- Sintetizar nanopartículas de PLGA cargadas con quitosano y clorhexidina.
- Realizar la caracterización de las nanopartículas y evaluar, mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), la presencia de grupos funcionales del PLGA y de los antisépticos.
- Realizar la caracterización de las nanopartículas, evaluar su morfología con el microscopio electrónico de barrido (SEM) e identificar y cuantificar compuestos mediante la absorción de luz en la región ultravioleta y visible mediante espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS).
- Determinar la concentración mínima inhibitoria y las zonas de inhibición bacteriana de las NPs-PLGA y compararlas al ser cargadas con los antisépticos en *Streptococcus mutans*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria y las zonas de inhibición bacteriana del adhesivo Transbond XT cargado con las NPs-PLGA y compararlas al ser cargadas con los antisépticos en *Streptococcus mutans*.
- Evaluar la citotoxicidad de las NPs-PLGA y compararla al cargarlas con los antisépticos (quitosano y clorhexidina) en fibroblastos gingivales (HGF).
- Obtener los extractos del adhesivo Transbond XT al ser cargado con las NPs-PLGA con y sin los antisépticos y evaluar su citotoxicidad en fibroblastos gingivales.

5.2 Fase 2

Objetivo general:

- Desarrollar nanopartículas de quitosano cargadas con metronidazol, ciprofloxacino y minociclina aplicadas como irrigante endodóntico para incrementar su efecto antibacteriano en *Enterococcus faecalis* y evaluar su dosis citotóxica media en células madre de la pulpa dental humana.

Objetivos específicos:

- Sintetizar nanopartículas de quitosano (CHNPs) con y sin temperatura en su agitación.
- Sintetizar CHNPs cargadas con metronidazol, ciprofloxacino y minociclina.
- Realizar y evaluar mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) la presencia de grupos funcionales de las CHNPs y de los antibióticos.
- Realizar la caracterización de las nanopartículas e identificar y cuantificar compuestos a través de la absorción de luz en la región ultravioleta y visible mediante espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS).
- Determinar la concentración mínima inhibitoria y las zonas de inhibición bacteriana de las CHNPs, y compararlas con las obtenidas al cargarse con antibióticos en *Enterococcus faecalis*.
- Evaluar la citotoxicidad de las CHNPs y compararlas al cargarlas con los antibióticos (metronidazol, minociclina y ciprofloxacino) en células madre de la pulpa dental humana (hDPSC).

6. Materiales y métodos

6.1 Fase 1

6.1.1 Diseño de estudio

- Experimental, *in vitro*

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria del área de Nanoestructuras y Biomateriales, ENES – Unidad León, UNAM.

6.1.2 Universo

- NPs-PLGA 805149; Marca: Sigma Aldrich, Saint Louis MO, USA.
- Quitosano; Marca: Sigma Aldrich No. CAS: 9012-76-4.
- Clorhexidina; Marca: FGM, Joinville, Santa Catarina, Brasil.

6.1.3 Muestra

- Citotoxicidad: 9 platos de 96 pocillos a densidades de 4×10^5 cel/ml de HGF ATCC: CRL-2014.
- Difusión en agar: 36 cajas Petri con agar Mueller Hinton
- Microdilución: 9 platos de 96 pocillos a densidades de 1×10^4 UFC/mL de *Streptococcus mutans* ATCC: 25175.

Los ensayos fueron realizados por triplicado de tres experimentos independientes para asegurar reproducibilidad de los datos.

6.1.4 Criterios de selección

Criterios de inclusión

- *Especie bacteriana Streptococcus mutans* (ATCC: 25175).
- Fibroblastos gingivales (ATCC: CRL-2014) a una densidad mínima de 4×10^5 cel/ml para las pruebas de citotoxicidad.

Criterios de exclusión

- Platos que no cumplan con la densidad celular estandarizada para las pruebas de citotoxicidad.
- Fármacos con fecha de caducidad anterior a 6 meses a partir de la preparación inicial al comienzo del estudio.

Criterios de eliminación

- Medios de cultivo contaminados o sin crecimiento bacteriano o celular

6.1.5 Variables de estudio

Variables dependientes de la Fase 1

Tabla 2. Se muestran las variables dependientes

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Efecto antibacteriano	Acción de impedir el crecimiento bacteriano que desencadena un desequilibrio metabólico.	Ensayo de difusión en agar Zona alrededor del pozo que no provoca crecimiento bacteriano	Cuantitativa	Continua
		Ensayo de microdilución Inhibición y cuantificación de la bacteria a analizar.	Cuantitativa	Continua
Citotoxicidad	Efecto o capacidad que expresa una sustancia para provocar un daño celular provocado por la acción de anticuerpos específicos.	Análisis de viabilidad celular mediante un ensayo de MTT	Cuantitativa	Continua
Caracterización de las nanopartículas	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) Conjunto de átomos que presentan una estructura determinada y ciertas características de los compuestos que los conforman	FTIR Cambios en los enlaces químicos y grupos funcionales de las nanopartículas	Cuantitativo	Continuo
	Microscopia electrónica de barrido (SEM) Técnica de microscopia eficaz capaz de generar imágenes de alta definición utilizando interacciones electrón-materia.	SEM La interacción del haz de electrones al reaccionar con la muestra genera diferentes señales que se transforman en imágenes de alta resolución	Cualitativa	Nominal
	Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS) Absorbancia en la región UV-VIS basada en la ley de Beer-Lambert.	UV-VIS Determina la longitud de onda de luz UV o visible que una muestra absorbe o transmite a una longitud de onda de 160 y 780 nm	Cuantitativa	Continua

Variables independientes de la Fase 1

Tabla 3. Se muestran las variables independientes.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Clorhexidina	Sustancia antiséptica de acción bactericida y fungicida	Marca Sigma Aldrich	Cualitativa	De razón
Quitosano	Poliéster biodegradable aprobado para uso humano utilizado para cargar fármacos	Marca Sigma Aldrich	Cualitativa	De razón
(Plga) Ácido poliácido láctico-co-glicólico	Polímero sintético biocompatible y biodegradable que se utiliza en diversos productos farmacéuticos y dispositivos médicos	Marca Sigma Aldrich	Cualitativa	De razón

6.1.6 Procedimiento

Desarrollo de la investigación Fase 1

Síntesis de las NPs-PLGA

La síntesis de las NPs-PLGA se llevó a cabo mediante el método de doble emulsión-evaporación del disolvente ($W_1/O/W_2$). Se disolvieron 10 mg de los antisépticos a analizar (clorhexidina y quitosano) por separado en 2 mL de alcohol polivinílico (PVA) al 1 % (Sigma Aldrich, MO, USA) y se sonicaron con un homogeneizador ultrasónico (Elma Sonic P line. ELMA. Modelo: P30H, Alemania) utilizando 250 W de potencia a 20 kHz durante 1 min para formar la fase acuosa (W_1). Posteriormente se disolvieron 50 mg de PLGA en 5 mL de diclorometano (Sigma-Aldrich, MO, USA) para formar la fase oleosa (O). La emulsión primaria se elaboró agregando w_1 a la fase oleosa, sonicándose nuevamente a 250 W de potencia a 20 kHz durante 2 min. La emulsión secundaria (W_2) se preparó incorporando 10 mL de PVA al 1% y se sonicó durante 2 min. Para evitar la coalescencia de la emulsión secundaria se agregaron 20 mL de PVA al 0.5%. Posteriormente, se colocaron en el agitador magnético (IKA Works, Wilmington, USA) durante 1 h a 800 rpm a temperatura ambiente. Finalmente, las nanopartículas fueron recolectadas y se colocaron en la centrifuga (Thermo Fisher ScientificTM, Alemania) a 10 000 rpm a 4 °C durante 20 min. Se lavaron y se almacenaron en refrigeración (79,80).

Elaboración del adhesivo cargado con NPs-PLGA

Se utilizaron 6 mL de adhesivo de ortodoncia (Transbond XT Supreme, 3M, Monrovia, CA) para disolver 30 mg de NPs-PLGA, 30 mg de NPs-PLGA cargadas con quitosano y 30 mg de NPs-PLGA cargadas con clorhexidina en polvo de manera individual y se sonicaron en el ultrasonificador (Elma Sonic P line. ELMA. Modelo: P30H, Alemania) durante 5 minutos a temperatura ambiente para obtener un 2.5 % en peso del adhesivo modificado, posteriormente se colocaron en almacenamiento y se desecharon a los 20 días posteriores a su elaboración (79).

Caracterización de las NPs-PLGA

Las NPs-PLGA una vez cargadas con los antisépticos se analizaron mediante FTIR en estado sólido para corroborar la presencia de los grupos funcionales de los compuestos orgánicos que se están analizando; SEM para generar imágenes de alta resolución de la superficie de la muestra utilizando interacciones entre los electrones y la materia y UV-VIS para determinar la longitud de onda de luz UV o visible que una muestra absorbe y transmite a una longitud de onda de 100 a 500 nm para obtener los parámetros que determinen algunas de sus características específicas (81–83).

Análisis Microbiológico

Difusión en Agar

Se disolvieron 38 gramos de agar Mueller-Hinton (Sigma Aldrich Brand, OXOID, Inglaterra) en 1000 mL de agua destilada estéril (Laboratorios PISA, Guadalajara, Jalisco, México), utilizando un agitador magnético para mezclarlos (IKA Works, Wilmington, USA) hasta llegar al punto de ebullición a 120 °C y tener una solución homogénea, se colocaron 20 mL en cada caja Petri (Thermo Scientific, Richardson, TX, EE. UU). Posteriormente, se elaboró el cultivo joven con la ayuda de un asa estéril, tomando 2 a 3 colonias bacterianas de *S. mutans* ATCC 25175 mediante la técnica de sembrado de estriado, y se incubó a 37 °C durante 24 h. (VORTEMP 1550 LABNET, New Jersey, USA). A partir del cultivo joven previamente realizado con ayuda de un asa estéril, se tomaron varias microcolonias, las cuales se

suspendieron en la solución de NaCl al 0.85 %, y se mezclaron durante aproximadamente 15 seg en vórtex. Posteriormente se ajustó la disolución al patrón de turbidez 0.5 en la escala de McFarland en una cantidad aproximada de 1 a 1×10^6 UFC/mL, una vez lista la solución se colocaron aproximadamente 140 μ L de *S. mutans*; distribuyendo la bacteria de manera uniforme por toda la caja mediante la técnica de estriado utilizando un hisopo estéril. Posteriormente se realizaron 5 pocillos en cada caja, se colocaron 20 μ L de las NPs cargadas con los antisépticos y el adhesivo de uso ortodóntico (Transbond XT Supreme Low Viscosity Light Cure Adhesive, 3M, Monrovia, CA) en la Tabla 4 se especifica el desglose de los grupos de estudio y se incubaron durante 24 h (VORTEMP 1550 LABNET, New Jersey, USA). Realizado las mediciones correspondientes de los halos de inhibición con la ayuda de un vernier electrónico digital (Control Company). Como se observa en la Figura 1 (84,85).

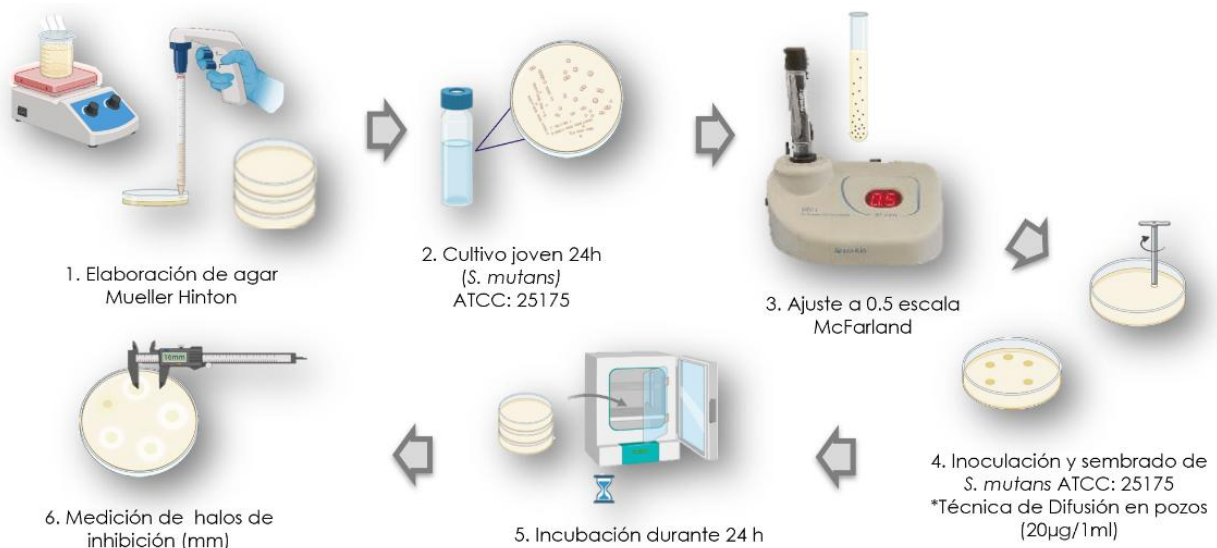


Figura 1. Representación esquemática del ensayo de difusión en agar

Fuente: Propia

Tabla 4. Desglose de los grupos de estudio y grupos control para el ensayo de difusión en agar por caja Petri

Numeración en la caja	Grupos	Descripción
NPs-PLGA + Clorhexidina sin adhesivo		
1	Control +	Clorhexidina
2	Control -	Agua desionizada estéril
3	Grupo 1	NPs-PLGA
4	Grupo 2	Nps-PLGA-Clorhexidina
5	Grupo 3	Adhesivo de uso ortodóntico
NPs-PLGA + Quitosano sin adhesivo		
1	Control +	Quitosano
2	Control -	Agua desionizada estéril
3	Grupo 1	NPs-PLGA
4	Grupo 2	NPs-PLGA-Quitosano
5	Grupo 3	Adhesivo de uso ortodóntico
NPs-PLGA + Clorhexidina inmersas en adhesivo de uso ortodóntico		
1	Control +	Clorhexidina
2	Control -	Agua desionizada estéril
3	Grupo 1	NPs-PLGA
4	Grupo 2	NPs-PLGA-Clorhexidina
NPs-PLGA + Quitosano inmersas en el adhesivo de uso ortodóntico		
1	Control +	Quitosano
2	Control -	Agua desionizada estéril
3	Grupo 1	NPs-PLGA
4	Grupo 2	NPs-PLGA-Quitosano

Ensayo de microdilución

Para realizar la determinación de la concentración mínima inhibitoria bacteriana de la cepa de *S mutans* (ATCC: 25175) con las NPs-PLGA cargadas con antisépticos de uso odontológico e inmersas en el adhesivo, se realizó el ensayo de microdilución actualmente aceptado por la organización internacional de estandarización “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI-M27-A3-2008). (86,87)

La preparación del caldo consistió en disolver 21 gramos de Broth Mueller-Hinton (Sigma-Aldrich No. CAS 9005-25-8) en 1000 ml de agua destilada mezclándose mediante agitación magnética (IKA Works, Wilmington, USA) a 120 °C durante 15 min, esterilizándose en la autoclave (M-2540M semiautomático Tuttnauer 23 L).

Posteriormente, se elaboró el cultivo joven de *S. mutans*; apoyándose en el uso de un asa estéril, se tomaron 3 a 4 colonias bacterianas con la misma morfología, se sembraron en una caja Petri con agar Mueller-Hinton y se incubaron (VORTEMP 1550 LABNET, New Jersey, USA) a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se preparó el overnight con el cultivo fresco elaborado 24 h antes, tomando 10 mL de Broth de agar Mueller-Hinton en un tubo de ensayo estéril y con un asa estéril se tomaron de 3 a 4 colonias microcolonias del cultivo joven suspendiéndolas en la solución dejándose en agitación a 120 rpm de 16 a 18 horas a 37°C en la incubadora (VORTEMP 1550 LABNET, New Jersey, USA). Una vez transcurrido el periodo de incubación del overnight se realiza un ajuste en la disolución de la bacteria tomando nuevamente 10 ml de Broth y 1 mL del overnight, con ayuda del densitómetro (Grant Instruments DEN-1B, Cambridgeshire, UK) se ajustó al patrón de turbidez 0.5 en la escala de McFarland en una cantidad de 1 a 1×10^4 UFC/mL, una vez lista la solución se colocaron 100 µL de medio con bacteria. Todos los pocillos contienen un total de 200 µL, como se ilustra en la Figura 2; los platos fueron incubados a 37 °C durante 24 h a 120 rpm. Para realizar la cuantificación bacteriana fue necesario aspirar el contenido de los pocillos con cuidado para evitar tocar el sedimento al fondo de cada pocillo, posteriormente se agregaron 100 µL de MTT bromuro de tiazolilo azul tetrazolio) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (0,0002 g/ml) y se incubaron a 37 °C durante 4 h, se aspiró de nuevo la solución de MTT y se colocaron 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Karal, Guanajuato, México) para realizar las lecturas en el espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU.) a una absorbancia de 600 nm. (88–90) Parte de la metodología empleada en este ensayo se ilustra en la Figura 3.

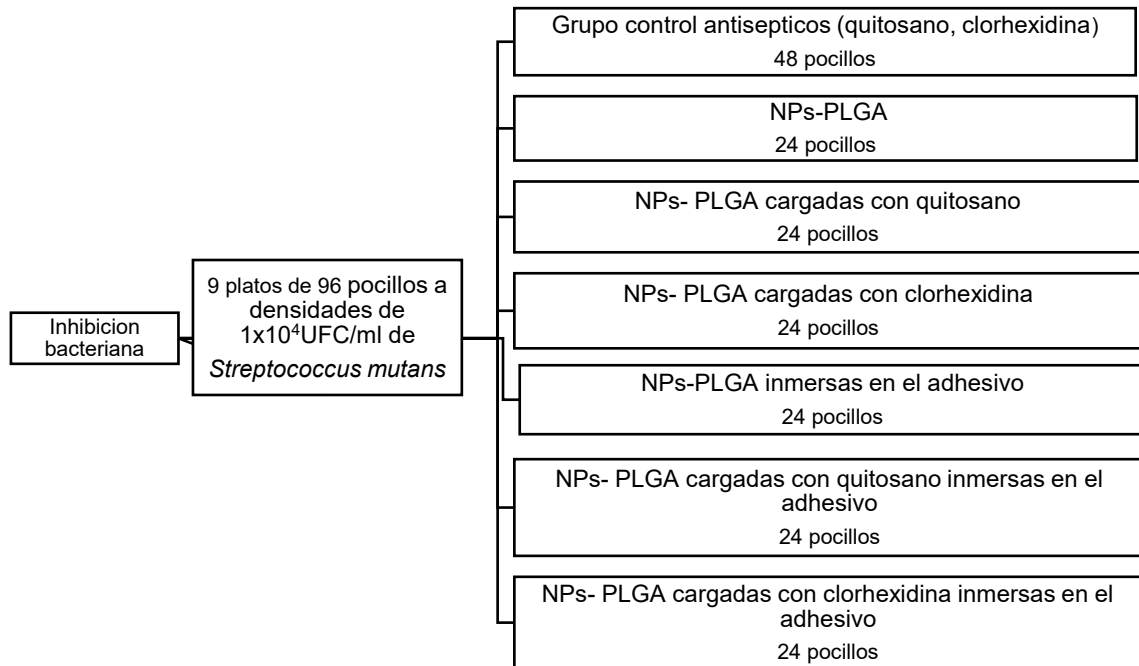


Figura 2. Diagrama de los platos, pocillos y grupos de estudio que se analizarán para el ensayo de microdilución.

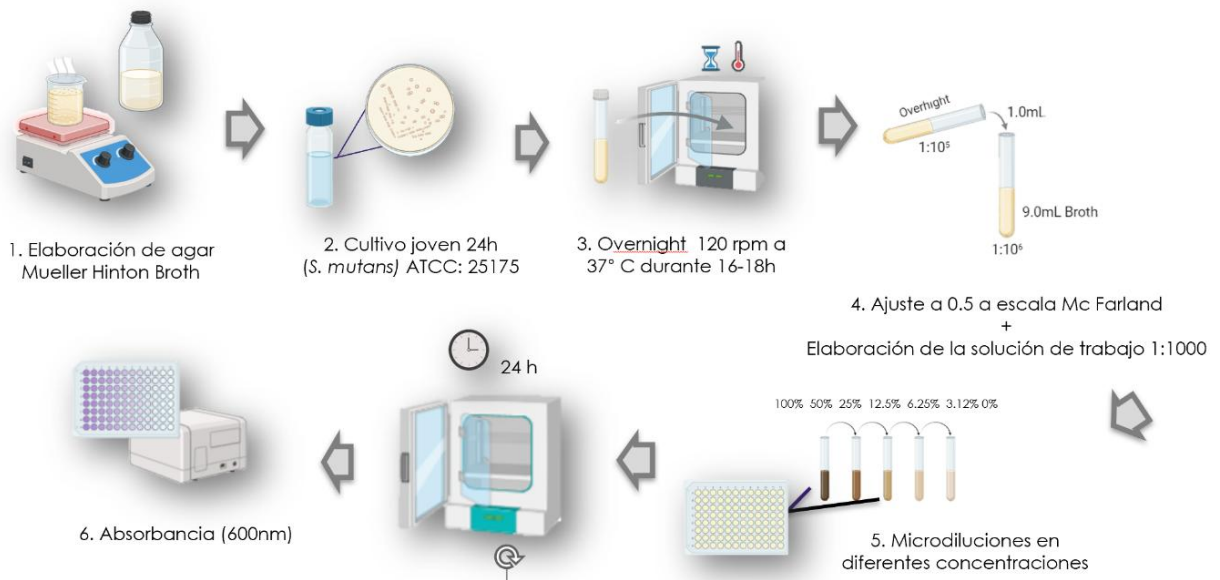


Figura 3. Representación del ensayo de microdilución

Fuente: Directa (propia)

Ensayo de Citotoxicidad

Los fibroblastos gingivales (HFG) se obtuvieron de las reservas establecidas del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de Nanoestructuras y Biomateriales de ENES– Unidad León, UNAM y se almacenaron a -80 °C. Se cultivaron en Medio Mínimo Esencial (MEM, GIBCO BRL, Carlsbad, CA, EE. UU), suplementado con suero fetal bovino al 10 % (JRH Bioscience, Lenexa, KS, EE. UU), antibióticos al 1 % (penicilina G y estreptomicina, Sigma-Aldrich, México) y glutamina al 1 % (Glutamax, Massachusetts, USA) incubándose a 37 °C con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa (Thermo Fisher Scientific™). Posteriormente, los HFG se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y tripsina al 0.025 % durante 5 min y, para su conteo en la cámara de Neubauer, se les agregó medio de cultivo fresco y se incubaron nuevamente hasta alcanzar su confluencia celular. Posteriormente, los HFG fueron subcultivados en 9 platos de 96 pocillos a una concentración de 4×10⁵ células/mL, y se incubaron en las mismas condiciones de cultivo previas a la realización de los ensayos de citotoxicidad (86,91).

Elaboración de soluciones por contacto indirecto

Para realizar las diluciones de las NPs-PLGA cargadas con los antisépticos inmersas en el adhesivo de uso ortodóntico (Transbond XT Supreme Low Viscosity Light Cure Adhesive, 3M, Monrovia, CA), se colocaron 20 µL del adhesivo en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril para evitar alguna contaminación bacteriana y se fotopolimerizó durante 20 s por lado. Posteriormente se agregó 1 mL de medio MEM estéril y se incubó a 37°C a 95% de humedad relativa durante 24 h a 120rpm, (Figura 4) realizando este procedimiento en apego a la norma ISO 10993-5:2009 para materiales dentales sólidos que generan extractos en ensayos celulares cultivados (86).

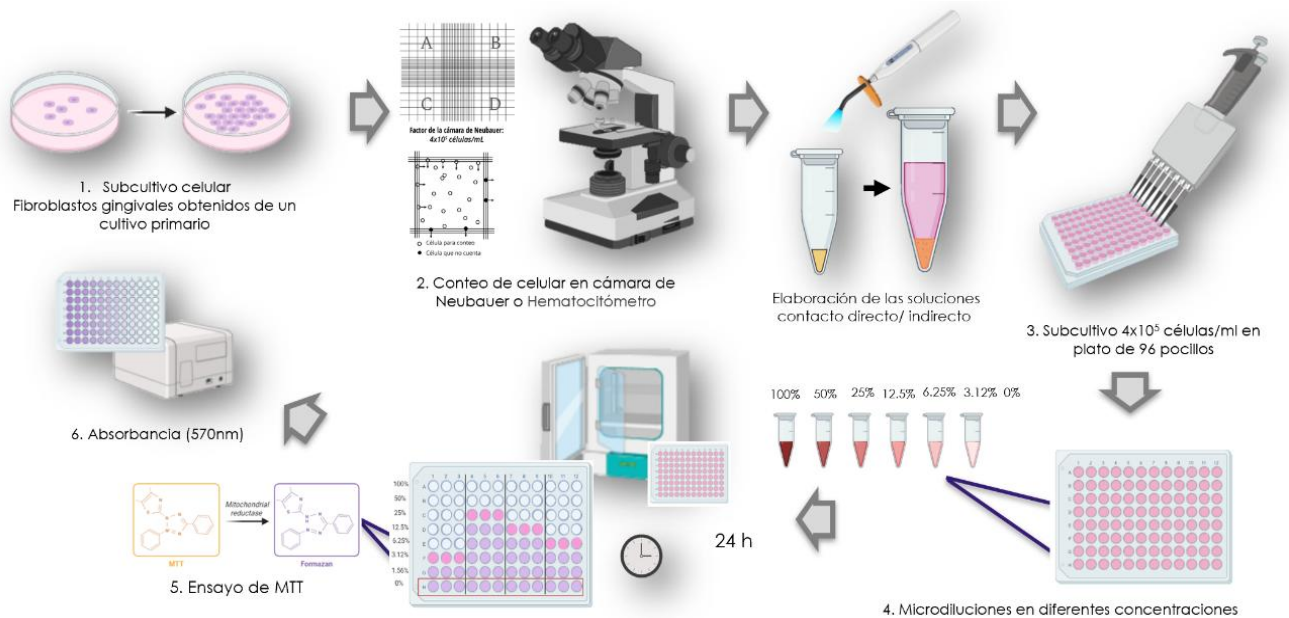


Figura 4. Representación del ensayo de citotoxicidad por contacto directo/indirecto

Fuente: Propia

Cuantificación de la viabilidad celular.

La citotoxicidad de las NPs-PLGA cargadas con los antisépticos a analizar e inmersas en los extractos del adhesivo de usos ortodóntico se evaluó colocando 100 μ l de las soluciones de NPs-PLGA en distintas diluciones de 100% al 0%, para los controles negativos se mantuvieron únicamente las líneas celulares con medio de cultivo, con un volumen final de 200 μ L por pocillo como se observa en la Figura 2, posteriormente se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Mediante el ensayo de MTT se evaluó la viabilidad celular y se agregaron 100 μ L de MTT (0.0002 g/ml en MEM frasco) incubándose nuevamente durante 6 h formando cristales de formazán que fueron disueltos con 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO, Karal, Guanajuato, México) y las densidades ópticas se midieron a con el Espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU) a una absorbancia de 570 nm durante 10 s (Figura 5) (86,88).

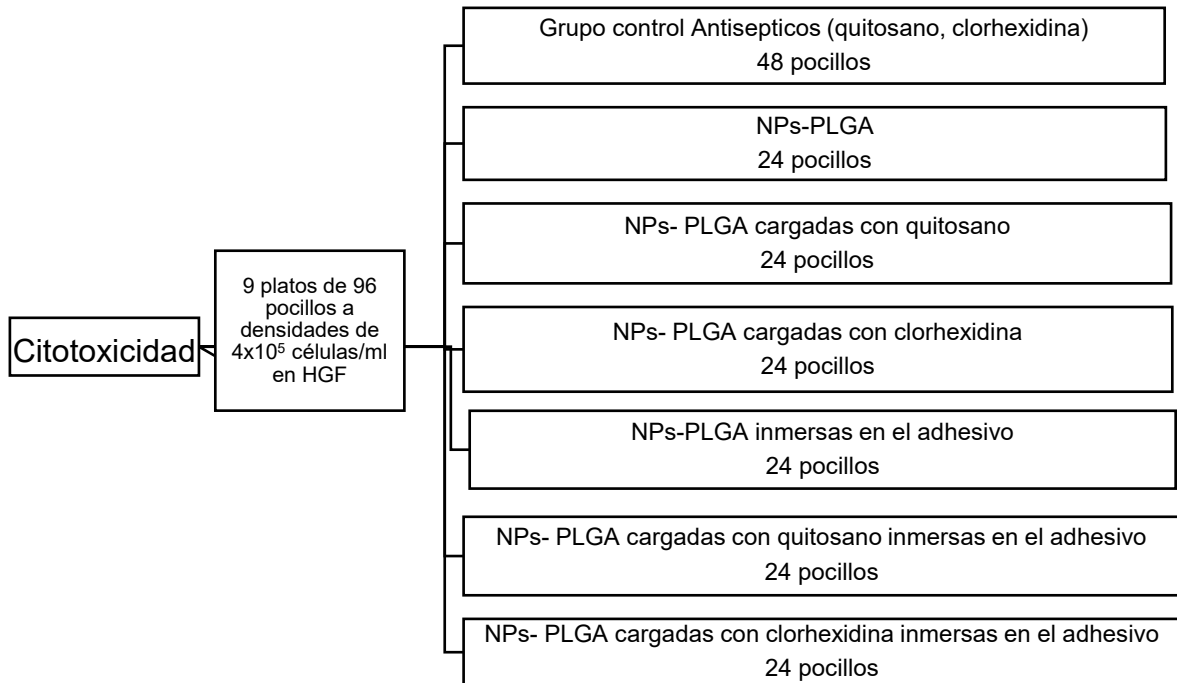


Figura 5. Diagrama de los platos, pocillos y grupos de estudio que se analizaron para realizar el ensayo citotoxicidad

Materiales y métodos

6. 2 Fase 2

6.2.1 Diseño de estudio

- Experimental, *in vitro*

El presente estudio se llevó a cabo, en el área de Nanoestructuras y Biomateriales, de la ENES – Unidad León, UNAM.

6.2.2 Universo

- Quitosano Marca: Sigma Aldrich No. CAS: 9012-76-4
- Metronidazol Marca: Sigma-Aldrich No. CAS: 443-48-1
- Ciprofloxacino Marca: Sigma-Aldrich No. CAS: 85721-33-1
- Minociclina clorhidrato Marca: Sigma No. CAS: 13614-98-7

6.2.3 Muestra

- Citotoxicidad: 9 platos de 96 pocillos a una densidad celular de 4×10^5 cel/mL de hDPSC de aislado clínico de paciente.
- Difusión en agar: 180 cajas Petri con agar Mueller Hinton
- Microdilución: 9 platos de 96 pocillos a densidades de 1×10^4 UFC/mL de *Enterococcus faecalis* de aislado clínico de paciente.

Los ensayos se realizaron por triplicado de tres experimentos independientes para asegurar una adecuada reproducibilidad de los datos.

6.2.4 Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Especie bacteriana *Enterococcus faecalis*, aislado clínico de paciente.
- Células madre de la pulpa dental humana de aislado clínico de paciente a una densidad celular mínima de 4×10^5 cel/ml para las pruebas de citotoxicidad.

Criterios de exclusión

- Platos que no cuenten con la densidad celular estandarizada para los ensayos de citotoxicidad.
- Antibióticos que, en su etiquetado, reporten una fecha de caducidad anterior a 6 meses a partir de la preparación inicial al comienzo del estudio.

Criterios de eliminación

- Medios de cultivo que se encuentren contaminados (ensayo de difusión en agar, microdilución y citotoxicidad)

6.2.5 Variables de estudio

Variables dependientes de la Fase 2

Tabla 5. Se muestran las variables dependientes

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Efecto antibacteriano	Acción que impide el crecimiento de patógenos.	Ensayo de difusión en agar Zona específica que se observa alrededor del pozo en la que no se produce crecimiento bacteriano	Cuantitativa	Continua
		Ensayo de microdilución Destaca por la inhibición y cuantificación de la bacteriana	Cuantitativa	Continua
Citotoxicidad	Daño celular provocado por la acción de anticuerpos específicos y del complemento, o por células citotóxicas.	Análisis de viabilidad celular mediante un ensayo de MTT	Cuantitativa	Continua
Caracterización de las nanopartículas	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) Conjunto de átomos que constituyen una estructura determinada y que presentan características específicas en los compuestos orgánicos.	FTIR Cambios que se reportan específicamente en los grupos funcionales de las nanopartículas.	Cuantitativo	Continuo
	Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS) Absorbancia en la región UV-VIS.	UV-VIS Reporta la longitud de onda de luz UV o visible de una muestra que absorbe o transmite a una longitud de onda.	Cuantitativa	Continua

Variables independientes de la Fase 2

Tabla 6. Se muestran las variables independientes.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Metronidazol	Eficaz contra anaerobios Gram - inhibidor de isoenzimas específicas del citocromo P450 obligados estrictos	Metronidazol Sigma Aldrich	Cualitativa	De razón
Minociclina	Tetraciclina sintética de segunda generación	Minociclina Sigma Aldrich	Cualitativa	De razón
Ciprofloxacino	Inhibición de la topoisomerasa IV y la DNA-girasa bacterianas	Ciprofloxacino Sigma Aldrich	Cualitativa	De razón
Quitosano	Poliéster biodegradable aprobado para uso humano utilizado para cargar fármacos	Quitosano Sigma Aldrich	Cualitativa	De razón

6.2.6 Procedimiento

Desarrollo de la investigación Fase 2

Elaboración de las nanopartículas de quitosano (CHNPs)

La síntesis de nanopartículas de quitosano (CHNPs) se realizó mediante el método de gelificación iónica. Utilizando 1 g de quitosano (Sigma Aldrich, MO, USA) en una solución de ácido acético al 1 % (Sigma Aldrich, MO, USA) en agitación magnética (IKA Works, Wilmington, USA) durante 24 h a 350 rpm; realizando una síntesis inicial de quitosano sin temperatura (s/t) y otra síntesis con temperatura (c/t) de 50-60 °C en su agitación; se preparó una segunda solución de 10 ml/5mg de tripolifosfato de sodio (TPP) (Sigma Aldrich, MO, USA) disuelto en agua tridestilada (Laboratorios PISA, Guadalajara, Jalisco, México), ajustando su pH a 4.7 con hidróxido de sodio (NaOH). Posteriormente se elaboraron las soluciones stock de los antibióticos utilizando 100 mg de metronidazol, ciprofloxacino, minociclina disueltos por separado en 10 ml de agua tridestilada estéril; se filtraron las 3 soluciones por goteo en una membrana de 0.45 µm en agitación durante 40 min a 350 rpm (92–95).

Caracterización de las CHNPs

Las CHNPs cargadas con los antibióticos se analizaron FTIR, para confirmar la presencia de los grupos funcionales orgánicos y obtener información molecular más detallada, y UV-VIS para determinar la longitud de onda de luz UV o visible (96–98).

Análisis Microbiológico

Difusión en Agar

Preparación de agar Mueller-Hinton:

Se disolvieron 38 gramos de agar Mueller-Hinton (Sigma Aldrich Brand, OXOID, Inglaterra) en 1 L de agua destilada y se mezclaron con la ayuda de un agitador magnético (IKA Works, Wilmington, USA) a 120 °C. Posteriormente se colocaron 20 mL de agar por cada caja Petri y una vez gelificadas, se rotularon y se sellaron con Parafilm almacenándose en refrigeración (87,99).

Elaboración de cultivo joven 24 horas antes de realizar el experimento

Con un asa estéril se tomaron aproximadamente 3 colonias bacterianas de *E. faecalis* de una cepa proveniente de aislado clínico de paciente y se incubaron a 37 °C durante 24 h (87,99).

Técnica de difusión en pozos

Se preparó una solución estéril de NaCl al 0.85 % y se agregaron 10 mL en un tubo de ensayo estéril; previa a la elaboración del cultivo joven, se tomaron varias microcolonias, las cuales se suspendieron en la solución. Posteriormente se ajustó la disolución al patrón de turbidez 0.5 en la escala de McFarland con la ayuda del densitómetro (Grant Instruments DEN-1B, Cambridgeshire, UK) en una cantidad aproximada de 1×10^6 UFC/ml, una vez lista la solución se colocaron aproximadamente 140 μ L de *E. faecalis* de aislado clínico de paciente; utilizando la técnica de estriado distribuyendo de manera uniforme por toda la caja con la ayuda un hisopo estéril. Posteriormente se realizaron 5 pozos como se describe en la Tabla 7, y se colocaron 20 μ L en cada pozo por cada fármaco, colocándose en la incubadora (VORTEMP 1550 LABNET, New Jersey, USA) durante 24 h para posteriormente realizar la lectura de los halos de inhibición. Figura 6 (87,99).

Tabla 7. Desglose de los grupos de estudio y grupos control para el ensayo de difusión en agar por caja

Numeración en la caja	Grupos	Descripción
Antibióticos		
1	Control +	Clorhexidina
2	Control -	Agua desionizada estéril
3	Grupo 1	Minociclina
4	Grupo 2	Ciprofloxacino
5	Grupo 3	Metronidazol
CHNPs		
1	Control +	Clorhexidina
2	Control -	Agua desionizada estéril
3	Grupo 1	CHNPs sin temperatura en su síntesis
4	Grupo 2	CHNPs sin temperatura en su síntesis
CHNPs + Minociclina con y sin temperatura en su síntesis		
1	Control +	Clorhexidina
2	Control -	Agua desionizada estéril
3	Grupo 1	CHNPs cargadas con Minociclina en proporción 1:0.5
4	Grupo 2	CHNPs cargadas Minociclina en proporción 1:1
5	Grupo 3	CHNPs cargadas con Minociclina en proporción 1:2
CHNPs + Ciprofloxacino con y sin temperatura en su síntesis		
1	Control +	Clorhexidina
2	Control -	Agua desionizada estéril
3	Grupo 1	CHNPs cargadas con Ciprofloxacino en proporción 1:0.5
4	Grupo 2	CHNPs cargadas con Ciprofloxacino en proporción 1:1
5	Grupo 3	CHNPs cargadas con Ciprofloxacino en proporción 1:2
CHNPs + Metronidazol con y sin temperatura en su síntesis		
1	Control +	Clorhexidina
2	Control -	Agua desionizada estéril
3	Grupo 1	CHNPs cargadas con Metronidazol en proporción 1:0.5
4	Grupo 2	CHNPs cargadas con Metronidazol en proporción 1:1
5	Grupo 3	CHNPs cargadas con Metronidazol en proporción 1:2

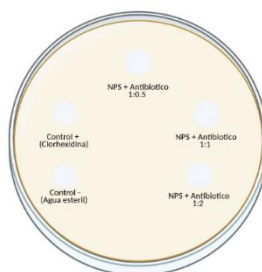


Figura 6. Representación de cajas Petri de agar Mueller-Hinton con los 5 pozos a realizar

Fuente: Propia

Ensayo de microdilución

Para determinar la concentración mínima inhibitoria bacteriana en *E. faecalis* de aislado clínico de paciente con las CHNPs cargadas con antibióticos, se comenzó con la preparación del caldo Broth en el cual se disolvieron 21 g de Mueller-Hinton Broth (Sigma-Aldrich No. CAS 9005-25-8) en 1 L de agua destilada y se mezclaron con un agitador magnético (IKA Works, Wilmington, USA) a 120 °C y posteriormente se esterilizó en la autoclave (M-2540M semiautomático Tuttnauer 23 L) (88).

Elaboración de cultivo joven

Con la ayuda de un asa estéril se tomaron 3 colonias bacterianas de *E. faecalis* y se sembraron mediante la técnica de estriado en una caja Petri y se colocaron en la incubadora (VORTEMP 1550 LABNET, New Jersey, USA) a 37 °C durante 24 h (88).

Preparación de overnight

Se preparó un cultivo fresco; se tomaron 10 mL de Broth en un tubo de ensayo estéril y, con la ayuda de un asa estéril, 3 microcolonias del cultivo joven preparado previamente, dejándose en agitación a 120 rpm durante 16 h a 37 °C (88).

Ensayo de microdilución

Posteriormente se ajustó la disolución de la bacteria al patrón de turbidez 0.5 en la escala de McFarland en una cantidad aproximada de 1×10^4 UFC/mL, una vez lista la solución se colocaron 100 µL de medio y 100 µL de las CHNPs con los antibióticos, en concentraciones del 100 % al 0 % con un total 200 µL por pocillo como se observa en las Figuras 7 y 8. Una vez realizado el experimento, los platos se incubaron a 37 °C durante 24 h a 120 rpm en la incubadora (VORTEMP 1550 LABNET, New Jersey, USA) (88).

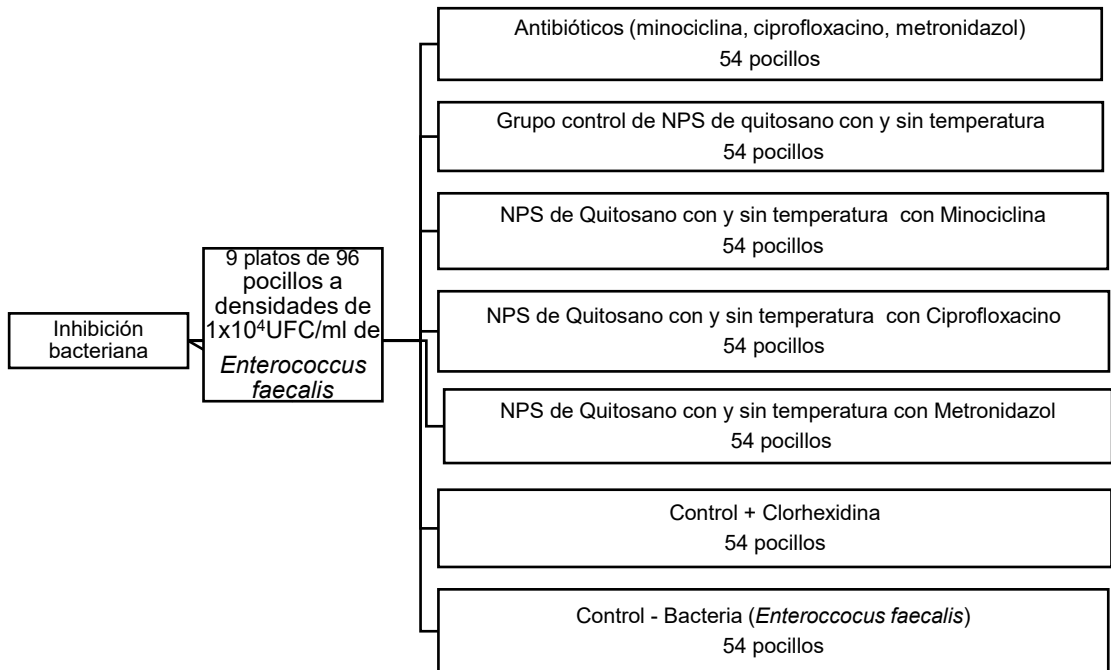


Figura 7. Diagrama de los platos, pocillos y grupos de estudio que se analizarán en el ensayo de microdilución.

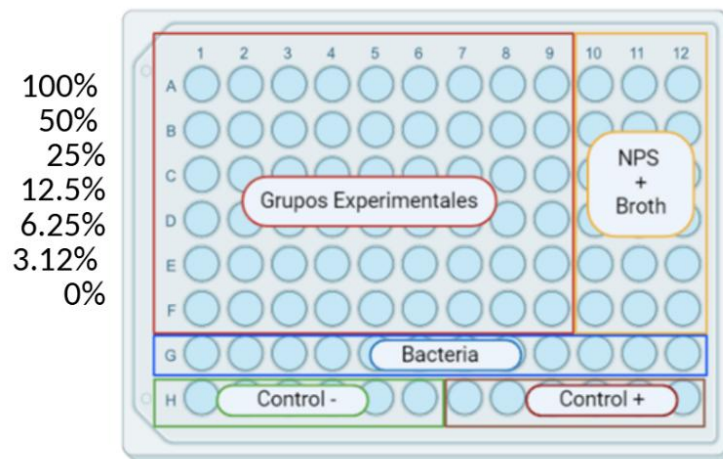


Figura 5: Representación de las concentraciones utilizadas por pocillo en cada plato de 96 pocillos para el ensayo de microdilución.

Fuente: Propia

Cuantificación bacteriana

Se aspiró el contenido de los pocillos y se colocaron 100 μL de MTT (bromuro de tiazolilo azul tetrazolio) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (0,0002 g/mL) en cada pocillo, se incubaron nuevamente a 37°C durante 4 h, una vez transcurrido ese tiempo se aspiró nuevamente y se agregaron 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO, Karal, Guanajuato, México) en cada pocillo para poder tomar las lecturas de densidad óptica a través de un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU); ver Figura 9, a una absorbancia de 570 nm (88).



Figura 9. Espectrofotómetro para medir la absorbancia en la región UV-VIS.

Fuente: Propia.

Ensayo de citotoxicidad

La obtención de las células pulpares (hDPSC) fue de las reservas establecidas del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de Nanoestructuras y Biomateriales se almacenaron a -80°C y se cultivaron en medio de cultivo esencial mínimo DMEM alfa (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EE. UU.), suero fetal bovino FBS al 10 % (JRH Bioscience, Lenexa, KS, EE. UU), antibioticos al 1% ($10\,000\text{ mg/ml}^{-1}$ de penicilina G y $10\,000\text{ mg/ml}^{-1}$ de estreptomina, Sigma-Aldrich, México) y glutamina al 1 % (Glutamax, Massachusetts, USA) incubándose a 37°C con 5 % de CO_2 y 95 % de humedad relativa (Thermo Fisher Scientific™). Las hDPSC se lavaron posteriormente con solución salina tamponada y tripsina al 0.025 % durante 4-5 minutos y se añadió medio de cultivo fresco. Para realizar el conteo celular, se agregaron $10\ \mu\text{L}$ sobre el hematocitómetro y se colocó en la cámara de Neubauer. Las hDPSC fueron inoculadas en 09 platos de 96 pocillos, como se observa en la Figura 10, a una densidad celular de 4×10^4 células/mL y se incubaron durante 24 h (86,100).

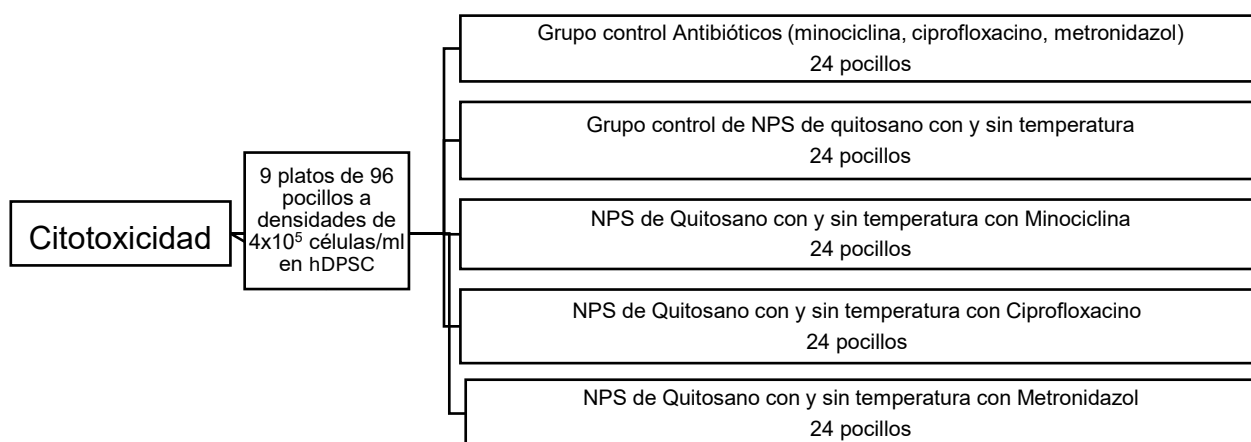


Figura 10. Diagrama de los platos, pocillos y grupos de estudio que se analizaron para realizar el ensayo citotoxicidad

Cuantificación de la viabilidad celular

Una vez ya inoculados 100 μ L de medio con hDPSC en cada pocillo se agregaron 100 μ L de las CHNPs en diluciones del 100 % al 0 % (Figura 11), tomando en cuenta un volumen final de 200 μ L por pocillo y como control negativo se utilizaron las líneas celulares únicamente con medio de cultivo incubándose durante 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂, una vez transcurridas las 24 h se realizó el ensayo de MTT (bromuro de tiazolilo azul tetrazolio) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (0.0002 g/mL) para analizar la evaluación de la viabilidad celular, se incubaron durante 4 h para la formación de cristales de formazán que posteriormente se disolvieron con 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO, Karal, Guanajuato, México); las lecturas de la densidad óptica se realizaron a través de un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU) a 570 nm durante 10 s. Una vez analizado, se determinó la dosis citotóxica media (CC50) (86,100).

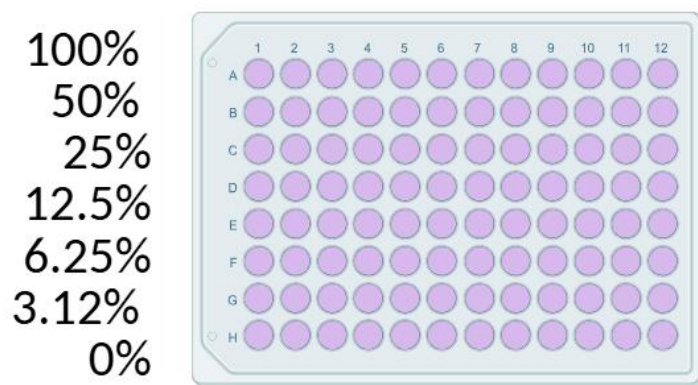


Figura 11. Esquema que ilustra las diluciones realizadas en el ensayo de citotoxicidad

Fuente: Propia

6.7 Consideraciones bioéticas

Para llevar a cabo este estudio tanto para la **Fase 1 y Fase 2** es importante destacar que se respetaron las disposiciones y regulaciones vigentes en México que se encuentran estipuladas en la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud haciendo hincapié en su artículo 17 el cual considera los riesgos de la investigación, esta investigación se considera “sin riesgo”, debido a que se realizó *in vitro* y el material empleado ha sido aprobado por las instancias correspondientes de cada país donde se produce. Además, el presente estudio se llevará a cabo en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria en el área de Nanoestructuras y Biomateriales de la ENES – Unidad León certificado de acuerdo con las normas ISO-9001:2015 e ISO 10993-5:1999. Para realizar las pruebas microbiológicas correspondientes a los ensayos de difusión en agar y microdilución, serán realizados en el área de Nanoestructuras y Biomateriales por las líneas establecidas en las normas NOM-010-STPS-2014, NOM-210-SSA1-2014 y por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) M100 y M27-A3-2008 (101,102).

El registro se realizó en la Comisión de Ética e Investigación en la Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León Guanajuato, con el número de registro: CEI_24_117_S41.

6.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico para la **Fase 1** y la **Fase 2** se llevó a cabo una vez obtenidos los datos numéricos para cada prueba, se calculó el promedio y la desviación estándar y se identificó específicamente para las pruebas de citotoxicidad el nivel de citotoxicidad destacando su clasificación en base a el porcentaje de viabilidad celular:

- 100-75%: No citotóxico
- 74-50%: Ligeramente citotóxico
- 49-25%: Moderadamente citotóxicos
- 24-0%: Extremadamente citotóxico

En caso de que las nanopartículas cargadas con los antibióticos o con los antisépticos reduzcan más del 50% de la viabilidad celular, se calculará la concentración citotóxica media (CC50) [Diferencia de dosis * diferencia de porcentajes (50-% superior/50-% inferior) + dosis identificada = CC50.

Los datos numéricos tanto para medir el efecto antibacteriano como para las pruebas de citotoxicidad se analizaron con pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y una vez que se corroboró la distribución de los datos se realizó un análisis de ANOVA de Una Vía ($P \leq 0.05$) con una prueba de Post-hoc de Tukey mediante el programa Prism versión 10.0 para Windows.

Por último, se realizó un análisis descriptivo de los espectros obtenidos por las técnicas de FTIR, SEM Y UV-VIS.

7. Resultados

Primer artículo (aceptado)



Segundo artículo (enviado)

Dental Materials ULISES VELAZQUEZ-ENRIQUEZ

Home Main Menu Submit a Manuscript About Help

- Click **View Submission** to review the PDF before you approve your submission.
- Integrity is vital to the trustworthiness of science. Please make sure that your manuscript adheres to the guidelines for [Ethics in Publishing](#).
- Once you have reviewed the PDF and Ethics in Publishing guidelines check the box to complete your submission.

For additional assistance in completing your submission:

- Use **Edit Submission** to change the meta-data, and to upload or remove files to your submission.
- Please use **Remove Submission ONLY** if you want to permanently remove your submission from the system.

If you have additional questions or need help completing your submission:

Visit our [online support site](#).

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Results per page 10

Action	Title	Date Submission Began	Status Date	Current Status	Accept Ethics in Publishing?
Action Links	Antibacterial effect of orthodontic adhesive with organic nanoparticles	Oct 25, 2025	Oct 26, 2025	Needs Approval	<input checked="" type="checkbox"/> I accept

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Results per page 10

Tercer artículo (enviado)

Capítulo del libro

Título del capítulo del libro:

“Eficacia de Nanopartículas de Quitosano y Plga cargadas con ciprofloxacino frente a irrigantes en endodoncia: revisión sistemática”

Autores:

Alejandra Itzel López Flores¹ <https://orcid.org/0000-0002-6782-5504>
Ulises Velázquez Enríquez² <https://orcid.org/0000-0002-8796-7809>
Rogelio José Scougall Vilchis² <https://orcid.org/0000-0003-4671-0748>
Laura Susana Acosta Torres³ <https://orcid.org/0000-0002-5959-9113>
René García Conteras³ <https://orcid.org/0000-0003-3504-5519>
Isabel de Monserrat Osorio Bernal² <https://orcid.org/0009-0003-7505-7119>

1. Maestra en Ciencias Odontológicas, Estudiante del Doctorado en Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Odontología, Toluca Estado de México
2. Profesor investigador en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO). Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Odontología, Toluca Estado de México
3. Profesor investigador en el Laboratorio de Nanoestructuras y Biomateriales. Universidad Nacional Autónoma de México, Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León Guanajuato

Autor de correspondencia: Ulises Velázquez Enríquez

Dirección: Jesús Carranza y Paseo Tollocan, Toluca, Estado de México, México. CP. 50130
Email: uvelazqueze@uamex.mx
Número Telefónico: +52 722 2179070 Ext. 264

8. Artículo: Resumen/Abstrac

Primer artículo aceptado

Type of the Paper (Article, Original research manuscripts)

“A new disinfection approach using a chitosan-based endodontic irrigant”

Alejandra Itzel Lopez-Flores¹, Ulises Velazquez-Enriquez^{2*}, Rogelio Jose Scougall-Vilchis², Laura Susana Acosta-Torres³, Laura Emma Rodriguez-Vilchis², Rosalía Contreras-Bulnes², Paloma Netzayeli Serrano-Diaz³, Rene Garcia-Contreras³.

1. Master of Dental Sciences, Ph.D. Student in the Health Sciences. Department Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Odontología, Toluca, Estado de México.
2. Researcher professor, Dental Advanced Research Center, Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Odontología, Toluca Estado de México.
3. Researcher professor, Biomaterials and nanostructures Department, Universidad Nacional Autónoma de México, Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León, Guanajuato, México

*Corresponding Author: uvelazqueze@uamex.mx; Tel: +52 722 2179070 Ext. 264, Jesús Carranza and Paseo Tollocan, Toluca, Estado de México, México. ZC 50130 U.V.E.

Abstract

The use of chitosan nanoparticles (CH-NPs) loaded with antibiotics as irrigants in endodontics offers a unique combination, demonstrating effective antibacterial activity and low toxicity. Therefore, the aim of this study was to develop chitosan nanoparticles loaded with metronidazole, ciprofloxacin, and minocycline for use as endodontic irrigants to improve antibacterial activity against *Enterococcus faecalis* and to evaluate their cytotoxicity in human dental pulp stem cells (hDPSCs). *Methods:* The CH-NPs loaded with antibiotics were synthesized and analyzed using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis). Agar diffusion and microdilution assays were performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), and a cytotoxicity assay was conducted to establish the median cytotoxic dose. *Results:* Peaks corresponding to the functional groups of the chitosan-antibiotic complex's chemical structure were identified. A one-way ANOVA ($p \leq 0.05$) with Tukey's Post-hoc test was used to analyze the antibacterial effect. CH-NPs-ciprofloxacin showed the greatest antibacterial activity against *E. faecalis* in both agar diffusion and microdilution assays. CH-NPs-metronidazole demonstrated lower cytotoxicity against hDPSCs. CH-NPs-minocycline showed superior antibacterial effects compared to plain chitosan in microdilution assays, although they exhibited greater cytotoxicity. *Conclusions:* The ongoing search for an irrigating solution with effective antibacterial properties and low cytotoxicity could transform traditional techniques. However, this field is still developing and underexplored. It's essential to reevaluate decisions about irrigation solutions, as evidence on the use of chitosan nanoparticles with antibiotics is limited. This study provides valuable data for endodontics and is a crucial step for future research.

Keywords: Root Canal Irrigants, Chitosan, Irrigators, Antibiotics, Antibacterial effect.

Segundo artículo (enviado)

Abstract

The use of adhesive systems in orthodontics has become the standard for bracket cementation. However, biofilm buildup and excess adhesive on tooth enamel at cementation can lead to early caries lesions. Modifying orthodontic adhesives with polylactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles could improve their biological properties. Objective: To develop PLGA nanoparticles containing antiseptic agents for orthodontic adhesives, enhancing antibacterial action against *Streptococcus mutans*, and evaluating their cytotoxicity in gingival fibroblasts. Methods: PLGA nanoparticles were synthesized with antiseptics (chlorhexidine and chitosan) and analyzed using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), and ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), as well as agar diffusion and microdilution assays. A cytotoxicity assay was used to determine the average cytotoxic dose. Results: PLGA-NPs showed a lower antibacterial effect in the agar diffusion assay, with inhibition from 74.25 % to 54.05 %. In microdilution, the antibacterial effect was also reduced, with a CC50 of 3.75 µg/ml in the adhesive system and 15 µg/ml when free. PLGA-NPs-CHx demonstrated a stronger effect, with inhibition ranging from 89.38 % to 73.75 %, and a CC50 of 0.93 µg/mL, in both adhesive and free forms. PLGA-NPs-CH showed a significant effect in agar diffusion, with inhibition from 83.11 % to 69.39 %, and a CC50 of 1.87 µg/ml in the adhesive and 7.5 µg/ml when free. Conclusion: The incorporation of polylactic-co-glycolic acid nanoparticles functionalized with antiseptic agents into orthodontic adhesives demonstrates promising antibacterial potential, attracting growing interest in the field of orthodontics.

Keywords: "Chitosan" [Mesh] OR "Plga" [Mesh] OR "anti-infective agents, local"[Mesh] OR S.[All Fields] AND mutans [All Fields] AND "Tooth Demineralization" [MeSH] "drug delivery systems"[MeSH]

Tercer artículo (enviado)

Resumen

La encapsulación de nanopartículas de Quitosano y Plga con antibióticos como el ciprofloxacino aplicadas como irrigantes ha desencadenado un gran interés debido a la búsqueda de nuevos biomateriales en endodoncia que cuenten con un buen efecto antibacteriano y actúen de manera similar a los irrigantes convencionales. El objetivo de esta revisión es comparar el efecto antibacteriano de las nanopartículas de Quitosano y Plga cargadas con ciprofloxacino *versus* irrigantes endodónticos en *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, en estudios *in vitro* reportados en la literatura. **Metodología:** Se realizó una búsqueda de datos en Medline, PubMed, Scopus y Web of Science de estudios publicados desde el año 2004 al 2025, con la evaluación de calidad mediante la puntuación metodológica del modelo GRADE, los criterios de inclusión que se tomaron en cuenta fueron el año de publicación, intervención y número de muestras, régimen de irrigación, tipo de cepa y método utilizado. **Resultados:** Se encontraron 60 artículos, de los cuales se eliminaron 2 artículos duplicados dando un total de 58 artículos. Tomando en cuenta los criterios de inclusión se seleccionaron 48 artículos en función al título y resumen; sin embargo, fue realizada una segunda etapa de selección eliminándose 38 artículos, teniendo como resultado 10 artículos como selección final. **Conclusiones:** Este estudio aporta datos que podrían cambiar los métodos de irrigación convencionales utilizados en endodoncia para así buscar alternativas en un futuro que cuenten con un mejor efecto antibacteriano y soluciones más eficaces para erradicar bacterias como *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.

Palabras clave: Nanoparticles, Root Canal Irrigants, Chitosan, Plga, Ciprofloxacin.

9. Discusión

Uno de los objetivos principales de esta investigación fue desarrollar nanopartículas poliméricas cargadas con distintos agentes antibacterianos comúnmente utilizados en odontología, incluidos antibióticos como el metronidazol, el ciprofloxacino y la minociclina, así como antisépticos como el quitosano y la clorhexidina. Estas nanopartículas se han desarrollado con un propósito el cual ha sido evaluar su eficacia antibacteriana frente a *E. faecalis* y *S. mutans*, microorganismos clave en la formación del biofilm tanto a nivel gingival como endodóntico, también, se ha considerado esencial que las nanopartículas cargadas con los distintos agentes farmacológicos mostraran una adecuada biocompatibilidad a nivel celular resultado de una citotoxicidad media a mínima frente a hDPSC y HGF con el fin de garantizar su potencial aplicación clínica. La relevancia de este enfoque en la presente investigación radica en su aplicabilidad tanto en la especialidad de endodoncia como en la de ortodoncia, disciplinas que, al integrarse en este estudio, se enriquecen mutuamente abriendo nuevas posibilidades terapéuticas en un futuro no muy lejano.

9.1 Fase 1

Análisis morfológico y caracterización de las NPs-PLGA

Las pruebas de caracterización son indispensables para analizar las propiedades de las nanopartículas, como señalan Sadat Tabatabaei Mirakabad *et al.* (2014) (103). Las pruebas de SEM revelan la morfología y la distribución de las nanopartículas; las de FTIR evalúan la anarmonicidad espectral y el intercambio químico. En este estudio, el análisis mediante FTIR confirmó la unión exitosa de NPs-PLGA y sus interacciones con los antisépticos, lo cual coincide con los espectros reportados por Hassan Mohamed El-Said Azzazy *et al.* en 2021, que presentan picos característicos a 1076 cm^{-1} (C-O) y 1721 cm^{-1} (C=O), similares a nuestros hallazgos a 1084 cm^{-1} y 1551 cm^{-1} respectivamente. Lu *et al.* (2019) mencionan que existen picos característicos, principalmente de los grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$, que, al mezclarse con los antisépticos, se superponen en sus espectros debido a una reacción de desplazamiento de los grupos hidrógeno (104). Asimismo, la

absorción por resonancia plasmónica superficial del espectro UV-Vis fue a 277 nm, encontrándose espectros similares a los reportados por Priyadarshini *et al.*, 2017, a 289 nm (104). Por lo tanto, se recomienda realizar una prueba de resonancia magnética nuclear, como lo reportaron Hagai *et al.*, en 2018, para analizar con precisión las propiedades mecánico-cuánticas de las nanopartículas (105). Morfológicamente, las NPs-PLGA en el adhesivo de uso ortodóntico son esféricas. La carga con antisépticos (CHx-CH) y radicales provoca cambios estructurales, lo que resulta en enlaces irregulares y menos estables durante la fotopolimerización, alterando su morfología como lo reportaron Kamran *et al.*, en 2022 (79).

Inhibición bacteriana

Las lesiones de mancha blanca destacan como una de las complicaciones clínicas más importantes durante el tratamiento de ortodoncia ya que se relaciona con la formación de superficies irregulares y por ende su desmineralización en el esmalte dental ocasionadas por un exceso de adhesivo durante el proceso de cementación de los brackets, como lo mencionan Budi *et al.*, en 2022, afectando la composición de la saliva mediante la acumulación de una biopelícula ocasionada por una higiene deficiente (106).

Algunos estudios han identificado al *S. mutans* como un microorganismo clave en la desmineralización del esmalte, debido a su capacidad de producir polisacáridos extracelulares, lo que subraya su relevancia en esta investigación. Sundararaj *et al.*, 2015 encontraron que la desmineralización del esmalte dental puede ocurrir durante el tratamiento de ortodoncia en el 45.8 % de los casos, con una prevalencia del 68.4 %, lo que indica la necesidad de mejorar las estrategias de prevención durante el tratamiento (107). Este estudio evaluó la inhibición bacteriana de las NPs-PLGA, tanto en su forma libre como cargadas con antisépticos, en un adhesivo de uso ortodóntico (Transbond XT). La elección del método para evaluar la inhibición bacteriana es crucial según lo han reportado Salam *et al.*, en 2023 ya que enfatizan el uso adecuado de métodos fenotípicos de referencia para una evaluación precisa de la inhibición bacteriana (108); Khan *et al.*, en 2019 destacan que los ensayos de microdilución ofrecen ventajas sobre los ensayos de difusión en agar, como la

automatización, un menor riesgo de contaminación y una evaluación cuantitativa más objetiva (109). Si bien los ensayos de difusión en agar mostraron zonas de inhibición, no fue posible determinar la concentración óptima, a diferencia de los ensayos de microdilución, que proporcionaron datos específicos para establecer una mejor comparación.

Khanal *et al.*, en 2016, reportan que las NPs-PLGA son biocompatibles, presentan baja toxicidad y permiten la liberación sostenida de fármacos, como lo demuestran las NPs-PLGA en la presente investigación en su forma libre, al inhibir significativamente el crecimiento de *S. mutans* del 74.70 % al 49.94 % (110). Al añadirlas al adhesivo, se observaron efectos antimicrobianos similares, posiblemente debido a la difusión limitada del adhesivo sin el uso de antisépticos. Li *et al.*, 2016 demostraron que las NPs-PLGA cargadas con CH presentan una buena eficacia antibacteriana en odontología debido a la interacción de la carga catiónica que expresa el CH con las bacterias grampositivas, lo que respalda la liberación sostenida de antisépticos por las NPs-PLGA, en la presente investigación se reporta una inhibición bacteriana del 83.11 % a partir de 30 µg/mL utilizando Transbond XT (111). Las NPs-PLGA-CHx mostraron la mayor eficacia, con un 88.75 % de inhibición en su forma libre y un 89.38 % inmersas en el sistema adhesivo, lo que indica que la CHx permanece activa en la matriz polimérica del adhesivo coincidiendo con lo reportado por Kamran *et al.*, 2022 donde observaron que la adición de las NPs-PLGA-CHx al 25 % y al 50 % a Transbond XT mejoró la acción antimicrobiana sin comprometer sus propiedades mecánicas (79).

La eficacia observada de las NPs-PLGA cargadas con antisépticos sugiere que podrían constituir un enfoque prometedor para prevenir el desarrollo de lesiones de mancha blanca durante el tratamiento ortodóncico. Estas nanopartículas, diseñadas para liberar antisépticos lentamente, pueden reducir el riesgo de desmineralización del esmalte, una problemática común en ortodoncia. Sin embargo, estos hallazgos indican que se requieren más investigaciones. Esto ayudará a ampliar las posibles aplicaciones de diversas estrategias antimicrobianas.

Citotoxicidad

El estudio de las propiedades biológicas de los sistemas adhesivos en ortodoncia, en particular, sus efectos citotóxicos, es crucial debido a su proximidad a los tejidos blandos orales y su contacto con el esmalte dental como lo reportan Cadenaro *et al.*, 2023 debido a que destacan la eficacia clínica de la cementación de brackets mediante adhesivos selectivos o autograbantes, que contienen monómeros hidrófobos (Bis-GMA, TEGDMA, UDMA) que promueven la reticulación, y monómeros hidrófilos que se unen al sustrato dental (112). Sin embargo, algunos monómeros pueden no polimerizar completamente, liberando monómeros residuales que pueden ser tóxicos a nivel celular; se ha reportado que los sistemas adhesivos que contienen una matriz orgánica de TEGDMA y Bis-GMA son los más citotóxicos. Goldberg, en 2008, observó que, tras la polimerización, la mayoría de los monómeros reaccionan, dejando del 1.5 % al 5 % de monómeros residuales, que aún pueden causar efectos celulares significativos (113).

Geurtsen *et al.*, 1998 descubrieron que la citotoxicidad de los monómeros residuales depende del material y del linaje celular, siendo especialmente sensibles el HGF y las hDPSC (114). El presente estudio demostró que los monómeros residuales del adhesivo cargado con NPs-PLGA, al entrar en contacto indirecto con los HGF, desencadenaron un efecto citotóxico moderado en ciertas concentraciones, a diferencia de las NPs-PLGA en su forma libre. Jonke *et al.*, 2008 evaluaron cuatro sistemas adhesivos de ortodoncia (Light Bond, Reliance Orthodontic Products, Itasca, IL, EE. UU.; Enlight, Ormo; Concise y Transbond XT, 3M Unitek) utilizando una línea celular de fibroblastos murinos (L-929) y reportaron una viabilidad celular del 23.23 % para Light Bond, 20.39 % para Transbond XT, 20.39 % para Enlight y 17.87 % para Concise en contacto directo (115). Kamran *et al.*, 2022 evaluaron la citotoxicidad del adhesivo Transbond XT modificado con PLGA-NPs-CHx utilizando 25, 50 y 75 µg/mL, con un volumen del 5 % en HGF (ATCC CRL-2014), reportando viabilidades celulares que oscilaron entre el 87 % y el 97 % (79). Estos resultados coinciden con los del presente estudio, ya que la dosis citotóxica media (CC50) indica una citotoxicidad moderada, probablemente debida a la liberación de

monómeros residuales del adhesivo. El método de incorporación de las nanopartículas poliméricas a los sistemas adhesivos de uso ortodóntico depende de su concentración y del tipo de monómero, ya que afecta directamente la viabilidad celular, a pesar de que las nanopartículas sean incorporadas eficazmente a distintos linajes celulares.

9.2 Fase 2

Characterization de las CHNPs

Una de las pruebas de caracterización utilizadas en el presente estudio se realizó mediante FTIR para observar y analizar la posible interacción entre el quitosano y los antibióticos. Korniienko *et al.* (2024) indicaron que el quitosano puede unirse a otras estructuras orgánicas debido a la distribución regular de sus grupos NH_2 (116). Al analizar las CHNPs en combinación con los antibióticos, es probable que los compuestos experimenten una ruptura de enlaces al mezclarse, ya que las moléculas con tres o más átomos pueden vibrar, estirarse o doblarse a niveles de energía específicos, como lo reportan Trivedi Mahendra y Ma D (117). Sin embargo, a pesar de la similitud entre los espectros de CH y los antibióticos, estos compuestos conservan sus picos característicos; específicamente los grupos NH_2 a 1568 cm^{-1} y 1388 cm^{-1} , lo que puede atribuirse tanto a CH como a uno de los antibióticos analizados como la minociclina, como informaron Wu *et al.* 2018 (118). El ciprofloxacino a su vez muestra el anillo de fluoroquinolona (C-F) a 1037 cm^{-1} después de su mezcla con CH, como informaron Hibbard *et al.* en 2023 (119); y para el metronidazol, el grupo sulfóxido (S=O) se observa a 1577 cm^{-1} como parte de sus picos característicos que confieran la presencia de dicho antibiótico, como informaron Golj *et al.* en 2025 (120). Sin embargo, se recomienda realizar resonancia magnética nuclear, como sugieren Ma D *et al.*, para un análisis más preciso de las propiedades moleculares desde una perspectiva mecánico-cuántica. Este estudio no se realizó, ya que la investigación se centró en el efecto antibacteriano y la citotoxicidad de las nanopartículas de CH en combinación con antibióticos; no obstante, este aspecto constituye una posible vía para futuras investigaciones.

Inhibición bacteriana

Actualmente, existe una evolución constante en la investigación *in vitro*, con métodos cada vez más sofisticados para realizar pruebas de diagnóstico microbiológico e inhibir el crecimiento bacteriano o provocar la muerte bacteriana mediante la aplicación de agentes antibacterianos. De Almeida *et al.* reportaron en 2020 que *E. faecalis* tiene una prevalencia del 90 % en casos de fracaso endodóntico, lo que demuestra una alta resistencia a agentes antibacterianos como el hipoclorito de sodio (NaOCl) al 6.5 % y la clorhexidina (CHx) al 2 % (121). Sin embargo, se ha recomendado una concentración de NaOCl entre el 2 % y el 2.5 % debido a su eficacia antimicrobiana frente a *E. faecalis*. No obstante, esta concentración sigue siendo preocupante, ya que en entornos clínicos puede causar daño corrosivo a los instrumentos endodónticos, así como necrosis de tejidos blandos, como lo reportan Hung *et al.* 2023 (122). En este estudio, se realizó un ensayo de microdilución y se reporta una inhibición del 75 % de *E. faecalis* con el grupo control positivo que corresponde a la clorhexidina, lo que indica su ineficacia debido a la capacidad de la bacteria para impedir la penetración de algunos agentes antibacterianos, adherirse a superficies inorgánicas e invadir los túbulos dentinarios, como lo describen Rayos-Verdugo JY *et al.* (123). Dada su alta patogenicidad, es esencial desarrollar nuevas estrategias de tratamiento eficaces.

Palasuk *et al.* (2014) reportan que el ciprofloxacino es el antibiótico más eficaz contra *E. faecalis*, en comparación con la minociclina y el metronidazol (124). Los resultados del ensayo de difusión en agar son consistentes con los hallazgos previamente descritos; a su vez el metronidazol es eficaz contra bacterias anaerobias; sin embargo, este estudio mostró un efecto antibacteriano reducido contra *E. faecalis* en el ensayo de difusión en agar, con resultados similares a los reportados por Chamorro-Petronacci *et al.* en 2022, quienes investigaron su efecto antibacteriano cuando se incorporó en mesoesporas de sílice (125). Según Khan *et al.* (2019) el realizar un ensayo de microdilución ofrece ventajas sobre el ensayo de difusión en agar, expresando un menor margen de error y un menor riesgo de contaminación, lo que permite una evaluación objetiva y cuantitativa de la inhibición

bacteriana (109). La comparación de la inhibición bacteriana de las CHNPs con la de los antibióticos mediante ensayos de microdilución y difusión en agar revela diferencias significativas, lo cual constituye uno de los objetivos principales de este estudio. Estas implicaciones prácticas podrían tener un impacto significativo en el uso de antibióticos en microbiología. Un estudio reciente de Pascale *et al.* (2023) y de Belkadi R *et al.* (2024) concluyó que la irrigación con quitosano al 0.2 % suele ser tan eficaz como una solución de hipoclorito de sodio al 5.25 % para reducir la carga bacteriana de *E. faecalis*, lo que respalda su eficacia, como se muestra en este estudio (126,127). Korniienko V *et al.* (2024) informan sobre las propiedades de CH en medicina, debido a sus propiedades en el campo de los biomateriales, como su excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad, antibacterianas y antiinflamatorias (116). Sin embargo, es crucial considerar que cualquier biopelícula es de naturaleza polibacteriana, por lo que se requieren más estudios *in vitro* para evaluar su efecto antibacteriano frente a las diferentes bacterias presentes en la microbiota del conducto radicular. Respecto a la influencia de la temperatura durante la síntesis de CHNPs cargadas con antibióticos, ningún estudio ha reportado diferencias significativas en la inhibición bacteriana, como se evidenció en este estudio.

Citotoxicidad

La importancia de realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* radica en la necesidad de determinar si una sustancia presenta riesgos potenciales, especialmente en relación con los fármacos examinados en este estudio, y en facilitar el desarrollo de estrategias y medicamentos terapéuticos más seguros y eficaces. La combinación de metronidazol, ciprofloxacino y minociclina ha demostrado ser eficaz cuando se aplica de forma intraconducto, como lo reportan Junior *et al.*, debido a que estos antibióticos pueden esterilizar los conductos y, por lo tanto, se han investigado tanto individualmente como en combinación con biopolímeros biodegradables (128). Ahmed TA y Aljaeid BM informaron que el quitosano es el segundo polisacárido natural más abundante en la tierra y que, cuando se mezcla con ciertos fármacos, permite la formación de estructuras electrohiladas, abriendo así la posibilidad de

crear un nuevo sistema de administración de fármacos (129). En el ensayo de citotoxicidad realizado en este estudio, el ciprofloxacino y la minociclina mostraron una CC50 de 3.12 µg/mL, mientras que el metronidazol mostró una viabilidad celular entre 12.5 y 25 µg/mL en células madre de la pulpa dental humana. Vouzara T *et al.* (2016) informaron que los irrigantes endodónticos exhiben cierta citotoxicidad dependiente de la dosis y el tiempo, con resultados similares a los obtenidos cuando la dosis juega un papel crucial en este ensayo (130). La utilización de irrigantes endodónticos combinados con soluciones antibióticas o antisépticas surge de la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de desinfección capaces de abordar las limitaciones inherentes a la instrumentación mecánica por sí sola. El NaOCl se es utilizado de manera frecuente en la práctica clínica odontológica por su capacidad para disolución del tejido pulpar a en diferentes concentraciones. Sin embargo, sus efectos citotóxicos siguen resultando preocupantes, como informaron Hung *et al.* (2023), ya que su extrusión accidental puede provocar necrosis de los tejidos adyacentes (122). Además, la irrigación alternada con NaOCl y CHx puede provocar la formación de un precipitado marrón que puede contener paracloroanilina, un subproducto con potencial mutagénico. Pascale *et al.* (2023) destacaron el quitosano para su uso en endodoncia debido a sus propiedades antibacterianas, regeneradoras tisulares y quelantes (126), y Kong *et al.* (2010) demostraron que el tratamiento con quitosano mejora las propiedades mecánicas y estructurales de la dentina, ya que su uso como nanotransportador biológico proporciona ventajas adicionales en su difusión a través de la biopelícula endodóntica (131).

Alghofail M *et al.* (2024) analizaron la viabilidad y proliferación de células madre mesenquimales humanas (hMSC) utilizando un ensayo de azul alamar en andamios de quitosano-gelatina (CH-G) cargados con una formulación antibiótica de liberación lenta (Augmentin; 0.1 mg/mL), comúnmente utilizada en procedimientos endodónticos regenerativos, y métodos de tinción (132). Observaron una buena viabilidad celular. En este estudio se analizan fenotipos celulares importantes, incluyendo la multipotencia y la capacidad de diferenciación de las hMSC, comparables a las de las hDPSC utilizadas en el presente estudio. Con respecto a

la influencia de la temperatura en la síntesis de CHNPs que contienen antibióticos, ningún estudio hasta la fecha ha reportado diferencias estadísticamente significativas en el aumento de la citotoxicidad en células hDPSC, como se demostró en este estudio. Esto subraya la importancia de emplear materiales orgánicos innovadores en endodoncia que posean propiedades adecuadas para el contacto directo con los tejidos dentales o periapicales, garantizando, al mismo tiempo, su biocompatibilidad y biodegradabilidad.

10. Conclusiones

Este estudio demuestra que la nanotecnología se ha vuelto esencial en odontología, enfocándose en mejorar continuamente los materiales dentales, especialmente en sus propiedades antibacterianas y biológicas. La aplicación de nanopartículas poliméricas, como las de quitosano y PLGA destacadas en este estudio, han demostrado ser efectivas en la administración de fármacos para el tratamiento de lesiones de caries. Estas infecciones comienzan como lesiones de mancha blanca en el esmalte dental, que con el tiempo pueden provocar la exposición de la dentina y causar una hipersensibilidad dentinaria que, si no se trata de manera oportuna, puede facilitar la invasión bacteriana a través de los túbulos dentinarios y, en casos extremos, conducir a necrosis por una invasión bacteriana. Esto subraya la importancia de investigar ambas áreas de la odontología, en especial en ortodoncia y endodoncia, ya que en ambas ramas resulta necesario un seguimiento adecuado para evitar la formación de una biopelícula polibacteriana y, por ende, su colonización y establecimiento en el tejido dental.

10.1 Fase 1

Este estudio revela que las NPs-PLGA presentan un gran potencial al ser aplicadas en los sistemas adhesivos de uso ortodóntico utilizados para la cementación de la aparatología fija, ya que presentan un buen efecto antibacteriano y una baja citotoxicidad, lo que mejora sus propiedades biológicas. Las NPs-PLGA-CHx mostraron la mayor actividad antibacteriana contra *S. mutans* tanto en ensayos de difusión en agar como en ensayos de microdilución; sin embargo, al incorporarlas al adhesivo de uso ortodóntico, presentaron una mayor citotoxicidad. Las NPs-PLGA inhibieron eficazmente a *S. mutans* en el ensayo de microdilución; sin embargo, los resultados del ensayo de difusión en agar fueron menos favorables, lo que evidenció una menor citotoxicidad en HGF. Por el contrario, las NPs-PLGA-CH mostraron efectos antibacterianos superiores a los de las NPs-PLGA en ensayos de microdilución, mientras que los resultados del ensayo de difusión en agar fueron menos favorables.

10.2 Fase 2

El quitosano se ha convertido en uno de los biopolímeros biodegradables más prometedores gracias a su citotoxicidad de moderada a baja, su buena actividad antibacteriana, su biocompatibilidad y su uso como transportador de fármacos. Su uso como irrigante endodóntico, combinado con antibióticos de amplio espectro, ha despertado un creciente interés debido a su potencial para mejorar la eficacia antibacteriana y la biocompatibilidad, lo que alienta nuevas estrategias terapéuticas en este ámbito. La combinación de CHNPs-ciprofloxacino mostró una excelente actividad antibacteriana contra *E. faecalis* tanto en el ensayo de difusión en agar como en el ensayo de microdilución, lo que la convierte en la mejor opción entre las nanopartículas analizadas para erradicar esta bacteria. La combinación de CH-NPs-metronidazol suprimió eficazmente al *E. faecalis* en ensayos de microdilución y también presentó una menor citotoxicidad en hDPSC. Por el contrario, la combinación de CH-NPs-minociclina demostró mejores efectos antibacterianos que el quitosano simple en pruebas de microdilución, aunque presentó una mayor citotoxicidad; los resultados de difusión en agar fueron menos prometedores. Los cambios en la temperatura de síntesis no afectaron significativamente la actividad antibacteriana ni la citotoxicidad de las CHNPs, lo que indica la necesidad de realizar más investigación para optimizar su uso en endodoncia. Este estudio aporta información importante para las aplicaciones endodónticas y constituye un paso fundamental para futuras investigaciones.

No obstante, es importante destacar que la aplicación de la nanotecnología en odontología sigue en constante evolución y, hasta la fecha, es relativamente poco explorada.

11. Referencias bibliográficas

1. Vitiello F, Tosco V, Monterubbianesi R, Orilisi G, Gatto ML, Sparabombe S, et al. Remineralization Efficacy of Four Remineralizing Agents on Artificial Enamel Lesions: SEM-EDS Investigation. *Mater Basel Switz.* el 22 de junio de 2022;15(13):4398.
2. Salazar NG. Vias de la pulpa. [citado el 22 de noviembre de 2025]; Disponible en: https://www.academia.edu/43419273/Vias_de_la_pulpa
3. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet Lond Engl.* el 6 de enero de 2007;369(9555):51–9.
4. Brindis E. Endodoncia TÉCNICAS CLÍNICAS Y BASES CIENTÍFICAS. [citado el 22 de noviembre de 2025]; Disponible en: https://www.academia.edu/40060605/Endodoncia_T%C3%89CNICAS_CL%C3%8DNICAS_Y_BASES_CIENT%C3%8DFICAS
5. Karamifar K, Tondari A, Saghiri MA. Endodontic Periapical Lesion: An Overview on the Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities. *Eur Endod J.* 2020;5(2):54–67.
6. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primer.* el 25 de mayo de 2017;3:17030.
7. Bardini G, Casula L, Ambu E, Musu D, Mercadè M, Cotti E. A 12-month follow-up of primary and secondary root canal treatment in teeth obturated with a hydraulic sealer. *Clin Oral Investig.* mayo de 2021;25(5):2757–64.
8. Perdigão J. Resin infiltration of enamel white spot lesions: An ultramorphological analysis. *J Esthet Restor Dent Off Publ Am Acad Esthet Dent Al.* abril de 2020;32(3):317–24.
9. Chapman JA, Roberts WE, Eckert GJ, Kula KS, González-Cabezas C. Risk factors for incidence and severity of white spot lesions during treatment with fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod Its Const Soc Am Board Orthod.* agosto de 2010;138(2):188–94.
10. Gorelick L, Geiger AM, Gwinnett AJ. Incidence of white spot formation after bonding and banding. *Am J Orthod.* febrero de 1982;81(2):93–8.
11. Cosma LL, Şuhani RD, Mesaroş A, Badea ME. Current treatment modalities of orthodontically induced white spot lesions and their outcome - a literature review. *Med Pharm Rep.* enero de 2019;92(1):25–30.
12. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. *Literature*

- review. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal*. el 1 de mayo de 2019;24(3):e364–72.
13. Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015;5(1):1–12.
 14. Al-Blaihed D, El Meligy O, Baghlaf K, Aljawi RA, Abudawood S. White Spot Lesions in Fixed Orthodontics: A Literature Review on Etiology, Prevention, and Treatment. *Cureus*. julio de 2024;16(7):e65679.
 15. Jayakumar S, Sridhar D, John BM, Arumugam K, Ponnusamy P, Pulidindi H. Biofilm in Endodontic Infection and its Advanced Therapeutic Options – An Updated Review. *J Pharm Bioallied Sci*. abril de 2024;16(Suppl 2):S1104–9.
 16. Paster BJ, Dewhirst FE. Molecular microbial diagnosis. *Periodontol* 2000. 2009;51:38–44.
 17. Gutmann JL, Manjarrés V. Historical and Contemporary Perspectives on the Microbiological Aspects of Endodontics. *Dent J*. el 22 de septiembre de 2018;6(4):49.
 18. Grenier D, Mayrand D. Nutritional relationships between oral bacteria. *Infect Immun*. septiembre de 1986;53(3):616–20.
 19. Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *Int Endod J*. mayo de 2019;52(5):604–28.
 20. Mishra R, Panda AK, De Mandal S, Shakeel M, Bisht SS, Khan J. Natural Antibiofilm Agents: Strategies to Control Biofilm-Forming Pathogens. *Front Microbiol*. 2020;11:566325.
 21. Santonocito S, Polizzi A. Oral Microbiota Changes during Orthodontic Treatment. *Front Biosci Elite Ed*. el 27 de julio de 2022;14(3):19.
 22. Ibrahim A, Moodley D, Uche C, Maboza E, Olivier A, Petrik L. Antimicrobial and cytotoxic activity of electrosprayed chitosan nanoparticles against endodontic pathogens and Balb/c 3T3 fibroblast cells. *Sci Rep*. el 29 de diciembre de 2021;11(1):24487.
 23. Beg AM, Jones MN, Miller-Torbert T, Holt RG. Binding of *Streptococcus mutans* to extracellular matrix molecules and fibrinogen. *Biochem Biophys Res Commun*. el 18 de octubre de 2002;298(1):75–9.
 24. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. septiembre de 2009;73(3):407–50, Table of Contents.

25. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends Microbiol.* marzo de 2018;26(3):229–42.
26. Lancefield RC. A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF HUMAN AND OTHER GROUPS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI. *J Exp Med.* el 31 de marzo de 1933;57(4):571–95.
27. Kelly C, Evans P, Bergmeier L, Lee SF, Progulske-Fox A, Harris AC, et al. Sequence analysis of the cloned streptococcal cell surface antigen I/II. *FEBS Lett.* el 20 de noviembre de 1989;258(1):127–32.
28. Raura N, Garg A, Arora A, Roma M. Nanoparticle technology and its implications in endodontics: a review. *Biomater Res.* el 4 de diciembre de 2020;24(1):21.
29. Reffluveille F, Leneveu C, Chevalier S, Auffray Y, Rincé A. Lipoproteins of *Enterococcus faecalis*: bioinformatic identification, expression analysis and relation to virulence. *Microbiol Read Engl.* noviembre de 2011;157(Pt 11):3001–13.
30. Kim MA, Rosa V, Min KS. Characterization of *Enterococcus faecalis* in different culture conditions. *Sci Rep.* el 14 de diciembre de 2020;10(1):21867.
31. Boutsoukis C, Arias-Moliz MT. Present status and future directions - irrigants and irrigation methods. *Int Endod J.* mayo de 2022;55 Suppl 3(Suppl 3):588–612.
32. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J.* diciembre de 2008;58(6):329–41.
33. Gomes BPPFA, Aveiro E, Kishen A. Irrigants and irrigation activation systems in Endodontics. *Braz Dent J.* 2023;34(4):1–33.
34. Segura-Egea JJ, Gould K, Şen BH, Jonasson P, Cotti E, Mazzone A, et al. Antibiotics in Endodontics: a review. *Int Endod J.* diciembre de 2017;50(12):1169–84.
35. Biblioteca virtual AMOLCA [Internet]. [citado el 22 de noviembre de 2025]. Endodoncia de la Biología a la Técnica. Disponible en: <https://ebooks.amolca.com/library/publication/endodoncia-de-la-biologia-a-la-tecnica>
36. Falcao Costa C, Moura E Sá A, Faria Almeida R, Bascones A. Antibioterapia en Periodoncia: Situación actual I- Antibióticos Sistémicos. *Av En Periodoncia E Implantol Oral.* abril de 2001;13(1):39–47.

37. Chouchene F, Masmoudi F, Baaziz A, Maatouk F, Ghedira H. Antibiotic Mixtures in Noninstrumental Endodontic Treatment of Primary Teeth with Necrotic Pulp: A Systematic Review. *Int J Dent.* 2021;2021:5518599.
38. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J.* marzo de 1996;29(2):125–30.
39. Dingsdag SA, Hunter N. Metronidazole: an update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother.* el 1 de febrero de 2018;73(2):265–79.
40. Zhang GF, Liu X, Zhang S, Pan B, Liu ML. Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. *Eur J Med Chem.* el 25 de febrero de 2018;146:599–612.
41. Campoli-Richards DM, Monk JP, Price A, Benfield P, Todd PA, Ward A. Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs.* abril de 1988;35(4):373–447.
42. Singh S, Khanna D, Kalra S. Minocycline and Doxycycline: More Than Antibiotics. *Curr Mol Pharmacol.* 2021;14(6):1046–65.
43. Cockings JM, Savage NW. Minocycline and oral pigmentation. *Aust Dent J.* febrero de 1998;43(1):14–6.
44. Nakornchai S, Banditsing P, Visetratana N. Clinical evaluation of 3Mix and Vitapex as treatment options for pulpally involved primary molars. *Int J Paediatr Dent.* mayo de 2010;20(3):214–21.
45. Hu H, Feng C, Jiang Z, Wang L, Shrestha S, Yan J, et al. Effectiveness of remineralizing agents in the prevention and reversal of orthodontically induced white spot lesions: a systematic review and network meta-analysis. *Clin Oral Investig.* diciembre de 2020;24(12):4153–67.
46. Ning TY, Xu XH, Zhu LF, Zhu XP, Chu CH, Liu LK, et al. Biomimetic mineralization of dentin induced by agarose gel loaded with calcium phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* enero de 2012;100(1):138–44.
47. Nimbeni SB, Nimbeni BS, Divakar DD. Role of Chitosan in Remineralization of Enamel and Dentin: A Systematic Review. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2021;14(4):562–8.
48. Lipták L, Szabó K, Nagy G, Márton S, Madléna M. Microbiological Changes and Caries-Preventive Effect of an Innovative Varnish Containing Chlorhexidine in Orthodontic Patients. *Caries Res.* 2018;52(4):272–8.

49. Seguya A, Mowafy M, Gaballah A, Zaher A. Chlorhexidine versus organoselenium for inhibition of *S. mutans* biofilm, an in vitro study. *BMC Oral Health*. el 20 de enero de 2022;22(1):14.
50. Martínez-Hernández M, Reda B, Hannig M. Chlorhexidine rinsing inhibits biofilm formation and causes biofilm disruption on dental enamel in situ. *Clin Oral Investig*. noviembre de 2020;24(11):3843–53.
51. Scribante A, Contreras-Bulnes R, Montasser MA, Vallittu PK. Orthodontics: Bracket Materials, Adhesives Systems, and Their Bond Strength. *BioMed Res Int*. 2016;2016:1329814.
52. Millett DT, Glenny AM, Mattick RC, Hickman J, Mandall NA. Adhesives for fixed orthodontic bands. *Cochrane Database Syst Rev*. el 25 de octubre de 2016;10(10):CD004485.
53. Preusser S, Klimm W, Pöschmann M, Koch R. Microbial ingrowth around single- and multi-component adhesives studied in vitro. *Caries Res*. 2003;37(5):345–51.
54. Siddarth B, Aileni KR, Rachala MR, Dasari AK, Mallepally JP, Thadisina PR, et al. Comparative evaluation and influence of new Optibond eXTRa self-etch Universal adhesive and conventional Transbond XT on shear bond strength of orthodontic brackets-An in vitro study. *J Orthod Sci*. 2022;11:43.
55. Armstrong D, Shen G, Petocz P, Darendeliler MA. Excess adhesive flash upon bracket placement. A typodont study comparing APC PLUS and Transbond XT. *Angle Orthod*. noviembre de 2007;77(6):1101–8.
56. Romano FL, Correr AB, Correr-Sobrinho L, Magnani MBB de A, Ruellas AC de O. Clinical evaluation of the failure rates of metallic brackets. *J Appl Oral Sci Rev FOB*. 2012;20(2):228–34.
57. Aeran H, Kumar V, Uniyal S, Tanwer P. Nanodentistry: Is just a fiction or future. *J Oral Biol Craniofacial Res*. 2015;5(3):207–11.
58. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*. el 24 de febrero de 2003;55(3):329–47.
59. Nashaat Y, Sabry H, Hassan SA. Evaluation of the Cytotoxicity and apoptotic effect of Nano triple antibiotic paste with Nano anti-inflammatory drug as an intracanal medicament. *Eur Endod J*. abril de 2021;6(1):82–9.
60. Nogueira DR, Mitjans M, Rolim CMB, Vinardell MP. Mechanisms Underlying Cytotoxicity Induced by Engineered Nanomaterials: A Review of In Vitro Studies. *Nanomater Basel Switz*. el 12 de junio de 2014;4(2):454–84.

61. Polymeric Dental Nanomaterials: Antimicrobial Action [Internet]. [citado el 22 de noviembre de 2025]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4360/14/5/864>
62. Roig-Soriano X, Souto EB, Elmsmari F, Garcia ML, Espina M, Duran-Sindreu F, et al. Nanoparticles in Endodontics Disinfection: State of the Art. *Pharmaceutics*. el 21 de julio de 2022;14(7):1519.
63. Kozicki M, Pawlaczyk A, Adamska A, Szyrkowska-Jóźwik MI, Sąsiadek-Andrzejczak E. Golden and Silver-Golden Chitosan Hydrogels and Fabrics Modified with Golden Chitosan Hydrogels. *Int J Mol Sci*. el 12 de mayo de 2022;23(10):5406.
64. Makkar H, Patri G. Fabrication and Appraisal of Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) - Moxifloxacin Nanoparticles using Vitamin E-TPGS: A Potential Intracanal Drug Delivery Agent. *J Clin Diagn Res JCDR*. junio de 2017;11(6):ZC05–8.
65. Ortega-Oller I, Padiál-Molina M, Galindo-Moreno P, O'Valle F, Jódar-Reyes AB, Peula-García JM. Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles. *BioMed Res Int*. 2015;2015:415289.
66. Mahmoud MY, Steinbach-Rankins JM, Demuth DR. Functional assessment of peptide-modified PLGA nanoparticles against oral biofilms in a murine model of periodontitis. *J Control Release Off J Control Release Soc*. el 10 de marzo de 2019;297:3–13.
67. Kozicki M, Pawlaczyk A, Adamska A, Szyrkowska-Jóźwik MI, Sąsiadek-Andrzejczak E. Golden and Silver-Golden Chitosan Hydrogels and Fabrics Modified with Golden Chitosan Hydrogels. *Int J Mol Sci*. el 12 de mayo de 2022;23(10):5406.
68. Makkar H, Patri G. Fabrication and Appraisal of Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) - Moxifloxacin Nanoparticles using Vitamin E-TPGS: A Potential Intracanal Drug Delivery Agent. *J Clin Diagn Res JCDR*. junio de 2017;11(6):ZC05–8.
69. Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles - Ortega-Oller - 2015 - *BioMed Research International - Wiley Online Library* [Internet]. [citado el 23 de noviembre de 2025]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2015/415289>
70. Mahmoud MY, Steinbach-Rankins JM, Demuth DR. Functional assessment of peptide-modified PLGA nanoparticles against oral biofilms in a murine model of periodontitis. *J Control Release Off J Control Release Soc*. el 10 de marzo de 2019;297:3–13.
71. Macià MD, Del Pozo JL, Díez-Aguilar M, Guinea J. Microbiological diagnosis of biofilm-related infections. *Enfermedades Infecc Microbiol Clin Engl Ed*. 2018;36(6):375–81.

72. Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol.* febrero de 2001;183(3):1047–57.
73. Macià MD, Del Pozo JL, Díez-Aguilar M, Guinea J. Microbiological diagnosis of biofilm-related infections. *Enfermedades Infecc Microbiol Clin Engl Ed.* 2018;36(6):375–81.
74. Cresti L, Cappello G, Pini A. Antimicrobial Peptides towards Clinical Application- A Long History to Be Concluded. *Int J Mol Sci.* el 29 de abril de 2024;25(9):4870.
75. Pataky L, Iványi I, Grigár A, Fazekas A. Antimicrobial efficacy of various root canal preparation techniques: an in vitro comparative study. *J Endod.* agosto de 2002;28(8):603–5.
76. Ibrahim AM, Zakhary SY, Amin SAW. Calcium hydroxide intracanal medication effects on pain and flare-up: a systematic review and meta-analysis. *Restor Dent Endod.* agosto de 2020;45(3):e26.
77. Todaro B, Moscardini A, Luin S. Pioglitazone-Loaded PLGA Nanoparticles: Towards the Most Reliable Synthesis Method. *Int J Mol Sci.* el 25 de febrero de 2022;23(5):2522.
78. Ahmadi H, Haddadi-Asl V, Ghafari HA, Ghorbanzadeh R, Mazlum Y, Bahador A. Shear bond strength, adhesive remnant index, and anti-biofilm effects of a photoexcited modified orthodontic adhesive containing curcumin doped poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles: An ex-vivo biofilm model of *S. mutans* on the enamel slab bonded brackets. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* junio de 2020;30:101674.
79. Kamran MA, Alshahrani A, Alnazeh AA, Udeabor SE, Qasim M, Alshahrani I. Ultrastructural and physicochemical characterization of pH receptive chlorhexidine-loaded poly-L-glycolic acid-modified orthodontic adhesive. *Microsc Res Tech.* marzo de 2022;85(3):996–1004.
80. Arafa MG, Mousa HA, Afifi NN. Preparation of PLGA-chitosan based nanocarriers for enhancing antibacterial effect of ciprofloxacin in root canal infection. *Drug Deliv.* diciembre de 2020;27(1):26–39.
81. Hegde V, Srilatha S, Vangala A, Khandwawalla N, Mujawar A. Antimicrobial efficacy of triple antibiotic-loaded chitosan nanoparticles activated with photochemical disinfection: A microbiological and confocal microscopic analysis. *J Conserv Dent JCD.* 2022;25(3):252–7.
82. Song Y, Cong Y, Wang B, Zhang N. Applications of Fourier transform infrared spectroscopy to pharmaceutical preparations. *Expert Opin Drug Deliv.* abril de 2020;17(4):551–71.

83. Chiesa E, Pisani S, Colzani B, Dorati R, Conti B, Modena T, et al. Intra-Articular Formulation of GE11-PLGA Conjugate-Based NPs for Dexamethasone Selective Targeting-In Vitro Evaluation. *Int J Mol Sci.* el 6 de agosto de 2018;19(8):2304.
84. Flores-Ramírez VE, Aranda-Herrera B, Guzmán-Rocha D, García-Contreras R. Efecto citotóxico de nanopartículas de MgO y ZnO en cultivo con células de cáncer oral: nanoacarreadores para tratamientos quimioterapéuticos. *Mundo Nano Rev Interdiscip En Nanociencias Nanotecnología* [Internet]. diciembre de 2025 [citado el 24 de noviembre de 2025];18(35). Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2448-56912025000200101&lng=es&nrm=iso&tlng=es
85. Qi J, Gong M, Zhang R, Song Y, Liu Q, Zhou H, et al. Evaluation of the antibacterial effect of tea tree oil on *Enterococcus faecalis* and biofilm in vitro. *J Ethnopharmacol.* el 5 de diciembre de 2021;281:114566.
86. Bautista-Martinez D, Scougall-Vilchis RJ, Contreras-Bulnes R, Garcia-Contreras R. Assessment of cytotoxicity, odontoblast-like differentiation, shear bond strength, and microhardness of four orthodontic adhesive composites. *J Oral Sci.* el 16 de octubre de 2024;66(4):220–5.
87. Flores-Ramírez VE, Aranda-Herrera B, Guzmán-Rocha D, García-Contreras R. Efecto citotóxico de nanopartículas de MgO y ZnO en cultivo con células de cáncer oral: nanoacarreadores para tratamientos quimioterapéuticos. *Mundo Nano Rev Interdiscip En Nanociencias Nanotecnología.* el 5 de agosto de 2025;18(35):e69819–e69819.
88. Lopez-Ayuso CA, Garcia-Contreras R, Manisekaran R, Figueroa M, Rangel-Grimaldo M, Jacome M, et al. Biological and mechanical properties of a self-curing acrylic resin enriched with AgNPs as a proposal for orthopedic aparatology. *Nanoscale Adv.* el 25 de marzo de 2025;7(7):2068–82.
89. Geranium leaf-mediated synthesis of silver nanoparticles ... [Internet]. [citado el 24 de noviembre de 2025]. Disponible en: <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/gps-2022-8105/html?srsIid=AfmBOopnVpqnOWuq-hCjBnhKyhIfc1Wmcku5XzQlIEMh5OISFTV4nH0H>
90. Silver-Nanoparticles-Based Composites for Antimicrobial Applications: An Update - Manisekaran - 2024 - ChemistrySelect - Wiley Online Library [Internet]. [citado el 24 de noviembre de 2025]. Disponible en: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/slct.202403772>
91. Manual para La Enseñanza Práctica Del ENSAYO MTT PARA EVALUAR LA Citotoxicidad de Nanopartículas | PDF [Internet]. [citado el 24 de noviembre de 2025]. Disponible en:

<https://es.scribd.com/document/564684154/Manualparalaenseanzaprcticadelen sayoMTTparaevaluarlacitotoxicidaddenanopartculas>

92. Rizeq BR, Younes NN, Rasool K, Nasrallah GK. Synthesis, Bioapplications, and Toxicity Evaluation of Chitosan-Based Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* el 16 de noviembre de 2019;20(22):5776.
93. Velusamy G, Unnikrishnan A, Ponnuvelu DV, Rajendran S, Park S, Pullithadathil B. Analysis of Conventional and Enhanced-Biocompatibility ZnO/Ag Heterojunction Nanorod-Based Advanced Root Canal Sealers. *Bioengineering.* el 26 de agosto de 2025;12(9):917.
94. Veerapandian M, Yun K. Functionalization of biomolecules on nanoparticles: specialized for antibacterial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* junio de 2011;90(5):1655–67.
95. Liu L, Xu K, Wang H, Tan PKJ, Fan W, Venkatraman SS, et al. Self-assembled cationic peptide nanoparticles as an efficient antimicrobial agent. *Nat Nanotechnol.* julio de 2009;4(7):457–63.
96. Hegde V, Srilatha S, Vangala A, Khandwawalla N, Mujawar A. Antimicrobial efficacy of triple antibiotic-loaded chitosan nanoparticles activated with photochemical disinfection: A microbiological and confocal microscopic analysis. *J Conserv Dent JCD.* 2022;25(3):252–7.
97. Song Y, Cong Y, Wang B, Zhang N. Applications of Fourier transform infrared spectroscopy to pharmaceutical preparations. *Expert Opin Drug Deliv.* abril de 2020;17(4):551–71.
98. Chiesa E, Pisani S, Colzani B, Dorati R, Conti B, Modena T, et al. Intra-Articular Formulation of GE11-PLGA Conjugate-Based NPs for Dexamethasone Selective Targeting-In Vitro Evaluation. *Int J Mol Sci.* el 6 de agosto de 2018;19(8):2304.
99. Qi J, Gong M, Zhang R, Song Y, Liu Q, Zhou H, et al. Evaluation of the antibacterial effect of tea tree oil on *Enterococcus faecalis* and biofilm in vitro. *J Ethnopharmacol.* el 5 de diciembre de 2021;281:114566.
100. Jimenez-Bueno I, Garcia-Contreras R, Aranda-Herrera B, Sakagami H, Lopez-Ayuso CA, Nakajima H, et al. Cytotoxicity, Differentiation, and Biocompatibility of Root-End Filling: A Comprehensive Study. *Biomimetics.* noviembre de 2023;8(7):514.
101. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* el 27 de noviembre de 2013;310(20):2191–4.

102. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.
103. Sadat Tabatabaei Mirakabad F, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Yamchi MR, Milani M, Zarghami N, et al. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2014;15(2):517–35.
104. Priyadarshini BM, Mitali K, Lu TB, Handral HK, Dubey N, Fawzy AS. PLGA nanoparticles as chlorhexidine-delivery carrier to resin-dentin adhesive interface. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater*. julio de 2017;33(7):830–46.
105. Hagai T, Chen X, Miragaia RJ, Rostom R, Gomes T, Kunowska N, et al. Gene expression variability across cells and species shapes innate immunity. *Nature*. noviembre de 2018;563(7730):197–202.
106. Budi HS, Jameel MF, Widjaja G, Alasady MS, Mahmudiono T, Mustafa YF, et al. Study on the role of nano antibacterial materials in orthodontics (a review). *Braz J Biol Rev Brasileira Biol*. 2022;84:e257070.
107. Sundararaj D, Venkatachalapathy S, Tandon A, Pereira A. Critical evaluation of incidence and prevalence of white spot lesions during fixed orthodontic appliance treatment: A meta-analysis. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015;5(6):433–9.
108. Salam MA, Al-Amin MY, Pawar JS, Akhter N, Lucy IB. Conventional methods and future trends in antimicrobial susceptibility testing. *Saudi J Biol Sci*. marzo de 2023;30(3):103582.
109. Khan ZA, Siddiqui MF, Park S. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagn Basel Switz*. el 3 de mayo de 2019;9(2):49.
110. Khanal S, Adhikari U, Rijal NP, Bhattarai SR, Sankar J, Bhattarai N. pH-Responsive PLGA Nanoparticle for Controlled Payload Delivery of Diclofenac Sodium. *J Funct Biomater*. el 2 de agosto de 2016;7(3):21.
111. Li Z, Xiong F, He J, Dai X, Wang G. Surface-functionalized, pH-responsive poly(lactic-co-glycolic acid)-based microparticles for intranasal vaccine delivery: Effect of surface modification with chitosan and mannan. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV*. diciembre de 2016;109:24–34.
112. Cadenaro M, Josic U, Maravić T, Mazzitelli C, Marchesi G, Mancuso E, et al. Progress in Dental Adhesive Materials. *J Dent Res*. marzo de 2023;102(3):254–62.
113. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig*. marzo de 2008;12(1):1–8.

114. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res.* el 5 de septiembre de 1998;41(3):474–80.
115. Cytotoxicity and shear bond strength of four orthodontic adhesive systems | *European Journal of Orthodontics* | Oxford Academic [Internet]. [citado el 25 de noviembre de 2025]. Disponible en: <https://academic.oup.com/ejo/article-abstract/30/5/495/473515>
116. Korniienko V, Husak Y, Diedkova K, Varava Y, Grebnevs V, Pogorielova O, et al. Antibacterial Potential and Biocompatibility of Chitosan/Polycaprolactone Nanofibrous Membranes Incorporated with Silver Nanoparticles. *Polymers.* enero de 2024;16(12):1729.
117. Kumar Trivedi M. Spectroscopic Characterization of Biofield Treated Metronidazole and Tinidazole. *Med Chem* [Internet]. 2015 [citado el 28 de septiembre de 2025];5(7). Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/spectroscopic-characterization-of-biofield-treated-metronidazole-andtinidazole-2161-0444-1000283.php?aid=57786>
118. Wu L, Chen W, Li F, Morrow BR, Garcia-Godoy F, Hong L. Sustained Release of Minocycline From Minocycline-Calcium-Dextran Sulfate Complex Microparticles for Periodontitis Treatment. *J Pharm Sci.* diciembre de 2018;107(12):3134–42.
119. Hibbard T, Nyambura B, Scholes P, Totolici M, Shankland K, Al-Obaidi H. Preparation and Physicochemical Analysis of Novel Ciprofloxacin / Dicarboxylic Acid Salts. *J Pharm Sci.* enero de 2023;112(1):195–203.
120. Golj DR, Dinka MO, Sherefedin U, Belay A, Gelanu D, Megersa GD. Solvent polarity effects on the FTIR spectrum, and thermodynamic and electronic properties of metronidazole and its binding with antibacterial drugs: a DFT and molecular docking study. *RSC Adv.* 15(35):28538–54.
121. de Almeida J, Cechella BC, Bernardi AV, de Lima Pimenta A, Felipe WT. Effectiveness of nanoparticles solutions and conventional endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Indian J Dent Res Off Publ Indian Soc Dent Res.* 2018;29(3):347–51.
122. Hung WK, Mahyuddin A, Sockalingam SNMP, Shafiei Z, Abdul Rahman M, Mahamad Apandi NI, et al. Cytotoxic Evaluation of Effective Ecoproduce (EEP) as a Potential Root Canal Irrigant: A Preliminary In Vitro Study. *Appl Sci.* enero de 2023;13(18):10125.
123. Rayos-Verdugo JY, Rivera-Chaparro F, Castro-Salazar GY, Ramírez-Álvarez M, Romero-Quintana JG, Loyola-Rodríguez JP, et al. Propylene Glycol Potentiates the Inhibitory Action of CTZ Paste on Antibiotic-Resistant

- Enterococcus faecalis Isolated from the Root Canal: An In Vitro Study. *Microorganisms*. el 31 de agosto de 2023;11(9):2208.
124. Palasuk J, Kamocki K, Hippenmeyer L, Platt JA, Spolnik KJ, Gregory RL, et al. Bimix antimicrobial scaffolds for regenerative endodontics. *J Endod*. noviembre de 2014;40(11):1879–84.
125. Chamorro-Petronacci CM, Torres BS, Guerrero-Nieves R, Pérez-Sayáns M, Carvalho-de Abreu Fantini M, Cides-da-Silva LC, et al. Efficacy of Ciprofloxacin, Metronidazole and Minocycline in Ordered Mesoporous Silica against Enterococcus faecalis for Dental Pulp Revascularization: An In-Vitro Study. *Materials*. enero de 2022;15(6):2266.
126. Pascale C, Geaman J, Mendoza C, Gao F, Kaminski A, Cuevas-Nunez M, et al. In vitro assessment of antimicrobial potential of low molecular weight chitosan and its ability to mechanically reinforce and control endogenous proteolytic activity of dentine. *Int Endod J*. noviembre de 2023;56(11):1337–49.
127. Belkadi R, Sanz-Serrano D, Ventura F, Mercade M. Chitosan-based endodontic irrigation solutions and TGF- β 1 treatment: Creating the most favourable environment for the survival and proliferation of stem cells of the apical papilla in vitro. *Int Endod J*. octubre de 2024;57(10):1492–504.
128. Siqueira Junior JF, Rôças I das N, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. *Braz Oral Res*. el 18 de octubre de 2018;32(suppl 1):e65.
129. Ahmed HMA, Rossi-Fedele G, Dummer PMH. Critical analysis of a new system to classify root and canal morphology - A systematic review. *Aust Endod J J Aust Soc Endodontology Inc*. diciembre de 2023;49(3):750–68.
130. Vouzara T, Koulaouzidou E, Ziouti F, Economides N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *Int Endod J*. agosto de 2016;49(8):764–73.
131. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol*. el 15 de noviembre de 2010;144(1):51–63.
132. Alghofaily M, Almana A, Alrayes J, Lambarte R, Weir MD, Alsalleeh F. Chitosan–Gelatin Scaffolds Loaded with Different Antibiotic Formulations for Regenerative Endodontic Procedures Promote Biocompatibility and Antibacterial Activity. *J Funct Biomater*. julio de 2024;15(7):186.