



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
SUPERIORES UNIDAD LEÓN**

**Evaluación de las propiedades físico-
biológicas de un hidrogel de Gelatina
tipo A/PVA funcionalizado con *Camellia
Sinensis*. Evaluación *in vitro***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Licenciada en Odontología**

**P R E S E N T A:
María Clarisa Salazar Nava**

**Tutor:
M. en C. Patricia Alejandra Chávez
Granados**

**Asesor:
Dr. René García Contreras**



**UNAM
ENES LEÓN**

León, Guanajuato, octubre 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

Quiero dedicar este proyecto de investigación a mis papás y a mis abuelos, que fueron un pilar fundamental en mi desarrollo personal y profesional durante toda mi carrera, siempre apoyando mis decisiones, acompañándome en todo momento y siendo mi incondicional soporte económico. Gracias por nunca dejarme caer, y por nunca permitir que me hiciera falta algo para mis clínicas o prácticas.

A mis gatitos Vigo y Pantera que en algún momento fueron mi gran salvación de caer en la locura. Mi eterna compañía y uno de los mayores motivos de mi felicidad, los que me han enseñado una de las formas más puras de amar y ser amada.

Igualmente dedicarlo a las personas que no son mi familia, pero decidieron acompañarme durante la carrera, mi año de servicio social y hasta la fecha, gracias a Fabián, mi novio y a mis amigos por todo el apoyo emocional, las risas y buenos momentos, aprendizajes y crecimiento que he vivido con su valiosa compañía.

También, a todos los doctores que fueron parte de mi formación académica y profesional, que siempre estuvieron para enseñarme, y ayudarme a explotar mi potencial. Siempre estaré muy agradecida por su enriquecedora participación en mi trayectoria académica.

Finalmente, a la Clari de hace algunos años, que se sentía tan incapaz, insegura e insuficiente, que en algún momento no se podía ni parar de la cama por la tremenda depresión y ansiedad que tenía cargando. Quiero decirte que hoy estoy muy orgullosa de la gran evolución personal que hemos logrado con esfuerzo, dedicación y constancia, y que de no haber pasado por todo lo que vivimos antes, no seríamos nada lo que hoy celebramos.

Agradecimientos

Se agradece al Programa de Proyectos para la Investigación e Innovación (PAPIT IT200922) y al Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación (PAPIME PE203622) por financiar este proyecto de investigación.

A la Dra. Patricia Alejandra Chávez Granados por su constante apoyo y excelente dirección sobre este proyecto, por enseñarme a manejar todos los aparatos que se usan en el área de Nanoestructuras y Biomateriales del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la ENES, Unidad León, y enseñarme a hacer los experimentos correspondientes a este proyecto.

Al Dr. Benjamín Aranda Herrera, por apoyarme con los ensayos de citotoxicidad en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la ENES, Unidad León. Por siempre estar dispuesto a explicarme cualquier duda referente a mi proyecto y por todas las veces que me asesoró en los temas necesarios de estadística.

Al Dr. René García Contreras de quien siempre tuve el apoyo y la asesoría para llevar a cabo mis experimentos de la forma más eficiente.

A todos los doctores que forman parte del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la ENES, Unidad León, porque cada uno me apoyó de alguna forma en diferentes momentos durante el desarrollo de mi tesis.

Abreviaturas

mL	mililitro	EATV	Extracto acuoso de té verde
gr	gramo	OH	Hidróxido
µL	microlitro	COOH	Ácido carboxílico
mm	milímetro	CONH	Amida
nm	nanómetro	SO ₃ H	Ácido bencensulfónico
°C	grados Celsius	M-H	Mueller Hinton
rpm	revoluciones por minuto	G	Gelatina tipo A
min	minutos	CHX	Clorhexidina
h	hora		
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>		
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>		
PSA	Prueba de sensibilidad antimicrobiana		
MTT	<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>		
DMSO	Dimetilsulfóxido		
H ₂ O <i>milli Q</i>	Agua desionizada		
PBS	Buffer de fosfato salino		
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético		
PVA	Poli (vinil alcohol)		
U.V.	Ultravioleta		
Vis	Visible		
PDLSCs	Periodontal ligament stem cells		
ST	Solución de trabajo		

Índice

.....	1
Resumen.....	7
Abstract.....	8
1. Introducción.....	9
2. Marco teórico.....	11
2.1 Hidrogeles	11
2.1. Clasificación de los hidrogeles.....	11
2.1.1. Relevancia clínica del uso de hidrogeles.....	12
2.1.2. Métodos de caracterización de los hidrogeles.....	13
2.2. Gelatina tipo A.....	14
2.3. PVA.....	14
2.4. <i>Camellia Sinensis</i>	15
2.5. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana (PSA)	16
2.5.1. <i>Streptococcus mutans</i>	17
2.5.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.5.3. <i>Escherichia coli</i>	18
2.6. Líneas celulares.....	19
2.6.1. Células del Ligamento Periodontal (PDLSCs)	20
2.7. Citotoxicidad.....	20
2.8. Ensayos de citotoxicidad	21
2.9. Espectrofotometría de Luz ultravioleta (UV Vis)	22
2.9.1. Absorbancia	23
3. Antecedentes.....	24
4. Objetivos.....	26
4.1. Objetivo general.....	26
4.2. Objetivos específicos	26
5. Planteamiento del problema.....	27
6. Justificación	29
7. Pregunta de investigación.....	30
8. Hipótesis.....	31
9. Diseño de estudio	32

9.1. Variables del estudio	33
9.2. Criterios de selección	34
9.2.1. Criterios de inclusión	34
9.2.2. Criterios de exclusión	34
9.2.3. Criterios de eliminación	34
10. Materiales	35
11. Estrategia experimental.....	37
11.1. Obtención del extracto acuoso de té verde al 10 %	37
11.2. Preparación de la gelatina tipo A.....	38
11.3. Preparación de solución de PVA 7.5%.....	38
11.4. Síntesis del hidrogel	38
11.5. Ensayo de Citotoxicidad	39
11.6. Ensayo de degradación hidrolítica y enzimática	41
11.7. Difusión de bacteria <i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> en agar Mueller Hinton	42
11.8. Ensayo de microdilución con bacterias <i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	45
12. Resultados.....	47
12.1. Ensayo de Citotoxicidad	47
12.2. Ensayo de Degradación hidrolítica (Abs 350 nm)	48
.....	48
12.3. Ensayo de Degradación hidrolítica (pérdida de peso gr)	48
12.4. Ensayo de Degradación enzimática (Abs 350 nm)	49
.....	49
12.5. Ensayo de Degradación enzimática (Pérdida de peso gr)	50
.....	50
12.6. Resultados de ensayo de difusión en agar Mueller Hinton	50
12.7. Resultados de ensayo de microdilución en caldo Mueller Hinton.....	52
13. Discusión	54
14. Conclusiones	56
Bibliografía	58
Anexo(s)	62

Resumen

Introducción: El té verde ha demostrado tener propiedades benéficas para la salud bucodental. Los hidrogeles son alternativas potenciales a los métodos farmacológicos comunes al ser biocompatibles y poder liberar su carga funcional gradualmente sin adherirse a la superficie celular. **Objetivo:** Evaluar las propiedades físico-biológicas de un hidrogel a base de Gelatina tipo A/ PVA funcionalizado con *Camellia Sinensis*. **Metodología:** Se realizó la obtención del extracto acuoso de té verde al 10%, se filtró, centrifugó y reguló pH. Se sintetizó un hidrogel de Gelatina tipo A (20%), PVA (7.5%) y té verde tostado (10%). Se realizaron pruebas de degradación enzimáticas (Tripsina y Colagenasa tipo II), e hidrolíticas (PBS) evaluando la pérdida de peso cada 10 min. El efecto citotóxico se evaluó con células del ligamento periodontal (PDLSCs) incubadas con el hidrogel por 24 h. La viabilidad celular se determinó por ensayo de MTT. La actividad antibacteriana se midió a través de ensayo de microdilución y difusión en agar contra *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, como control positivo Clorhexidina al 0.12 % y la Gelatina tipo A/ PVA como control negativo. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado (n=9). Se aplicaron pruebas de normalidad de Shapiro-wilks y ANOVA. **Resultados:** La degradación enzimática e hidrolítica total se llevó a cabo en 70 y 60 min, respectivamente. La viabilidad celular no se vio alterada por la presencia del hidrogel. Los resultados de actividad antibacteriana fue *S. aureus* (78.57 ± 0.7731 %), *S. mutans* (67.43 ± 2.503 %) y *E. coli* (73.16 ± 1.61 %) **Conclusiones:** El hidrogel desarrollado demostró una notable capacidad de inhibición bacteriana, una baja citotoxicidad y un tiempo de degradación adecuado. Estos hallazgos sugieren su potencial aplicación en diversas áreas clínicas.

Abstract

Introduction: Green tea has demonstrated to have beneficial properties to oral health. Hydrogels are potential alternatives to pharmacological common methods by being biocompatibles and able to free their functional charge gradually without adhering to the cellular surface. **Objective:** Evaluate the physical-biological properties of a Gelatin type A/ PVA hydrogel functionalized with *Camellia Sinensis*. **Methodology:** It was realized the obtention of green tea aqueous extract with a concentration of 10 %, was filtered, centrifuged and pH regulated. The hydrogel was synthesized with Gelatin type A (20 %), PVA (7.5 %) and green tea (10 %). There were realized enzymatic (Trypsin and Collagenase type II) and hydrolytic (PBS) degradation tests, evaluating weight loss every 10 minutes. The cytotoxic effect was tested with Periodontal Ligament Stem Cells (PDLSCs) incubated with the hydrogel for 24 hours. The cellular viability was determined by the MTT test. The antibacterial activity was measured with microdilution and diffusion tests in agar against *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. As a positive control it was used 0.2% Chlorhexidine, and for the negative control it was used Gelatin type A with PVA. Tests were made by triplicate (n=9). There were applied Shapiro-Wilks and ANOVA normality tests. **Results:** The total enzymatic and hydrolytic degradation was done in 70 and 60 minutes respectively. Cellular viability was not altered by the hydrogel presence. The antibacterial activity was *S. aureus* (78.57 ± 0.7731 %), *S. mutans* (67.43 ± 2.503 %) and *E. coli* (73.16 ± 1.61 %). **Conclusions:** The hydrogel demonstrated a notable capacity of bacterial inhibition, a low cytotoxicity, and an adequate degradation time. These findings suggest its potential application in diverse clinical areas.

1. Introducción

En las últimas décadas se ha estado investigando sobre nuevas alternativas a los métodos farmacológicos debido a los efectos colaterales que en algunas ocasiones se producen y a la ineficacia que pueden llegar a tener, así como para favorecer la regeneración de tejidos. El objetivo principal de estas nuevas propuestas es que sean biocompatibles y puedan liberar su carga funcional gradualmente, y el material que se ha encontrado que cumple con las funciones deseadas son los hidrogeles (Arredondo Peñaranda y cols., 2009).

Los hidrogeles son un tipo de polímero hidrofílicos que están formados por una red tridimensional capaz de absorber una gran cantidad de agua, aumentando su volumen sin perder su forma hasta alcanzar su máximo grado de hidratación (Ramírez y cols., 2016).

Entre las principales propiedades de los hidrogeles están que son biocompatibles principalmente debido a su consistencia que es blanda y elástica; son materiales inertes, por lo que no existe una adherencia de las células a su superficie; y que, debido a su característica de aumentar su volumen en medio acuoso, puede absorber, retener y liberar sustancias de forma controlada (Arredondo Peñaranda y cols., 2009).

El té verde es una hierba de origen chino que se ha demostrado que tiene muchas propiedades benéficas para la salud, asimismo es una de las bebidas más populares en el mundo. Las hojas de té verde están compuestas por catequinas y estas son las que le brindan sus propiedades de antiinflamatorio, antiartrítico, anticancerígeno, antimutagénico, antibacteriano, antiviral, antifúngico, anticoccidial, antiprotozoario, antiparasitario, antiinfeccioso e hipocolesterolémico.

Dadas estas características y propiedades de las catequinas, se han hecho estudios donde se ha encontrado que en boca ha tenido efectos positivos, tales como una

mejora en la salud periodontal y contra infecciones dentales, así como también se ha mostrado eficaz en la reducción de compuestos sulfurados, previniendo el mal aliento (Saeed y cols., 2017).

2. Marco teórico

2.1 Hidrogeles

Los hidrogeles son un tipo de polímero hidrofílicos que están formados por una red tridimensional capaz de absorber una gran cantidad de agua, aumentando su volumen sin perder su forma hasta alcanzar su máximo grado de hidratación (Ramírez y cols., 2016).

Los hidrogeles le deben su característica de ser hidrofílicos debido a que en los componentes de su estructura se encuentran los grupos -OH, -COOH, -CONH₂, -CONH-, -SO₃H debido al entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas, por lo tanto, la presencia de estos grupos permite, que al estar el hidrogel en líquido logre absorber y retener el agua (Martínez y cols., 2016).

Entre las principales propiedades de los hidrogeles están que son biocompatibles, principalmente debido a su consistencia, que es blanda y elástica que reduce la que los tejidos blandos se irriten; son materiales inertes, por lo que no existe una adherencia de las células a su superficie; y que, debido a su característica de aumentar su volumen en medio acuoso, puede absorber, retener y liberar sustancias de forma controlada (Arredondo Peñaranda y cols., 2009), (Martínez y cols., 2016).

2.1. Clasificación de los hidrogeles

Los hidrogeles son materiales que pueden tener varias clasificaciones que dependen de diferentes características:

Clasificación	Explicación
Tipo de entrecruzamiento	<ul style="list-style-type: none">Químico: se producen con grupos reactivos con agentes de entrecruzamiento. Se les denomina irreversibles debido a su estabilidad estructural. Sus métodos de reticulación pueden ser

	<p>por radiación UV o por base de Schiff.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Físico: se producen sobre la base de enlaces no covalentes, como enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos y fuerzas de Van der Waals, por lo tanto, se les denomina reversibles ya que su estructura puede alterarse con cambios en las condiciones externas (Lu y cols., 2018).
Tamaño	<ul style="list-style-type: none"> ● Macroscópicos, microgeles y nanohidrogeles (Martínez y cols., 2016).
Origen	<ul style="list-style-type: none"> ● Natural: provenientes de extractos de animales o plantas, como podría ser la gelatina, colágeno, quitosano, celulosa, etc. o ● Sintético: que son producidos de forma industrial, con características específicas, como, por ejemplo, PVA, ácido poliacrílico, óxido de polietileno, etc. (Lei y cols., 2022).
Preparación	<ul style="list-style-type: none"> ● Homopolímeros, copolímeros o hidrogeles interpenetrados o semi-interpenetrados (Martínez y cols., 2016).
Carga	<ul style="list-style-type: none"> ● No iónicos, catiónicos, aniónicos y anfóteros (dependiendo de los grupos funcionales que estén presentes en su estructura) (Martínez y cols., 2016).

2.1.1. Relevancia clínica del uso de hidrogeles

En la actualidad la relevancia clínica de los hidrogeles comienza a cobrar mucho sentido debido a diversos estudios que se han hecho en laboratorio y en humanos o animales principalmente como andamios para liberación sostenida de fármacos, pero, sorpresivamente en estos se ha reportado que, aunado a los resultados antimicrobianos favorables, en la gran mayoría hay un amplio número de casos donde también se observa un importante estímulo de regeneración ósea así como disminución o eliminación de efectos adversos a nivel sistémico (Halperin Sternfeld y cols., 2022), (Pedrosa y cols., 2021).

Un producto en hidrogel que ha sido lanzado al mercado con la producción del laboratorio Bioteck S.p.A. (Via E. Fermi 49, 36057 Arcugnano (VI), Italia), es el H42[®], un hidrogel a base de colágeno tipo I para el tratamiento de enfermedad periodontal y periimplantitis. Su uso debe ser únicamente por parte del odontólogo, y se aplica una vez finalizado el tratamiento de raspado y alisado radicular, se inyecta el producto en las bolsas periodontales y se mantiene al paciente con la boca abierta y constante aspiración de saliva por 5 min. La acción del producto se extiende de entre 15 a 30 días sin necesidad de ser retirado, ya que, al ser un producto biocompatible, se absorbe sin dejar residuos (Bioteck S.p.A, 2023).

2.1.2. Métodos de caracterización de los hidrogeles

Los hidrogeles deben pasar por un protocolo de caracterización para su posterior uso, para esto existen diferentes métodos de los cuales se va a hablar a continuación.

Primeramente, se tiene el análisis espectroscópico, este tiene como función el detectar la composición química del hidrogel, y de este modo se puede observar si sus moléculas están unidas por enlaces químicos. Dentro de los análisis espectroscópicos se pueden encontrar dos métodos que son la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

Por otro lado, se tiene a la microscopía electrónica de barrido, su función se centra en detectar la estructura del hidrogel a través de la penetración de electrones creando imágenes enfocadas. Este método se caracteriza por contar con una alta capacidad de aumento y resolución en las imágenes y por esto es principalmente usado para ver su estructura y componentes.

También se cuenta con la detección de hinchazón, su función consiste en medir la capacidad de absorción y liberación de los materiales del hidrogel a través de la temperatura, pH y pruebas de degradación.

Igualmente se cuenta con la calorimetría diferencial de barrido que tiene como función analizar los cambios en la estructura del hidrogel siendo sometido a diferentes temperaturas. Es un método que puede servir para determinar la temperatura máxima que aguanta el hidrogel, y así como para ver su composición (Lei y cols., 2022).

2.2. Gelatina tipo A

La gelatina es una proteína fibrosa que hoy en día tiene distintos usos, destacando principalmente en la industria farmacéutica y alimentaria por su capacidad de formar geles reversibles térmicamente (Saxena y cols., 2009).

Entre las principales características de la gelatina destaca su viscosidad, aunque esta propiedad va a depender de la forma de hidrólisis que se emplee al igual que del sitio que se esté sacando, es decir, de su origen (bovino o a partir de pieles de pescado (Serna Cock y cols., 2010). La gelatina de mejor calidad se obtiene de bovinos y porcinos mediante un proceso de hidrolización del colágeno obtenido de los huesos de estos animales. Aunque también es obtenida de los residuos generados de los pescados (Gómez Estaca y cols., 2009).

2.3. PVA

El PVA es un polímero de origen sintético, que a su vez también es hidrofílico y que se ha probado como biocompatible en los estudios que se han realizado. Es un biomaterial al que se le han adjudicado diferentes usos en el campo médico, como lo es la regeneración de tejidos y liberación prolongada de fármacos (Paradossi y cols., 2003).

El PVA es un polímero que puede estar en diferentes presentaciones pudiendo variar su nivel de hidrólisis y peso molecular, y de estas condiciones cambian sus propiedades físicas. De igual forma, el PVA es un biomaterial que frente a altas

temperaturas o diferentes pH se mantiene constante y estable (Gholap y cols., 2004). Al ser este un polímero al que se le dan usos en diferentes áreas e industrias como la alimentaria, textil, elaboración de papel y farmacéutica, por lo tanto, dependiendo del uso que se le dé, son las condiciones en las que se utiliza (DeMerlis y cols., 2003).

Los hidrogeles que están hechos a base de PVA pueden ser entrecruzados física o químicamente, e igualmente esto va a depender de la aplicación que se le otorgue (Echeverri y cols., 2009).

2.4. *Camellia Sinensis*

Camellia Sinensis es una planta originaria del sur y sureste de Asia, especialmente de China, aunque hoy en día, al ser una planta tan popular, se planta en todo el mundo especialmente en regiones tropicales (Parmar y cols., 2012). De la especie de *Camellia Sinensis* derivan el té verde, el té negro y el té oolong, aunque todas con un nivel diferente en sus componentes, distinto sabor y color.

Las hojas de esta hierba, en general, están químicamente compuestas por polifenoles principalmente, destacando los fenoles y flavonoides (catequinas) y taninos que son los que le brindan sus conocidas propiedades de antimicrobiano, antiinflamatorio y antioxidante, entre otras, y su función es inhibir la propagación de las enzimas que favorecen la coagregación bacteriana (Moromi Nakata y cols., 2007).

El té verde se compone de seis derivados de la catequina, que son: galocatequina, epicatequina, epigalocatequina, epicatequina galate, epigalocatequina galate y catequina. La cantidad general de polifenoles en el té verde va entre un 30 % a un 40 % (A.B. Sharangi, 2009).

Entre las principales propiedades del té verde, se puede mencionar su propiedad antimicrobiana, en la que en diversos estudios se ha demostrado que muestra inhibición contra bacterias como: *Estafilococos*, *Salmonella*, *Shigella*, y *Streptococos mutans*; y al ser esta, la bacteria más abundante en boca, y la principal productora de caries, también se puede demostrar que el té verde tiene un efecto anticariogénico (Hamilton Miller, 1995).

2.5. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana (PSA)

Las PSA son ensayos hechos en laboratorios que tienen como finalidad evaluar el comportamiento *in vitro* de un agente patógeno. Por consiguiente, los resultados obtenidos, solamente sirven como una predicción de cómo puede funcionar como tratamiento en un paciente. Las pruebas que se hacen sobre estos patógenos son bajo el efecto causado por la exposición a un antimicrobiano, y de igual forma, medir su sensibilidad o resistencia al antimicrobiano (Herrera, 1999).

La sensibilidad de un agente patógeno hace referencia al efecto que existe del antimicrobiano sobre la bacteria, por lo tanto, si una bacteria es sensible a un antimicrobiano, este tendrá una mayor respuesta de eliminación sobre la bacteria si se usa como tratamiento. Por otro lado, cuando se habla de una resistencia, se indica que no hay acción de eliminación por parte del antimicrobiano frente a la bacteria (Herrera, 2004).

Los métodos de ensayos se pueden clasificar en cualitativos y cuantitativos. Es cualitativo si en el resultado solo se puede interpretar si la cepa es sensible o no. Es cuantitativo si adicionalmente a saber si la cepa es sensible o resistente, el resultado nos dicta qué tan sensible o resistente es el agente bacteriano (Herrera, 2004).

Hay diferentes tipos de pruebas antimicrobianas, entre ellas destacan la técnica de difusión en agar y microdilución (Herrera, 1999).

La técnica de difusión en agar consiste en colocar una cantidad de inóculo bacteriano estandarizado a 0.5 bajo escala McFarland sobre una placa de agar Mueller Hinton, rayarlo uniformemente por toda la placa y posteriormente colocar los grupos experimentales. Se deja incubar a 37 °C por 24 h y se analizan los resultados que van a estar basados en un halo de inhibición alrededor de los grupos experimentales. Este es un ensayo cualitativo (Herrera, 2004).

La técnica de microdilución se realiza en microplacas de 96 pozos seccionando por fila los grupos que se van a evaluar, el medio de cultivo utilizado en este ensayo es el caldo Mueller Hinton. Los grupos por evaluar consisten en un control positivo que se compone por medio de cultivo y solución de trabajo, el control negativo que se compone por medio de cultivo y antibiótico, y finalmente los grupos que se pretenden evaluar que se componen por solución de trabajo y su respectivo grupo experimental (Herrera, 1999).

2.5.1. *Streptococcus mutans*

El *Streptococcus mutans* es un coco Gram positivo, es productor de ácido láctico, y en consecuencia fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina; siendo esta, la bacteria más abundante en la cavidad bucal. Se clasifica en serotipos, con base en sus propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: los serotipos de *S. mutans* son c, e, f y k. Pero el más predominante en cavidad bucal es el serotipo c (Oviedo García y cols., 2013).

Es una bacteria que se encuentra en forma de cocos o en tamaño más largo puede estar también en forma de bacilo. Y su nombre hace honor a su capacidad para poder cambiar de forma (Machado Tan y cols., 2021).

Los *Streptococcus mutans* comienzan su acción al comenzar a colonizar la biopelícula adquirida compuesta por proteínas y glicoproteínas. Posteriormente

comienzan a fermentar los carbohidratos de la ingesta de comida y de esta forma se secreta el ácido láctico (Banas, 2004).

2.5.2. *Staphylococcus aureus*

El *Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo, es productor de proteínas, enzimas y citotoxinas que se encargan de ir destruyendo los tejidos del sitio colonizado para, a su vez, ir nutriendo a sus propias bacterias. Esta bacteria tiene diferentes mecanismos de acción los cuales son la adherencia al huésped, inhibición de las defensas del huésped y la invasión y penetración a la célula huésped (Bustos Martínez y cols., 2006).

Es una bacteria que siempre ha sido muy fuerte debido a sus factores de virulencia. Antes del uso de antibióticos, una infección por *S. aureus* era casi mortal, a partir de que se comenzó a utilizar el antibiótico como tratamiento farmacológico contra bacterias, su índice de mortalidad se redujo considerablemente (Bustos Martinez y cols., 2006), pero debido a mutaciones se ha vuelto resistente y sigue siendo un reto el tratamiento en su contra ya que se manifiesta en cualquier parte del cuerpo y comúnmente puede ser transmitida por alimentos (Zendejas Manzo y cols., 2014).

2.5.3. *Escherichia coli*

El *E. coli* es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y es uno de los patógenos más fuertes y resistentes, y también tiene la capacidad de desarrollarse de forma aerobia o anaerobia. Esta se clasificaba anteriormente en serotipos de los antígenos O y H. Hoy en día se clasifican en patotipos (tipos patógenos), de los cuales una parte se encuentran extraintestinales y la otra parte dentro de la vía gastrointestinal (Allocati y cols., 2013).

Es una bacteria que como patógeno puede ser muy resistente, en su forma de huésped es parte normal de la microflora existente en el cuerpo humano. Por lo tanto, aunque el *E. coli* se encuentre presente en el cuerpo humano, se puede vivir sin que este cause infecciones o enfermedades. Asimismo, el *E. coli* se ha usado para experimentar con tecnología de ADN recombinante (Kaper y cols., 2004).

2.6. Líneas celulares

Los cultivos celulares son colonias de células fetales provenientes de animales, que dependiendo de la función que se le dé, pasa por un proceso de diferenciación específico.

Existen 3 tipos de cultivos celulares:

- **Primario:** Cultivos de células tomados del tejido de algún órgano de un animal.
- **Secundario:** Células provenientes de la proliferación de un cultivo primario.
- **Línea celular:** Células provenientes de un cultivo primario que son sometidas a una selección por medio de limitación de proliferación (Acevedo y cols., 2015).

Por otro lado, existen las técnicas de cultivos celulares:

- **En monocapa:** Donde las células están adheridas a la superficie donde se colocan y proliferan en una sola capa celular.
- **En suspensión:** Donde las células proliferan en un medio acuoso sin ser adheridas a la superficie donde son colocadas (Gallegos Hernández, 2018).

2.6.1. Células del Ligamento Periodontal (PDLSCs)

El ligamento periodontal es un tejido conectivo, vascularizado que rodea la raíz del diente, y se encuentra entre el hueso alveolar y el cemento radicular, y comienza en una distancia entre 1 a 1.5 mm apical a la unión cemento esmalte (Vargas y cols., 2021). El ligamento periodontal es formado a partir del folículo que rodea al germe dentario, que es un tejido conjuntivo laxo (Lindhe y cols., 2017).

Entre las funciones del ligamento periodontal está que absorbe y amortigua las fuerzas masticatorias, permite que haya movilidad dental, la cual va a depender del grosor y del nivel de salud del periodonto (Lindhe y cols., 2017). Asimismo, las células que lo componen son un elemento importante en la remodelación, reparación y regeneración ósea del tejido periodontal de los maxilares, y, por lo tanto, también son una fuente de vitalidad (Vargas y cols., 2021).

El ligamento periodontal al ser un tejido conectivo está compuesto por fibras y sustancia fundamental. Sus fibras están constituidas por colágena tipo I y III principalmente, y estas se dividen en grupos los cuales desempeñan diferentes funciones. Estos grupos son nombrados de acuerdo con su función y localización, y son: de la cresta alveolar, horizontales, oblicuas, apicales e interradiculares (Vargas y cols., 2021).

2.7. Citotoxicidad

La citotoxicidad hace referencia al daño que produce una sustancia ajena sobre una célula y las alteraciones causadas sobre sus funciones. Para poder definir si una célula ya pasó por un efecto citotóxico se debe evaluar mediante ensayos *in vitro* de viabilidad o proliferación celular (Gallegos Hernández, 2018).

2.8. Ensayos de citotoxicidad

Existen diferentes métodos de tinción en los ensayos de citotoxicidad, que sirven para tener un aproximado de la cantidad de células viables. Estos ensayos implican sencillez, eficacia y rapidez, aparte de ser fácilmente reproducibles y seguros para evitar fallos al obtener resultados (Escobar y cols., 2010).

- **Ensayo con MTT:** El MTT es un compuesto colorante con tono amarillo que se utiliza para observar la actividad que hay en las mitocondrias. El MTT únicamente es capaz de metabolizarse en formazán, que forma cristales insolubles en agua que quedan atrapados en el interior de las células y que deben de ser solubilizados con DMSO. El formazán es proporcional al número de células viables, y la forma de evaluar los resultados es mediante Espectrofotometría de luz U.V. a una absorbancia de 570 nm.
- **Ensayos MTS, XTT, y WST:** A diferencia del ensayo con MTT estos, se hacen con reactivos de tetrazolio, por lo tanto, el uso de DMSO no es necesario para solubilizar los cristales de formazán que se formen. Estos reactivos se usan con otros diferentes como el metasulfato de fenazina, que se metaboliza en el citoplasma sin quedar atrapados los cristales dentro de la célula, y por lo tanto son solubles en agua. La forma de evaluar los resultados es mediante Espectrofotometría de luz U.V. a una absorbancia de 490 nm.
- **Ensayo LDH:** En este ensayo se centra en el estado de la membrana plasmática de las células. Se analiza la actividad de la enzima LDH que se expulsa de las células no viables. Se utiliza una sal de tetrazolio llamada INT, al entrar en contacto con las células esta se convierte en formazán e igualmente cambia de color. Los resultados igualmente se leen por medio de Espectrofotometría de luz U.V.

- **Ensayo Rojo Neutro:** Este ensayo tiene como objetivo medir la viabilidad celular por medio de tinción en los lisosomas, de tal modo que entre más teñido más viabilidad hay. Se realiza a través de difusión pasiva no iónica. Sus resultados se miden por medio de Espectrofotometría de luz U.V. con una absorbancia de 540 nm.
- **Ensayo Azul de Kenacid:** En este ensayo se le administra colorante azul de kenacid a las células, lo que se pigmenta en este caso son las proteínas y con esto se determina el grado de citotoxicidad. Se miden los resultados con espectrofotometría de luz U.V. con una absorbancia de 577 nm.
- **Ensayo Azul de Tripano:** Este ensayo, por el contrario, se basa en colocar colorante azul de tripano, y su viabilidad se determina por la nula tinción de las células. Los resultados son obtenidos al colocar las células con colorante en un hemocitómetro, observar al microscopio y contar el número de células por mL (Gallegos Hernández, 2018).

2.9. Espectrofotometría de Luz ultravioleta (UV Vis)

Esta es una técnica por la cual, mediante un aparato especializado, llamado espectrofotómetro, se puede medir la concentración de células o algún compuesto en una solución. Este funciona por medio de la absorción de la radiación electromagnética por parte del compuesto a evaluar, y cada que se pretende evaluar, se debe seleccionar la longitud de onda adecuada para cada solución.

Para medir la absorbancia, basándonos en el espectro electromagnético, se usa el lado ultravioleta (U.V.) que va de 195 a 400 nm, y el lado visible (Vis) que va de 400 a 780 nm (Díaz y cols., 2010).

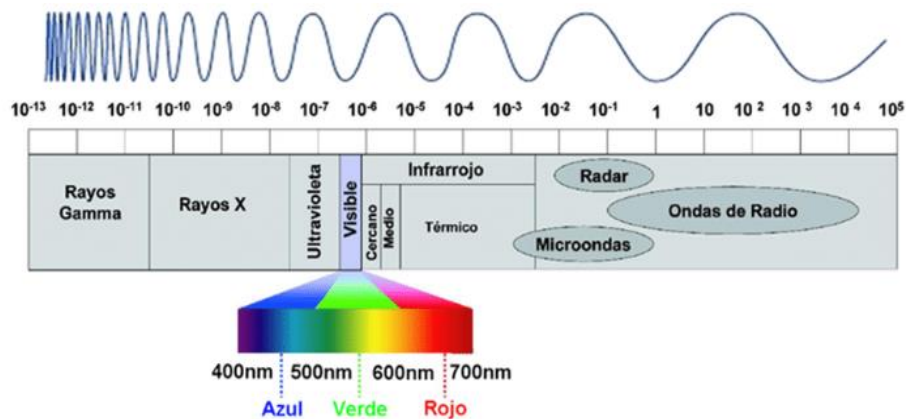


Figura 1. Imagen explicativa del espectro de luz (Viera González, 2014)

2.9.1. Absorbancia

La absorbancia hace referencia a la cantidad de luz que absorbe la sustancia que se pretende medir. Por lo tanto, entre más concentrada esté la muestra a analizar, mayor será su absorbancia debido a que existe una mayor interacción de luz (Díaz y cols., 2010).

3. Antecedentes

En odontología hay diversos tratamientos, sobre todo los tratamientos que abarcan el área de cirugía oral y maxilofacial, como la colocación de implantes, cirugía de terceros molares, eliminación de alguna lesión o incluso cirugía ortognática, en las que se corre un mayor riesgo de infección. Tradicionalmente, en estos casos se prescribe tratamiento antibiótico vía oral, existiendo la posibilidad de que éste no actúe de la manera deseada ya que tiene un efecto sistémico y no local (Silva y cols., 2023).

Es por este motivo que se ha comenzado a implementar el uso de los hidrogeles como tratamiento antimicrobiano, y en el cual igualmente se ha mostrado evidencia de mayor proliferación celular en los casos reportados (Pedrosa y cols., 2021).

En el caso de cirugía ortognática se hicieron reportes de caso en el que se usó un hidrogel de ácido hialurónico y así como se mostró efecto antimicrobiano, de igual forma hubo proliferación celular (Pedrosa y cols. 2021).

Existen también, reportes de casos donde se hizo un estudio in vitro un hidrogel con muestras de titanio y cargado con metronidazol a base de PVA con el objetivo de evaluar su viabilidad como reemplazo de terapia antibiótica vía oral tras la cirugía de colocación de implantes, en este se concluyó que debido a la capacidad del PVA de retener fluidos acuosos, puede favorecer un sitio hidratado y estimular una mejoría en la cicatrización, asimismo una liberación equitativa y gradual del medicamento en el sitio quirúrgico (Silva y cols., 2023).

En una revisión enfocada en el tratamiento farmacológico con estatinas sobre la periodontitis, se discutía que las estatinas son una buena opción para tratar esta enfermedad ya que estimulan también la remodelación ósea y tienen efecto antiinflamatorio, pero su administración vía oral tiene muchos efectos adversos a nivel sistémico, por lo que se investigó sobre hidrogeles cargados con este

medicamento y se encontraron resultados beneficiosos ya que al existir una liberación prolongada y local, no se muestran efectos secundarios a nivel sistémico (Cárdenas Gutiérrez y cols., 2019).

Igualmente hay un estudio *in vitro* y posteriormente *in vivo* aplicado en ratas, que trata sobre un hidrogel de FmocFF (un péptido ensamblable) y ácido hialurónico, en este ensayo se evaluó la regeneración ósea de defectos de 5 mm hechos en laboratorio en los huesos parietales del lado derecho de 20 ratas, usando el otro lado como control. A un grupo de estas ratas se les administró hidrogel y posteriormente se cerraron las heridas y al otro grupo no se le administró nada. Pasadas 8 semanas se reportaron los resultados donde se vio que en las ratas a las que se les aplicó el hidrogel tuvieron un 93% de regeneración ósea, a diferencia del otro grupo que tuvo un resultado de la mitad. Por lo que se puede concluir que estos materiales son buenos estimulantes de remodelación ósea (Halperin Sternfeld y cols., 2022).

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar las propiedades físico-biológicas de un hidrogel de Gelatina tipo A/PVA funcionalizado con *Camellia Sinensis*.

4.2. Objetivos específicos

- Sintetizar un hidrogel de Gelatina tipo A/ PVA funcionalizado con *Camellia Sinensis*.
- Evaluar el efecto citotóxico del hidrogel de Gelatina tipo A/ PVA funcionalizado con *Camellia Sinensis*.
- Determinar la degradabilidad que muestra el hidrogel de Gelatina tipo A/ PVA funcionalizado con *Camellia Sinensis*.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de un hidrogel de Gelatina tipo A/ PVA funcionalizado con *Camellia Sinensis*.

5. Planteamiento del problema

Este proyecto se ha pensado y desarrollado debido a diferentes problemáticas que se han ido presentando en la sociedad.

En la actualidad se ha visto una alta resistencia a los antibióticos, la OMS ha declarado que esta resistencia que se ha ido generando con los años puede ser causante de nuevas amenazas para la salud humana (Medina Morales y cols., 2015).

Esta resistencia ha ido propagándose a lo largo de las últimas décadas debido a una falta de control sobre la prescripción, uso y consumo de antibióticos, lo que favorece que las bacterias gram negativas y positivas cada vez se vuelvan más difíciles de combatir (Huttner y cols., 2013).

Las resistencias han generado consecuencias negativas sobre los tratamientos que se tenían establecidos para tratar ciertas infecciones, provocando un impacto en la economía de los sistemas de salud, ya que los tratamientos se vuelven más costosos y en algunos casos se debe considerar hospitalización (Organización Panamericana de la Salud).

Por lo tanto, se requieren nuevas alternativas a los antimicrobianos, ya que trabajar en nuevos antibióticos es caro y no muestra la eficacia esperada (Huttner y cols., 2013).

Por otro lado, es bien sabido que al utilizar antibióticos se hace por vía oral o intravenosa, lo que implica que el fármaco actúe de forma sistémica, en lugar de forma local, provocando que se administren dosis no ideales para la función que se busca y en algunas ocasiones haciendo ineficiente la terapia antimicrobiana. Derivando de esto una serie de efectos secundarios que afectan negativamente el bienestar del paciente (Arredondo Peñaranda, y cols. 2009).

En Odontología se tiene a la Clorhexidina tópica (enjuagues de gluconato de clorhexidina) como el antiséptico de primera elección debido a que su función antimicrobiana es la que cubre un mayor espectro. Aunque este antiséptico cumple con lo que se requiere, también se ha demostrado que su uso prolongado y sin control por parte de un profesional de la salud oral, puede ocasionar efectos secundarios, tales como pigmentación dental y de la mucosa y alteraciones en la percepción del gusto (Bustamante y cols., 2020).

Entre los efectos secundarios que se han reportado por la FDA sobre el uso de la Clorhexidina tópica están reacciones alérgicas graves manifestadas como anafilaxia, aunque estos datos se han registrado en una aislada porción de los pacientes que lo han usado con un total de 43 casos reportados del año 1998 al año 2015 (Research, C. for D. E. and. 2019).

6. Justificación

El té verde es una hierba que tiene diversas propiedades, entre ellas, su efecto antimicrobiano, antiinflamatorio, y de fácil acceso y bajo costo. Esto asociado a los beneficios de la Gelatina tipo A y el PVA como su efecto positivo en los mecanismos de reparación y cicatrización de tejidos, resistencia, capacidad de hinchamiento y su bajo efecto citotóxico, otorgados por características de biocompatibilidad, pudiendo proveer en conjunto un biomaterial con capacidades óptimas para tratamientos de la cavidad oral.

7. Pregunta de investigación

El hidrogel de Gelatina tipo A y PVA funcionalizado con *C. sinensis* ¿Tiene potencial efecto antimicrobiano frente a patógenos de la cavidad oral, buena resistencia a la degradación y sin efecto citotóxico?

8. Hipótesis

El empleo de hidrogel hecho a partir de té verde tendrá una alta eficacia antimicrobiana, buena resistencia a la degradación y sin efecto citotóxico.

9. Diseño de estudio

El presente proyecto de investigación es de tipo experimental puro *in vitro*, el cual se llevó a cabo en la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León de la Universidad Nacional Autónoma de México (ENES-León UNAM) dentro del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria del área de Nanoestructuras y Biomateriales, bajo la dirección de la Maestra Patricia Alejandra Chávez Granados y el asesoramiento del Doctor René García Contreras.

9.1. Variables del estudio

Tabla 1. Variables dependientes

Variables dependientes	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo	Escala de medición
Efecto antimicrobiano	Capacidad de reducir la presencia de microorganismos	mm, nm	Cuantitativa/ cualitativa	Continua
Degradabilidad	Capacidad de descomposición en diferentes compuestos	gr, nm	Cuantitativa	Continua
Efecto citotóxico	Capacidad de un agente de dañar un tejido o célula	nm	Cuantitativa	Continua

9.2. Criterios de selección

9.2.1. Criterios de inclusión

- Hidrogel a base Gelatina tipo A y PVA funcionalizado con té verde
- Hidrogel que tenga buen tiempo de degradación hidrolítica y enzimática
- Hidrogel sin efecto citotóxico

9.2.2. Criterios de exclusión

- Muestras que no queden bien conformadas
- Muestras con burbujas
- Muestras insuficientes

9.2.3. Criterios de eliminación

- Muestras contaminadas
- Muestras que presenten cambios de color y/ o consistencia
- Muestras que tengan un menor tiempo de degradación
- Muestras que presenten efecto citotóxico

10. Materiales

Para los ensayos hechos en este proyecto se utilizó el siguiente equipo: Agitador magnético IKA C-MAG HS7, Centrifuga (*Centrifuge CL10, Thermo Scientific*), Potenciómetro (*Thermo Scientific*), Espectrofotómetro de luz UV-Vis (*Multiskan GO Thermo Scientific*), Balanza analítica (*Denver Instrument*), Vortex (*Genie 2Daigger, Scientific Industries, INC*), Densitómetro (*McFarland Densitometer, Grant-bio instruments*), Incubadora de agitación (*MAXQ 6000, Thermo Scientific*), Incubadora de humedad relativa (*MIDI 40 CO₂ Thermo Scientific*), Incubadora de bacterias (*Incucell, MMM Group*), Autoclave (*2340M, Tuttnauer*), Campana de flujo para bacterias (*1300 Series A2, Thermo Scientific*), Campana de flujo horizontal para células (*Lumistell LH-120*), Microscopio óptico (*AxioCam, MRc, Leica DMIL LED*), Sistema de vacío (*Millipore, EMD Millipore Corporation*) Micropipeta 1000 µL (*Thermo Scientific*), Micropipeta 500 µL (*Thermo Scientific*), Micropipeta 100 µL (*Thermo Scientific*), Vasos de precipitado, Matraz Erlenmeyer y Tubos de densitómetro.

Té verde (*Roasted Green Tea, Matcha Kaori, Japan*), Gelatina tipo A (*Gelatin from porcine skin, gel strenght 300, type A SIGMA*), PVA 87-90 % hidrolizado, peso molecular promedio 30,000-70,000 (*Sigma-Aldrich*), Quitosano de bajo peso molecular en polvo (*Sigma-Aldrich*), Ácido acético 99 % (*Sigma-Aldrich*), Agua desionizada (*Karal, León Gto, México*), Agua destilada (*Karal, León Gto, México*), Tripsina 1 % (*Sigma-Aldrich*), Agar Mueller Hinton (*BD Bioxon*), Mueller Hinton Broth (*Sigma-Aldrich*), Clorhexidina al 2 % (*FGM, Dentscare Ltda.*), Cloruro de sodio (*Sigma-Aldrich*), Bacteria *S. mutans*, Bacteria *E. coli*, Bacteria *S. aureus*, Células LP, DMSO, PBS (*Phosphate Buffered Saline 100 mL tablets, Biotech, BioBasic*), MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 98 %, Sigma Aldrich*), Colagenasa tipo 2 (*Worthington, Biochemical Corporation*), Sacabocados desechable de biopsia de 6 mm (*Integra Miltex, Integra LifeSciences Production Corporation*), Papel de filtro Durapore (*0.22 µL PVDF Membrane, Merck Millipore Ltd.*), Membranas (*110 mm Whatman 201 filter papers, Cytiva*), Cajas Petri (*Corning Costar*), Placa de 24 y 96

pocillos (*Corning Costar*), Tubos *Falcon* de 10 mL y 50 mL, Tubos *Eppendorf* de 1.5 mL, Puntas de micropipeta, Asas y Papel parafilm.

11. Estrategia experimental

11.1. Obtención del extracto acuoso de té verde al 10 %

Se comenzó pesando 20 gr de té verde. Posteriormente se vertieron 200 mL de H₂O *millio* Q en un vaso de precipitados y se colocó en una parrilla magnética hasta que se llegó al punto de ebullición, se agregó el té paulatinamente con agitación constante por 10 min y bajando la temperatura. Pasado el tiempo, se le quitó la temperatura dejando enfriar.

Se filtró el extracto obtenido con membranas para finalmente obtener un total de 80 mL. Posteriormente se colocó en 8 tubos *Falcon* en porciones de 10 mL para poder llevar a la centrífuga por 20 min a 6500 rpm. Se hizo una segunda filtración con membranas, y antes de vaciar nuevamente el extracto en los tubos *Falcon*, éstos se enjuagaron con H₂O *millio* Q para quitar cualquier resto de sedimento pegado. Se hizo un segundo ciclo de centrifuga por 20 min a 6500 rpm, pero esta vez se llenaron los tubos a 9.5 mL por el volumen perdido de la filtración.

Se hizo una tercera filtración con membranas y posteriormente se hizo una última filtración al vacío con el sistema de vacío y papel de filtro Durapore.

Finalmente se hizo balance de pH a 10.5 con Potenciómetro. Se comenzó con el electrodo previamente calibrado con soluciones *buffer* a pH 4, 7 y 10. Posteriormente se vertió el EATV en un vaso de precipitados en una parrilla con agitación, se colocó paulatinamente un poco de solución *buffer* necesario hasta llegar al pH de 10.5 una vez que el calibrador marcó *ready*.

El extracto obtenido una vez filtrado y balanceado, se almacenó en tubos *Falcon* y posteriormente se llevó a congelación a -20 °C hasta su uso.

Se colocaron 6 mL de EATV y 24 mL de H₂O *millio* Q en un vaso de precipitado, y se puso en una parrilla magnética hasta alcanzar una temperatura de 40 °C, y simultáneamente, se pesaron 6 gr de GtA.

11.2. Preparación de la Gelatina tipo A

Una vez alcanzada la temperatura, se colocó un agitador magnético, y se vertieron los 6 gr de gelatina, cuidando que no aumentara la temperatura más de los 70 °C (esto podría provocar que la muestra se quemara). Se mantuvo con agitación constante hasta que la mezcla se empezó a homogeneizar y quedó completamente disuelta la gelatina.

Para el control negativo de G sin funcionalizar, se hizo el mismo proceso, pero con 30 mL de H₂O *millor* Q.

11.3. Preparación de solución de PVA 7.5%

Se colocaron 30 mL de H₂O *millor* Q en un vaso de precipitado sobre una parrilla y se llevó el agua hasta una temperatura de 80 °C, una vez alcanzada la temperatura se colocó un agitador magnético en el vaso y se vertieron 2.25 gr de PVA, y se dejó tapado, en agitación y temperatura constante de 80 °C por 3 h.

11.4. Síntesis del hidrogel

Teniendo la G/EATV y el PVA preparados y aún calientes, se vertieron en cantidades iguales 1:1 en un vaso de precipitado sobre una parrilla con temperatura y agitación, y se dejaron mezclando por 5 min hasta homogeneizar por completo.

Posteriormente se llevó la solución a cajas Petri de 10 cm de diámetro, vertiendo 20 mL por caja, dejando un espesor de 4 mm, para sellarlas con parafilm y llevarlas a refrigeración a 4 °C hasta su uso.

11.5. Ensayo de Citotoxicidad

Previo a comenzar el ensayo se prepararon grupos experimental y control negativo para poder hacer comparaciones de los resultados. Los grupos con los que se trabajó fueron: (1) G/ EATV/PVA, (2) G/PVA.

Para este ensayo se trabajó con el ensayo de MTT por lo que se comenzó aspirando el medio que se encontraba en el previo cultivo de las PDLSCs. Posteriormente se lavó con 3 mL de PBS, se aspiró y se repitió el proceso de lavado con PBS y aspirado una vez más. Se colocó 1 mL de tripsina/EDTA al 1 % y se incubó por 5 min a 37 °C con 5 % de CO₂ en Incubadora de humedad relativa.

Pasados los 5 min se observó al Microscopio para hacer un conteo de las células, y posteriormente se agregaron 7.3 mL de medio para poder pasarlo a una microplaca de 24 pocillos, colocando un total de 300 µL de medio en cada pocillo. Se usaron 3 pocillos para cada grupo experimental y 6 para el grupo control que solo constó de las células en su medio. (Figura 1).

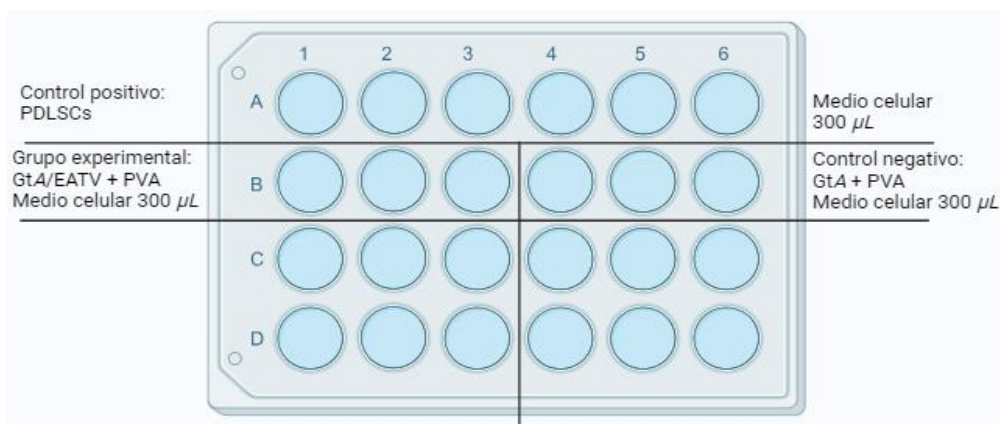


Figura 1. Muestra de la microplaca de 24 pocillos y el acomodo de los grupos experimentales

Para colocar los grupos experimentales en los pocillos, las placas de hidrogeles que se habían hecho previamente se pusieron en luz U.V. por 15 min en Campana de Flujo Laminar Horizontal, posteriormente se cortaron en círculos con un Sacabocados desechable de biopsia de 6 mm y cada muestra se cortó a la mitad para tener un menor espesor de muestra. Estas muestras cortadas fueron las que se colocaron en los pocillos. Se dejó en incubación por 24 h a 37 °C con 5 % de CO₂ en Incubadora de humedad relativa.

Pasadas las 24 h se aspiraron todos los grupos, y se lavaron únicamente los grupos experimentales con 300 µL de PBS y se repitió el lavado y aspirado una vez más. Se le pusieron 300 µL de MTT a todos los grupos y se dejó otras 24 h en incubación.

Para finalizar, pasadas las 24 h, se volvieron a aspirar todos los grupos y a cada pocillo se le agregaron 300 µL de DMSO. Después se pasó el ensayo a una microplaca de 96 pocillos, para poder leer la placa en el espectrofotómetro para hacer el conteo celular, pero ahora usando 6 pocillos por grupo experimental. (Figura 2). Finalmente se graficaron los resultados para hacer estudios comparativos.

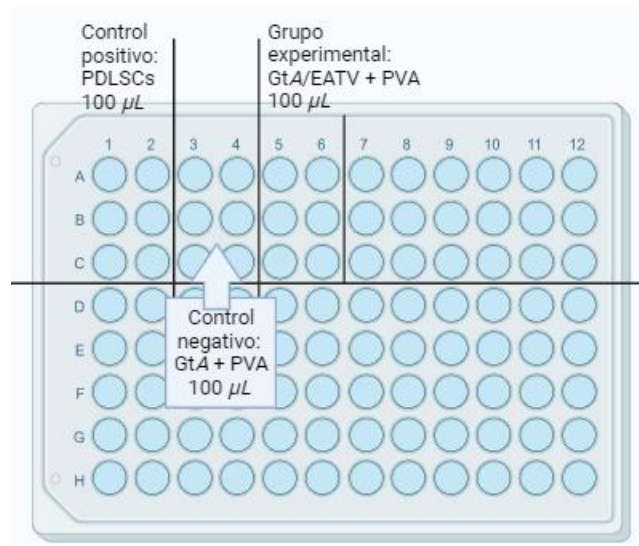


Figura 2. Muestra de la microplaca de 96 pocillos y el acomodo de los grupos experimentales.

Este ensayo se hizo por triplicado n=9.

11.6. Ensayo de degradación hidrolítica y enzimática

Se comenzó haciendo el pesaje inicial del grupo control (1) G/PVA y grupo experimental (2) G/EATV/PVA con ayuda de la balanza analítica, para posteriormente comenzar con los procesos de degradación. Para estos se colocaron las muestras por separado en tubos *Eppendorf* de 1.5 mL que contenían 1 mL de soluciones de PBS, tripsina/EDTA al 1 % y colagenasa tipo II respectivamente (Figura 3). Los tubos se sometieron a una agitación de 60 rpm a 37 °C en incubadora con agitación. Cada 10 min se detuvo la agitación para hacer los pesajes de las muestras de hidrogel y se fueron reservando los tubos para posteriormente medir su absorbancia. Este proceso se hizo 8 veces hasta alcanzar los 80 min.

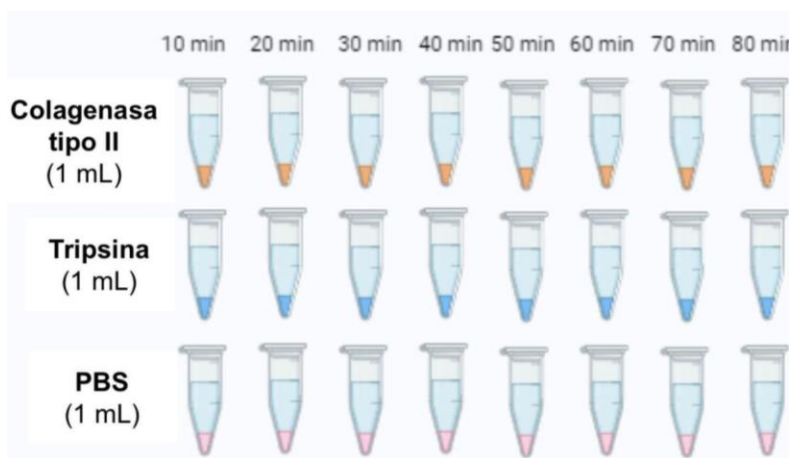


Figura 3. Ejemplo visual de la colocación de los grupos experimentales en sus respectivos tubos para posterior agitación en incubación

Para medir la absorbancia se tomaron las muestras de las soluciones de PBS, tripsina/EDTA y colagenasa tipo II y se agitaron en Vortex, posteriormente se colocaron en microplacas de 96 pocillos para hacer la evaluación de los diferentes

periodos de tiempo (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 min) a 350 nm en espectrofotómetro de luz UV-Vis. (Figura 4)

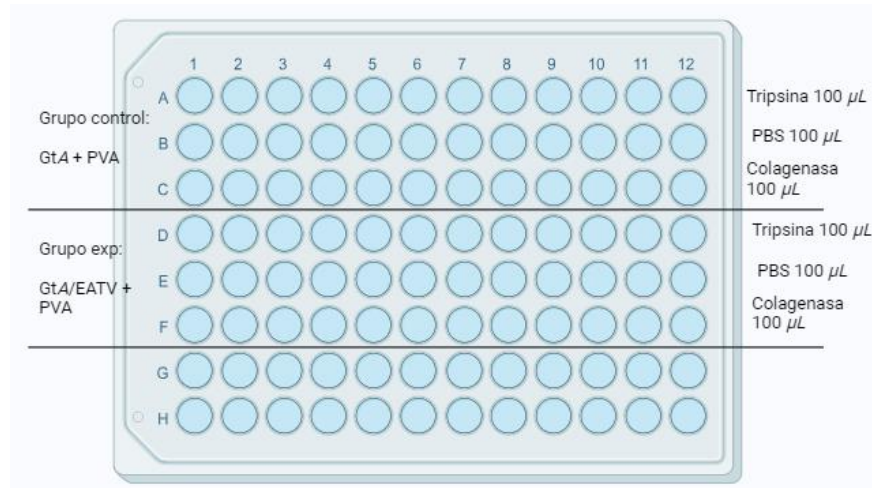


Figura 4. Muestra de la microplaca de 96 pocillos y el acomodo de los grupos experimentales para posterior lectura en espectrofotómetro de luz U.V. Vis

Este ensayo se hizo por triplicado $n=9$.

11.7. Difusión de bacteria *S. mutans*, *S. aureus* y *E. coli* en agar Mueller Hinton

Para la preparación de los medios de cultivo, se comenzó pesando 7.6 gr de agar Mueller Hinton, y se midieron 200 mL de H_2O *millio* Q. Se puso a calentar la parrilla magnética, se colocó un matraz, y en éste se vertió el H_2O *millio* Q y el agar junto con un agitador. Se colocó un tapón sobrepuesto en la boca del matraz.

Cuando comenzó a hervir se dejó por 1 min, se quitó el matraz de la parrilla, se colocó bien el tapón y se metió a esterilizar en Autoclave por 20 min a 120 °C.

Por otro lado, se colocaron 10 cajas Petri de 20 mL, junto con un pipetor y pipeta serológica, en la Campana de flujo para bacterias y se dejó por 20 min en rayos U.V. Al terminar el ciclo de rayos U.V. de la campana, se sacó el agar de la autoclave y se llevó a la campana.

Se vertieron 20 mL de agar en cada caja Petri con ayuda del pipetor y con cuidado de no dejar burbujas. Se dejaron gelificar por 30 min y posteriormente se sellaron las cajas con parafilm y se llevaron a refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Para el ensayo, se comenzó vertiendo 10 mL de cloruro de sodio a una concentración de 0.85 % en un tubo densitómetro. Con un asa previamente esterilizada se colocó en el tubo la bacteria, y posteriormente se mezcló en Vortex para lograr una disolución completa. Se corroboró la concentración a 0.5 según el estándar *McFarland en Densitómetro*.

En otro tubo vertieron 6 mL de cloruro de sodio y se añadió 1 mL del concentrado previamente hecho con la bacteria para conseguir la *ST* que se utilizó para hacer el experimento. Este procedimiento se hizo para cada bacteria.

Se usaron 3 medios de cultivo previamente solidificados y expuestos a luz U.V. por 5 min, a cada uno se le hicieron 2 perforaciones con un sacabocados punch de 6 mm para colocar las muestras de G/EATV/PVA y G/PVA. Posteriormente, a todos se les vertió 60 µL de la *ST*, y se rayó por todo el medio de cultivo con ayuda de un hisopo estéril.

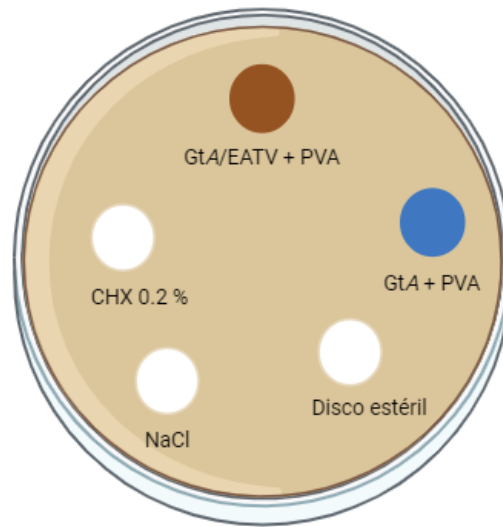


Figura 5. Ejemplo del ensayo de difusión

Las muestras que se usaron son: (1) G/EATV/PVA, (2) G/PVA, (3) CHX al 0.2 %, (4) NaCl y (5) un disco de papel solo.

Para los grupos 3, 4 y 5 se utilizaron discos de papel, a los grupos 3 y 4 se les colocó una cantidad de 5 μ L de clorhexidina y 5 μ L cloruro de sodio respectivamente y al último no se le añadió ninguna sustancia.

Se colocaron las 5 muestras en cada uno de los cultivos de forma equidistante (para la colocación de cada muestra se usaron instrumentos diferentes) y en las perforaciones se colocaron los discos de G/EATV/PVA, y la G/PVA (Figura 5).

Posteriormente se sellaron con parafilm las cajas Petri utilizadas para los cultivos y se llevaron a la Incubadora de bacterias a 37 °C por 24 h. Pasadas las 24 h, se midieron los halos de inhibición y se graficaron los resultados por separado.

Este procedimiento se hizo para cada bacteria y se hizo por triplicado n=9.

11.8. Ensayo de microdilución con bacterias *S. mutans*, *S. aureus* y *E. coli*

Se comenzó haciendo un estriado con cepas de cada bacteria respectivamente en 3 placas de agar Mueller Hinton y se llevaron a la Incubadora de bacterias por 24 h a 37 °C para hacer el cultivo joven. Pasadas las 24 h se sacó y se preparó la Campana de flujo para bacterias para llevar las bacterias a sus medios de cultivo.

Después se prepararon 200 mL de caldo Mueller Hinton, se pesaron 4.2 gr de caldo y se vertieron en un Matraz Erlenmeyer con 200 mL de agua destilada con agitación, una vez homogéneo se pasó a un bote con tapa y finalmente se llevó a esterilizar en Autoclave a 120 °C por 20 min.

Con un asa estéril para cada bacteria, se tomaron colonias bien formadas y se depositaron en un tubo *Falcon* que contenía 10 mL de caldo Mueller Hinton (este procedimiento para cada bacteria). Posteriormente se llevaron a Incubadora de agitación a 37 °C con agitación constante a 60 rpm por 20 h.

Pasadas las 20 h se sacó de la agitación y se comenzó la preparación de la ST. En un tubo densitómetro estéril se colocaron 7 mL de caldo Mueller Hinton y 700 µL de bacteria para estandarizar, se llevó al densitómetro para medir a escala de 0.5 McFarland y posteriormente se preparó la ST, en un tubo *Falcon* se colocaron 10 mL de caldo Mueller Hinton y 100 µL de la bacteria estandarizada. Este proceso se repitió con cada bacteria.

Posteriormente para continuar con el ensayo de microdilución, se cortaron las muestras de los hidrogeles de grupo experimental: G/EATV/PVA y grupo control: G/PVA con sacabocados punch de 6 mm, y después se cortaron a la mitad para colocarlos en los pocillos correspondientes en una microplaca de 96 pocillos. Una vez colocadas las muestras de hidrogel se colocaron 100 µL de bacteria en cada pocillo y finalmente se selló con parafilm. Esto se hizo de la misma forma con cada bacteria en una caja para cada una. (Figura 6).

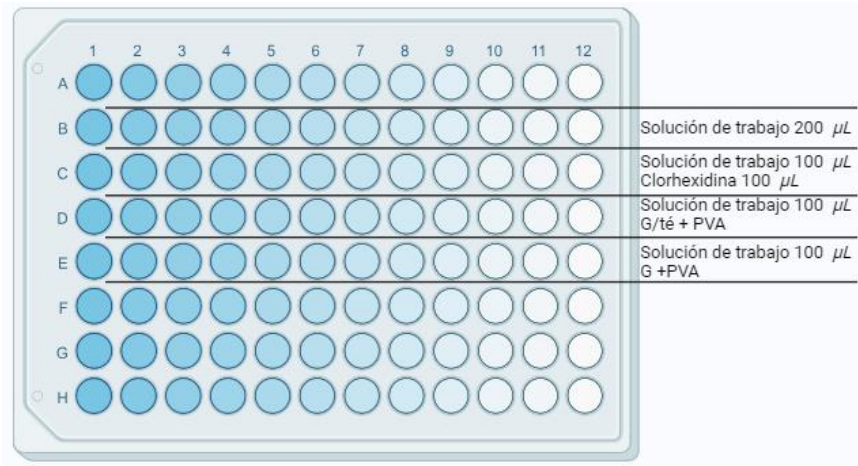


Figura 7. Muestra de la colocación de los grupos experimentales en caja Petri de 96 pocillos

Una vez terminado, se llevó a Incubadora de bacterias a 37 °C por 24 h, y pasado ese tiempo, se sacaron las cajas y se aspiraron todos los grupos, posteriormente a cada pocillo se le vertieron 100 µL de MTT, y se llevaron nuevamente a la Incubadora de bacterias a 37 °C por 3 h. Pasadas las 3 h se volvieron a sacar, se volvieron a aspirar y en esta ocasión se les colocó 100 µL DMSO y se llevó a incubar por 1 h. Finalmente se llevaron las cajas a espectrofotómetro de luz UV-Vis para lectura de absorbancia a 595 nm.

Este ensayo se hizo por triplicado n=9.

12. Resultados

12.1. Ensayo de Citotoxicidad

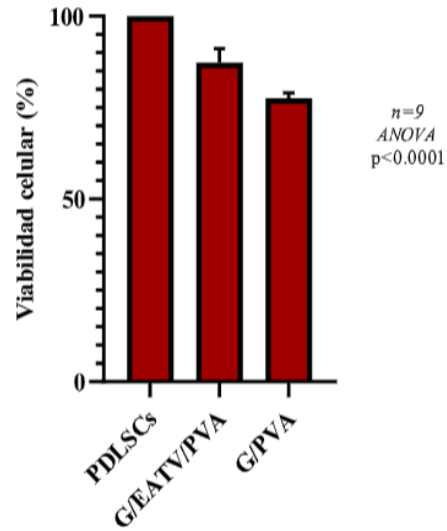


Gráfico 1. Gráfico de barras de los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad. Se muestra el % de viabilidad celular de PDLSCs (grupo control) en comparación con el grupo experimental (G/EATV/PVA) y el grupo control negativo en el cuál no se empleó té verde (G/PVA). El grupo experimental mostro un $87.3 \pm 3.8\%$ en comparación al grupo sin té verde que dio un $77.50 \pm 1.5\%$.

12.2. Ensayo de Degradación hidrolítica (Abs 350 nm)

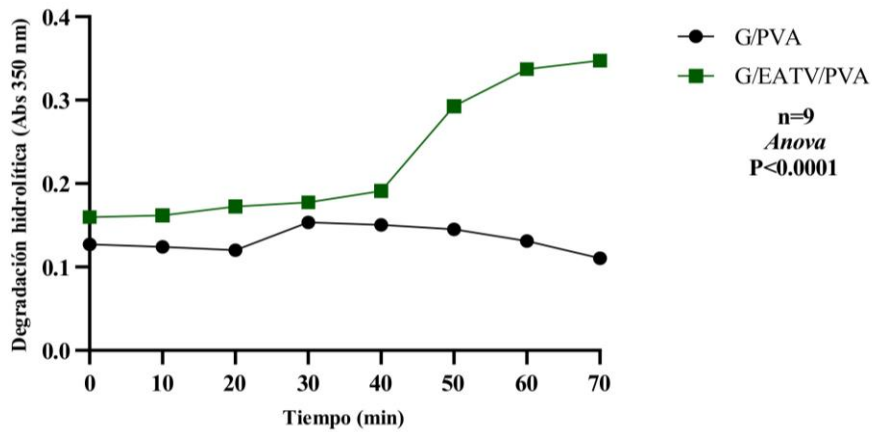


Gráfico 2. Gráfico que representa los resultados del tiempo de degradación hidrolítica en solución de PBS. En el eje Y se muestra la degradación hidrolítica a 350 nm, comparado con respecto al eje X que corresponde al tiempo en min. Los resultados corresponden a los grupos G/EATV/PVA en comparación con el grupo G/PVA. Se observó que el grupo G/EATV/PVA mostró una mayor absorbancia a partir del min 40 (0.2301 ± 0.081 nm) frente al grupo sin té verde que no mostró cambios significativos en los 70 min (0.1348 ± 0.0157 nm).

12.3. Ensayo de Degradación hidrolítica (pérdida de peso gr)

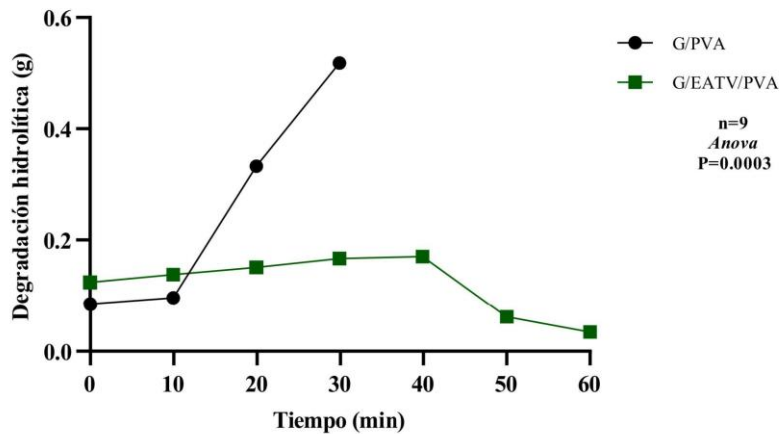


Gráfico 3. Gráfico que representa los resultados de la pérdida de peso en solución de PBS. En el eje Y se muestra la degradación hidrolítica en g, comparado con respecto al eje X que corresponde al tiempo en min. Los resultados corresponden a los grupos G/EATV/PVA (0.1209 ± 0.052 gr) en comparación con el grupo G/PVA (0.2579 ± 0.208). Se observó que el grupo G/ PVA mostró un aumento de peso a partir del min 10 hasta el min

30, que colapsó, a comparación del grupo G/EATV/PVA que fue mostrando una leve ganancia de peso hasta el min 40, que, a partir de este momento comenzó su pérdida de peso.

12.4. Ensayo de Degradación enzimática (Abs 350 nm)

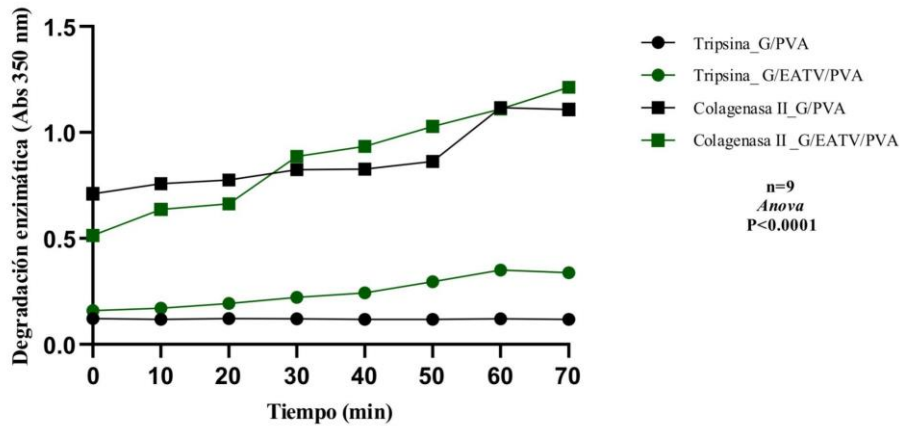


Gráfico 3. Gráfico que representa los resultados del tiempo de degradación enzimática en soluciones de Colagenasa II y Tripsina. En el eje Y se muestra la degradación enzimática a 350 nm, comparado con respecto al eje X que corresponde al tiempo en min. Los resultados corresponden a los grupos G/EATV/PVA en comparación con el grupo G/PVA y Colagenasa II en comparación con Tripsina. Se observó que frente a la Colagenasa II, durante los 70 min ambos grupos G/EATV/PVA (0.8737 ± 0.2475 nm) y G/PVA (0.873 ± 0.1551 nm) mostraron un aumento constante de absorbancia. Por otro lado, frente a Tripsina se mostró un aumento contante de absorbancia por parte del grupo G/EATV/PVA (0.2465 ± 0.074 nm), a diferencia del grupo G/PVA (0.1198 ± 0.0017 nm) que mostró una disminución constante de absorbancia.

12.5. Ensayo de Degradación enzimática (Pérdida de peso gr)

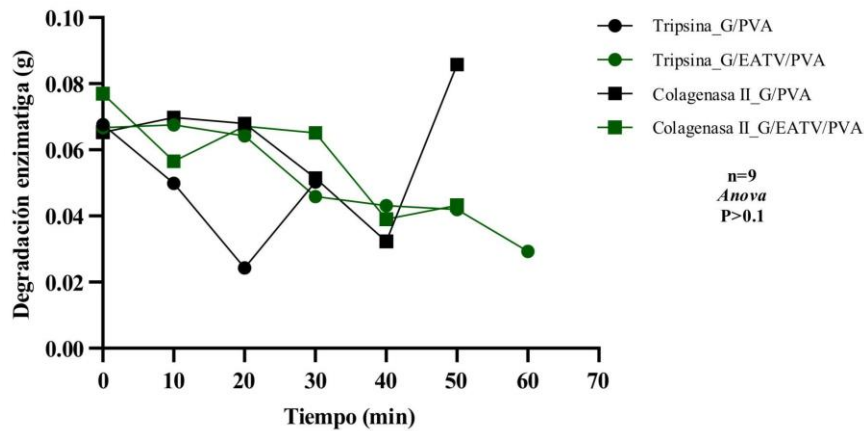


Gráfico 4. Gráfico que representa los resultados de la pérdida de peso en soluciones de Colagenasa II y Tripsina. En el eje Y se muestra la degradación enzimática en g, comparado con respecto al eje X que corresponde al tiempo en min. Los resultados corresponden a los grupos G/EATV/PVA en comparación con el grupo G/PVA y Colagenasa II en comparación con Tripsina. Se observó que frente a la Colagenasa II, el grupo G/EATV/PVA (0.05802 ± 0.014 gr) mostró aumentos y pérdidas de peso de forma inconstante, hasta el min 50 que colapsó, y G/PVA (0.06208 ± 0.01826 gr) que mostró una disminución constante hasta el min 50 que aumentó su peso y colapsó. Por otro lado, frente a Tripsina se mostró una pérdida constante de peso por parte del grupo G/EATV/PVA (0.05125 ± 0.014 gr) hasta el min 60 que colapsó, a diferencia del grupo G/PVA (0.04806 ± 0.017 gr) que mostró una disminución y aumento inconstante de peso hasta que colapsó en el min 50.

12.6. Resultados de ensayo de difusión en agar Mueller Hinton

Tabla 2. Resultados del ensayo de inhibición bacteriana. En las columnas se muestran los resultados de cada ensayo en mm, \pm . En cada fila se expresan los resultados correspondientes a cada bacteria.

		Halo de inhibición (mm)				Desviación estándar
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	
Ensayo S. <i>aureus</i>	Grupo experimental	6.5	7.5	7.75	7.25	0.661437828

	Control positivo	9	9	9.25	9.083	0.144337567
	Control negativo	4	4	5	4.333	0.577350269
Ensayo <i>E. coli</i>	Grupo experimental	7.75	6.5	7.5	7.25	0.661437828
	Control positivo	8	8.25	8.5	8.25	0.25
	Control negativo	7.25	5	7.5	6.583	1.376892637
Ensayo <i>S. mutans</i>	Grupo experimental	7.75	9.5	8.25	8.5	0.901387819
	Control positivo	10.75	10	9.75	10.166	0.5204165
	Control negativo	4.75	5.25	4.25	4.75	0.5

En el ensayo de *S. aureus*, y *E. coli* el grupo G/EATV/PVA muestra un resultado de inhibición de 7.25 ± 0.661 , siendo más sensible a estas bacterias a comparación de la bacteria *S. mutans* que tuvo como resultado 8.5 ± 0.901 .

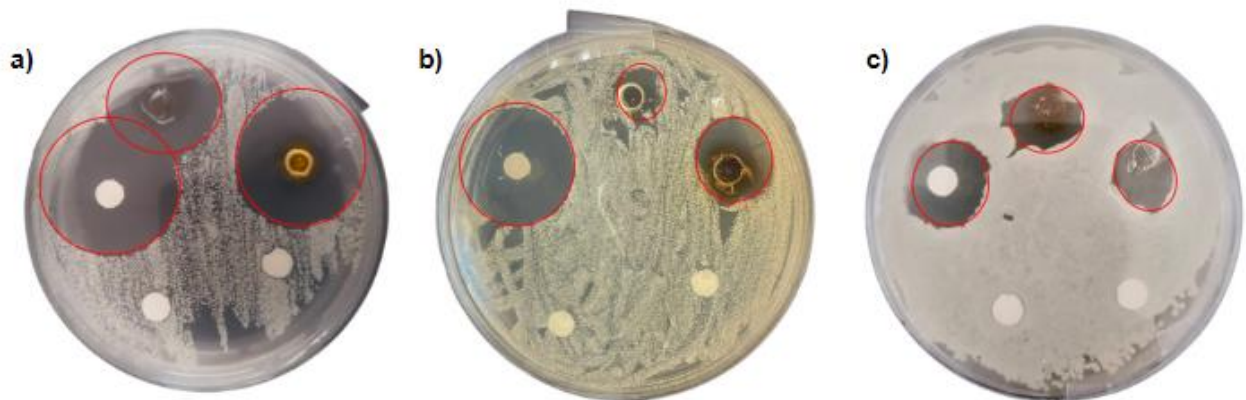


Figura 7. Resultado de los ensayos de difusión sobre agar Mueller Hinton frente a bacterias *S. mutans*, *S. aureus* y *E. coli*. En estas imágenes se representa el efecto antimicrobiano a través de un halo de inhibición de los hidrogeles de GtA/EATV + PVA y GtA+ PVA, comparados con CHX al 0.2 %, frente a las bacterias a) *S. aureus*, b) *S. mutans* y c) *E. coli*. En estas imágenes se puede mostrar que el grupo CHX 0.2% es el que tiene mayor inhibición, posteriormente el grupo G/EATV/PVA y finalmente el grupo G/PVA con el menor porcentaje de inhibición.

12.7. Resultados de ensayo de microdilución en caldo Mueller Hinton

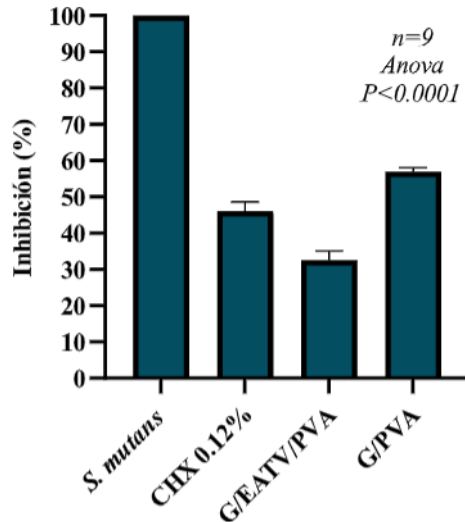


Gráfico 5. Gráfico de barras de los resultados obtenidos en el ensayo de microdilución frente a *S. mutans*. Se muestra el porcentaje de inhibición de los grupos G/EATV/PVA (67.43 ± 2.503 %), CHX 0.2 % (53.92 ± 2.511 %) y G/PVA (43.02 ± 1.037 %) en comparación con el grupo control *S. mutans* (100 %).

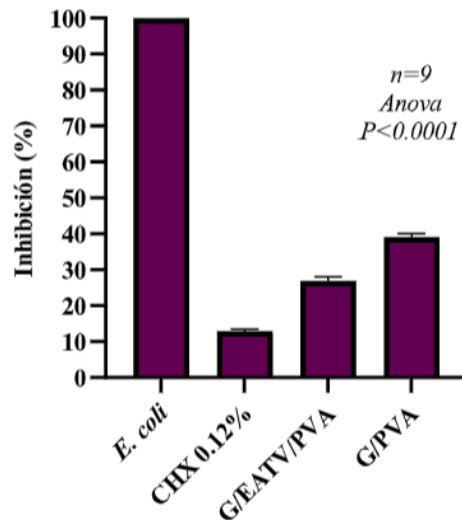


Gráfico 6. Gráfico de barras de los resultados obtenidos en el ensayo de microdilución frente a *E. coli*. Se muestra el porcentaje de inhibición de los grupos G/EATV/PVA (73.16 ± 1.61 %), CHX 0.2 % (87.15 ± 0.5993 %) y G/PVA (60.86 ± 0.9012 %) en comparación con el grupo control *E. coli* (100 %).

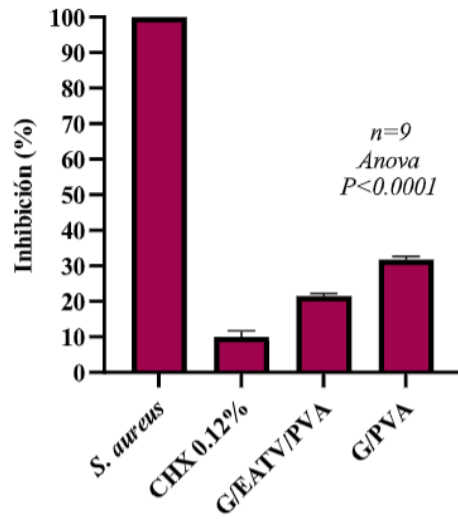


Gráfico 7. Gráfico de barras de los resultados obtenidos en el ensayo de microdilución frente a *S. aureus*. Se muestra el porcentaje de inhibición de los grupos G/EATV/PVA (78.57 ± 0.7731 %), CHX 0.2 % (90.02 ± 1.754 %) y G/PVA (68.31 ± 0.9623 %) en comparación con el grupo control *S. aureus* (100 %).

13. Discusión

Síntesis de hidrogel:

Claudia Echeverri y cols. (2019) En un estudio de síntesis de hidrogeles para aplicaciones médicas utilizaron PVA como material principal para la elaboración del hidrogel. En este estudio se demostró que el hidrogel de PVA a concentraciones de 7.5 % muestra un mayor porcentaje de hinchamiento, así como resistencia y estabilidad en largos periodos de temperaturas altas y diferentes escalas de pH.

Julia Laya y cols. (2017) concluyeron en un estudio hecho para comparar las propiedades de hidrogeles semi-interpretados de poliacrilamida y PVA, e hidrogeles de poliacrilamida, que los grupos adicionados con PVA mostraron una notable mayor absorción, rigidez y resistencia frente a diferentes estímulos a comparación de los grupos no adicionados con este biomaterial.

Osorio González y cols. (2020) concluyeron que, el hidrogel que habían preparado en conjunto con Quitosano y PEG con un mayor porcentaje de Gelatina tipo A era el más apto para ser usado debido a su resistencia y capacidad de hinchamiento, y porque debido a su biocompatibilidad, mostraría signos de tener una buena interacción con heridas.

Ensayo de citotoxicidad:

Cárdenas Gutiérrez y cols. (2018) mediante un estudio con hidrogeles demostraron su potencial efecto antiinflamatorio y sobre la regeneración de tejidos a nivel periodontal.

Pedrosa y cols. (2021) hicieron una revisión enfocada en el uso de hidrogeles como tratamiento farmacológico tras cirugías maxilofaciales como cirugía ortognática y legrado con reconstrucción mandibular, donde encontraron que el objetivo principal de estos hidrogeles era brindar un efecto antibiótico, pero también se vio una aceleración en el tiempo de regeneración ósea, y por lo tanto una mayor

proliferación celular, e igualmente se vio una considerable disminución en el tiempo de parestesia.

Ensayo de degradación hidrolítica y enzimática:

En un estudio realizado por Celestina Gorgivea y cols. (2012), se hicieron pruebas de degradación enzimática con colagenasa tipo II y lisozima, de un hidrogel de Gelatina adicionado con Quitosano donde se mostró que éste mantuvo su estabilidad en presencia de estas enzimas. También, en este estudio se sometió al hidrogel a un proceso de liofilización donde se demostró una mejor adaptación de las propiedades del hidrogel a las especificaciones de los tejidos, así como un mayor tiempo de degradación.

Ensayo antimicrobiano:

Machado Tan y cols. (2021) evaluaron el efecto de diversas plantas frente a varios patógenos y reportaron que muestran una disminución bacteriana importante.

Es importante señalar que los metabolitos presentes en el té verde responsables de sus propiedades como el efecto antimicrobiano, son los llamados fenoles y flavonoides. Cárdenas Gutiérrez y cols. (2018)

Taketo Kawarai y cols. (2016), proponen que la acción antibacteriana del té verde está basada principalmente en las catequinas, las cuales inhiben la enzima glucosiltransferasa B, C y D bacteriana, responsable de la síntesis de glucanos lo cual a su vez permite la coagregación bacteriana.

14. Conclusiones

Los resultados reportados en este proyecto de investigación demuestran que el hidrogel de G/EATV/PVA tiene propiedades antimicrobianas, de viabilidad celular y adecuado tiempo de degradación, que, en conjunto, abren posibilidades para un futuro uso en el área de odontología, específicamente como tratamiento postquirúrgico.

En los ensayos de citotoxicidad se observó que el grupo experimental no tuvo un efecto citotóxico frente a PDLSCs, pero también se demostró que no hubo algún tipo de proliferación celular. Asimismo, con el grupo control, no hubo un efecto citotóxico alto, pero tampoco proliferación, teniendo un mejor resultado el grupo experimental.

En los ensayos de degradación hidrolítica (PBS) y enzimática (Tripsina y Colagenasa tipo II) mostraron un adecuado tiempo de degradación. Frente a PBS y Tripsina, tanto el grupo experimental como el grupo control mostraron resultados muy similares, casi iguales, pero teniendo una menor absorbancia a comparación de la Colagenasa tipo II que tuvo una considerable mayor absorbancia a comparación de las pruebas de PBS y Tripsina, tanto en el grupo control como el experimental.

En cuanto a los ensayos antimicrobianos se observaron respuestas un tanto distintas entre microdilución y difusión. En los ensayos de difusión se pudo notar que tanto el grupo experimental (G/EATV/PVA) como el grupo control negativo (G/PVA) tuvieron efecto de inhibición bacteriana, aunque en diferente medida. Frente a *S. mutans* el grupo experimental tuvo una inhibición muy similar al control positivo (Clorhexidina al 0.2 %) e incluso el grupo control tuvo una muy notable inhibición. Frente a *S. aureus* fue donde se notó una mayor diferencia entre el control positivo, y los grupos experimental y control negativo, teniendo estos últimos una mucho menor inhibición. Frente a *E. coli* se mostró una inhibición muy similar entre todos los grupos, pero en promedio teniendo unos halos de inhibición menores a los ensayos de las otras bacterias.

En los ensayos de microdilución, frente a la bacteria *S. mutans*, se mostró un excelente efecto antimicrobiano por parte del grupo experimental, incluso superando al grupo control positivo, que frente a esta bacteria fue donde menor efecto antimicrobiano tuvo, y el grupo control negativo, aunque también mostró efecto, fue considerablemente menor al grupo experimental. Frente a la bacteria *E. coli* fue donde se vio un mucho menor efecto antimicrobiano por parte de los grupos experimental y control negativo, y el control positivo sí mostró un buen efecto. Finalmente, frente a *S. aureus* se vio un buen efecto antimicrobiano por parte del grupo experimental, frente a esta bacteria es donde el control positivo tuvo un mayor efecto antimicrobiano, pero donde el grupo control negativo tuvo un muy bajo efecto antimicrobiano.

Frente a los resultados obtenidos podríamos inferir que, el hidrogel de G/EATV/PVA a futuro, puede ser un tratamiento viable, ya que presenta buenas propiedades antimicrobianas y principalmente frente a *S. mutans*, que es la bacteria más abundante en cavidad oral, también mostró un buen tiempo de degradación hidrolítica y enzimática lo que facilita su uso en boca, y finalmente, aunque no hubo una proliferación de células sí mostró un buen comportamiento frente a éstas. Por lo tanto, se puede concluir que, si se sigue trabajando en este proyecto a futuro, puede ser una opción de tratamiento postquirúrgico como reemplazo de terapia antibiótica.

Bibliografía

1. A.B. Sharangi. (2009). Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. *Food Research International*, 42, 529–535. 16/10/2022, De Elsevier Base de datos.
2. Acevedo Fernández, J. J., Angeles Chimal, J. S., Rivera, H. M., Petricevich López, V. L., Nolasco Quintana, N. Y., Collí Magaña, D. Y., & Santa-Olalla Tapia, J. (2013). Modelos in vitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. *Bioactividad de Péptidos Derivados de Proteínas Alimentarias*, 29–82. <https://doi.org/10.3926/oms.38>
3. Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M., & Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235–6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
4. Arredondo Peñaranda Alejandro, Marta Elena Londoño López. (2009). Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Revista Ingeniería Biomédica*, 3, 83-94. 23/10/2021, De Scielo Base de datos.
5. Ayala Valencia, G. (2015). Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *Revista Scientia Agroalimentaria*. <http://revistas.ut.edu.co/index.php/scientiaagro/article/view/743/579>
6. Banas, J., A. (2004). Virulence properties of *Streptococcus Mutans*. *Frontiers in Bioscience*, 9(1-3), 1267. <https://doi.org/10.2741/1305>
7. Bioteck SpA. - H42® (2023, March 15). Bioteck SpA. <https://bioteck.com/es/h42/>
8. Bustamante, O. C., Troncos, L. G. P., Zebrauskas, A. P. P. de, Leandro, K. C. R., & Sime, C. L. del C. H. (2020). ANTISÉPTICOS ORALES: CLORHEXIDINA, FLÚOR Y TRICLOSÁN. *Salud & Vida Sipanense*, 7(1), 4–16. [tps://doi.org/10.26495/svs.v7i1.1280](https://doi.org/10.26495/svs.v7i1.1280)
9. Bustos-Martinez, J. A., Hamdan-Partida, AGutierrez-Cardenas, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: the reemergence of a pathogen in the community. *Revista BiomeDica*, 17(4), 287–305. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDREVISTA=90&IDARTICULO=13870&IDPUBLICACION=1432>
10. Cárdenas Gutiérrez, A. M., Fernández, A., Pieschacón, M. P., & Navarro, G. (2019). Sistemas de administración de estatinas en el tratamiento de la periodontitis: una revisión de literatura. *UstaSalud*, 17, 40–47. <https://doi.org/10.15332/us.v17i0.2186>
11. DeMerlis, C. C., & Schoneker, D. R. (2003). Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 41(3), 319–326. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(02\)00258-2](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(02)00258-2)
12. Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., ... & Fiñana, I. T. (2010). Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Universidad de Córdoba*, 1-8.
13. Echeverri, Claudia. E., & Londoño, M. E. (2019). Síntesis Y Caracterización De Hidrogeles De Alcohol Polivinílico Por La Técnica De Congelamiento/Descongelamiento Para Aplicaciones Médicas. *Scielo.org; Revista EIA*. <http://www.scielo.org.co/pdf/eia/n12/n12a05.pdf>
14. Escobar M, Linamaría, Rivera, Augusto, & Aristizábal G, Fabio A. (2010). Estudio Comparativo De Los Métodos De Resazurina Y Mtt En Estudios De Citotoxicidad En Líneas Celulares Tumorales Humanas. *Vitae*, 17 (1), 67-74. Recuperado el 28 de septiembre de 2023, de

- http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012140042010000100009&lng=en&tlng=es
15. Gacén Guillén, J., & Gacén Esbec, I. (1996). Quitina y quitosano. Nuevos materiales textiles. Artículo. Obtenido de <http://hdl.handle.net/2099/6421>
 16. Gallegos-Hernández, G. F. (2018). Ensayos colorimétricos para la detección de citotoxicidad [Review of ensayos colorimétricos para la detección de citotoxicidad]. *Vidsupra Visión Científica*, 10(1), 1–4. IPN-CIIDIR Durango. <https://www.ciirdurango.ipn.mx/assets/files/ciirdurango/docs/VIDSUPRA/REVISTAS/VSV10N1.pdf#page=5>
 17. Gholap, S. G., Jog, J. P., & Badiger, M. V. (2004). Synthesis and characterization of hydrophobically modified poly(vinyl alcohol) hydrogel membrane. *Polymer*, 45(17), 5863–5873. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.06.032>
 18. Gómez-Estaca, J., Montero, P., Fernández-Martín, F., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Physico-chemical and film-forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: A comparative study. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.022>
 19. Gorgieva, S., & Kokol, V. (2012). Preparation, characterization, and in vitro enzymatic degradation of chitosan-gelatine hydrogel scaffolds as potential biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100A(7), 1655–1667. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34106>
 20. Hamilton-Miller. (1995). Antimicrobial Properties of Tea (*Camellia sinensis* L.). *American Society for Microbiology*, 39, 2375–2377. 01/11/2022, De <https://journals.asm.org/> Base de datos.
 21. Halperin-Sternfeld, M., Pokhojaev, A., Ghosh, M., Rachmiel, D., Kannan, R., Grinberg, I., Asher, M., Aviv, M., Ma, P. X., Binderman, I., Sarig, R., & Adler-Abramovich, L. (2022). Immunomodulatory fibrous hyaluronic acid-Fmoc -diphenylalanine-based hydrogel induces bone regeneration. *Journal of Clinical Periodontology*. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13725>
 22. Herrera, Marco Luis. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34 (Supl.), 33-41. Recuperado el 18 de septiembre de 2023, de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101785461999000100010&lng=en&tlng=es
 23. Herrera, Marco Luis. (2004). Interpretación de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 39 (1), 61-65. Recuperado el 18 de septiembre de 2023 de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462004000100007&lng=en&tlng=en
 24. Huttner, A., Harbarth, S., Carlet, J. et al. Resistencia a los antimicrobianos: una visión global del Foro Mundial de Infecciones Asociadas a la Atención Médica 2013. *Antimicrob Resist Infect Control* 2 , 31 (2013). <https://doi.org/10.1186/2047-2994-2-31>
 25. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
 26. Kawarai T, Narisawa N, Yoneda S, Tsutsumi Y, Ishikawa J, Hoshino Y, et al. Inhibition of biofilm formation of *Streptococcus mutans* using Assam tea extracts compared to green tea. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2016. 25/09/2022; 68: 73-82. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.04.002>

27. Machado-Tan, T., & Reyes-Labarcena, B. (2021). Streptococcus mutans, principal cariogénico de la cavidad bucal. Progaleno, 4(3), 209-221. Recuperado de <https://revprogaleno.sld.cu/index.php/progaleno/article/view/233/222>
28. Martínez, María, T., Directoras, Merino, D., Dra, S., González, Á., Dra, María Del, V., Bermejo, S., & Valencia. (2016). Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración y liberación modificada de fármacos TESIS DOCTORAL. <https://roderic.uv.es/handle/10550/57123>
29. Medina-Morales, D., Machado-Duque, M., & Machado-Alba, J. (n.d.). (2015). Resistencia a antibióticos, una crisis global. <http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v21n1/v21n1a13.pdf>
30. Moromi Nakata, H., Martínez Cadillo, E., Gutiérrez Ilave, M., Ramos Perfecto, D., Núñez Lizarraga, M. E., Burga Sánchez, J., Tello, J., & Trevejo, I. (2014). Efecto antimicrobiano in vivo de la infusión de Camellia sinensis sobre bacterias orales. Odontología Sanmarquina, 10(2), 12. <https://doi.org/10.15381/os.v10i2.3011>
31. Lárez Velásquez, C., (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. Avances en Química, 1 (2),15-21.[fecha de Consulta 27 de Diciembre de 2022]. ISSN: 1856-5301. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93310204>
32. Lei, L., Bai, Y., Qin, X., Liu, J., Huang, W., & Lv, Q. (2022). Current Understanding of Hydrogel for Drug Release and Tissue Engineering. Gels (Basel, Switzerland), 8(5), 301. <https://doi.org/10.3390/gels8050301>
33. Lindhe, J., & Lang, N. P. (2017). Periodontología clínica e implantología odontológica (6a edición). Editorial Médica Panamericana.
34. Lu, L., Yuan, S., Wang, J., Shen, Y., Deng, S., Xie, L., & Yang, Q. (2018). The Formation Mechanism of Hydrogels. Current stem cell research & therapy, 13(7), 490–496. <https://doi.org/10.2174/1574888X12666170612102706>
35. Organización Panamericana de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos - OPS/OMS | (n.d.). Www.paho.org. <https://www.paho.org/es/temas/resistencia-antimicrobianos>
36. Osorio González, E., Echeverri, C., Andrea, N., & Pérez, A. (2020). Hidrogeles Como Apósitos Para Heridas Cutáneas. <https://repository.eia.edu.co/server/api/core/bitstreams/351d71b5-876b-4cde-b6ac-c61a4a2f91c5/content>
37. Oviedo-García, E., Salas, L.,(2013). Streptococcus mutans y caries dental. Revista CES Odontología, Volumen 26 No. 1 Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v26n1/v26n1a05.pdf>
38. Paradossi, G., Cavalieri, F., Chiessi, E. et al. (2003) Poli (vinil alcohol) como biomaterial versátil para posibles aplicaciones biomédicas. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 14 ,687–691.
39. Parmar Namita, Rawat Mukesh and Kumar J. Vijay 1. (2012). Camellia Sinensis (Green Tea): A Review. Global Journal of Pharmacology, 6, 52-59. 16/10/2022, De cloudfront.net Base de datos.
40. Pedrosa, G., Grillo, R., & Teixeira, R. G. (2021). Hidrogel sobre material de fixação em cirurgias maxilofaciais. Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac, 44–50. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1391205>
41. Ramirez, Arnaldo, Benítez, José Luis, Rojas de Astudillo, Luisa, & Rojas de Gáscue, Blanca. (2016). Materiales polimeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, 36(2), 108-130. Recuperado en 02 de noviembre de 2022, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0255-69522016000200002&lng=es&tlng=es

42. Research, C. for D. E. and. (2019). La FDA advierte acerca de reacciones alérgicas poco comunes pero graves del antiséptico tópico con gluconato de clorhexidina. FDA. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/la-fda-advierte-acerca-de-reacciones-alergicas-poco-comunes-pero-graves-del-antiseptico-topico-con>
43. Romero–Serrano, A., & Pereira, J. (2020). Estado del arte: Quitosano, un biomaterial versátil. Estado del Arte desde su obtención a sus múltiples aplicaciones. Revista INGENIERÍA UC, 27(2), 118–135. Retrieved from <https://www.redalyc.org/journal/707/70764230002/html/>
44. Saeed, M., Naveed, M., Arif, M., Kakar, M. U., Manzoor, R., Abd El-Hack, M. E., Sun, C. (2017). Green tea (*Camellia sinensis*) and L -theanine: Medicinal values and beneficial applications in humans—A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1260–1275. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.024>
45. Saxena, A., Tripathi, B. P., Kumar, M., & Shahi, V. K. (2009). Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(1-2), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.07.004>
46. Serna-Cock, Liliana, Velásquez, Mario, & Ayala, Alfredo A. (2010). Efecto de la Ultrafiltración sobre las Propiedades Reológicas de Gelatina Comestible de Origen Bovino. *Información tecnológica*, 21(6), 91-102. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642010000600011>
47. Silva, I. R. da, Barreto, A. T. da S., Seixas, R. S., Paes, P. N. G., Lunz, J. do N., Thiré, R. M. da S. M., & Jardim, P. M. (2023). Novel Strategy for Surface Modification of Titanium Implants towards the Improvement of Osseointegration Property and Antibiotic Local Delivery. *Materials (Basel, Switzerland)*, 16(7), 2755. <https://doi.org/10.3390/ma16072755>
48. Vargas Casillas, A. P., Yáñez Ocampo, B. R., & Monteagudo Arrieta, C. A. (2021). *Periodontología e implantología (2a edición)*. Editorial Médica Panamericana.
49. Viera-González, P. M. (2014). Estudio del acoplamiento de un colector solar con fibras ópticas plásticas para la iluminación de interiores. [Review of Estudio del acoplamiento de un colector solar con fibras ópticas plásticas para la iluminación de interiores]. Research Gate; Universidad Autónoma de Nuevo León. https://www.researchgate.net/publication/308019998_Estudio_del_acoplamiento_de_un_colector_solar_con_fibras_opticas_plasticas_para_la_iluminacion_de_interiores
50. Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H., & Soto-Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista BiomeDica*, 25(3), 129–143. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=53414>
51. Laya, J., Marfisi, S., López, G., Pastrana, J., Sousa, M. G. de, Peña, G., & Gascue, B. R. de. (2017). Hidrogeles semi-interpenetrados de poli(acrilamida/polí (vinil alcohol): estudio de su estructura, capacidad de absorción y propiedades mecánicas. *Avances En Química*, 12(2-3), 37–40. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93357608003>

Anexo(s)

Anexo 1. Preparación de reactivos

Preparación de PBS

Reactivos	Fórmula	Cantidad
Phosphate buffered saline	Na_2HPO_4	1 tableta
Agua desionizada	H_2O <i>Millo Q</i>	100 mL

En un vaso de precipitados con un agitador magnético y colocado en una parrilla magnética se vertieron 100 mL de agua desionizada y se colocó una tableta de PBS, se dejó en agitación a temperatura ambiente hasta homogeneizar.

Preparación de Colagenasa tipo II

Reactivos	Fórmula	Cantidad
Colagenasa tipo II		6.4 mg
Cloruro de calcio	ClCa_2	58 mg
PBS	Na_2HPO_4	40 mL

En un vaso de precipitados con un agitador magnético y colocado en una parrilla magnética se vertieron 40 mL de PBS y se añadieron 6.4 mg de colagenasa tipo II y 58 mg de Cloruro de calcio, se dejó en agitación a temperatura ambiente hasta homogeneizar.

Preparación de MTT

Reactivos	Cantidad
Caldo Mueller Hinton preparado	30 mL
Sales de MTT	0.06 mg

En la campana con previa exposición a luz UV por 10 minutos se colocaron 30 mL de caldo Mueller Hinton con un pipetor, se agregaron las sales de MTT y se cerró el tubo Falcon y se selló con Parafilm. Posteriormente se llevó a agitación a 60 rpm por 30 min y finalmente se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Preparación de Cloruro de sodio

Reactivos	Fórmula	Cantidad
Cloruro de sodio	NaCl	8.5 gr
Agua desionizada	H ₂ O <i>Millo Q</i>	1000 mL

Se vertieron 1000 mL de H₂O *millo Q* en un vaso de precipitado, se le agregaron 8.5 gr de NaCl y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente hasta homogeneizar. Se almacenó en un frasco de vidrio con tapa y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.