



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
SUPERIORES UNIDAD LEÓN**

TÍTULO:

**“Síntesis de un hidrogel de gelatina tipo
A/PVA/quitosano y su evaluación químico-
biológica para su uso en odontología”**

MODALIDAD DE TITULACIÓN:

**ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN Y
EXAMEN PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN ODONTOLOGÍA

P R E S E N T A

JOSÉ LEONARDO MEDRANO ALVAREZ

TUTOR: Dr. René García Contreras

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



**Escuela
Nacional de
Estudios
Superiores**
Unidad León



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.

Dedicatorias

A mi madre que me apoyó de principio a fin en esta etapa dándome amor y las herramientas para lograr esta meta acompañándome incondicionalmente durante este camino siendo mi inspiración para salir adelante.

A mis hermanas que siempre estuvieron ahí para brindarme palabras de aliento, apoyo y su amor incondicionalmente.

A mi abuelo Lucho por siempre estar conmigo y siendo una inspiración muy grande para dar siempre lo mejor de mí en cualquier ámbito de mi vida.

A mi familia que me brindó siempre el apoyo necesario para salir adelante.

Agradecimientos

A mi universidad porque puedo decir que es un orgullo formar parte de la UNAM.

Al Dr. René García Contreras por ser mi tutor a lo largo de este proyecto y por siempre brindarme apoyo.

A la Dra. Patricia Alejandra Chávez por adoptarme en el laboratorio apoyándome con mis experimentos y por todo el conocimiento compartido.

Al Dr. Benjamín Aranda Herrera por ayudarme a entender un poco más la ciencia de la investigación y apoyarme con los ensayos de citotoxicidad, así como aclarar cualquier duda.

A los doctores que forman parte del laboratorio de Nanoestructuras y biomateriales de la ENES, Unidad León, por todos los conocimientos compartidos, así como los consejos y contribuir al proyecto.

A mis amigos que hicieron que esta etapa se convirtiera en una de las mejores.

A mis padres y familia por acompañarme durante esta etapa.

A los doctores del servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial por permitirme aprender de cada uno de ellos, así como incentivar siempre el ser apasionado por esta hermosa profesión.

A cada uno de los doctores que me enseñaron incansablemente y por su gran dedicación durante mi formación académica enseñándome a ser un profesional bien preparado y sobre todo por compartir sus conocimientos con cariño.

A Clarisa por ser mi partner de laboratorio y por ayudarme a hacer todo más simple dentro del laboratorio.

Abreviaturas

mL	mililitro
gr	gramo
mm	milímetro
µm	micrómetro
nm	nanómetro
µL	microlitro
°C	grados Celsius
rpm	revoluciones por minuto
min	minutos
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>
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
DMSO	Dimetilsulfóxido
PBS	Buffer de fosfato salino
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
PVA	Poli (vinil alcohol)

Q	Quitosano
GtA	Gelatina tipo A
ST	Solución de trabajo
MH	Agar Mueller Hinton
CHX	Clorhexidina
SCAPs	Células madre de la papila dental
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Luz Ultravioleta visible

Índice

Resumen.....	9
Abstract	10
1. Introducción	11
2. Marco Teórico	12
2.1. Hidrogel	12
2.2. Gelatina tipo A.....	12
2.3. Poli (vinil alcohol) (PVA).....	13
2.4. Quitosano	13
2.5. Citotoxicidad.....	14
2.5.1. Ensayo de captación de rojo neutro	14
2.5.2. Ensayo de enlazamiento al azul de kenacid.....	14
2.5.3. Ensayo de reducción de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	15
2.6. Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana	15
2.6.1. Pruebas de difusión por disco.....	15
2.6.2. Pruebas de dilución en caldo	15
2.6.3. <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>).....	16
2.6.4. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	16
2.6.5. <i>Streptococcus mutans</i> (<i>S. mutans</i>).....	16
2.7. Espectrofotometría luz UV-Vis.....	16
2.7.1. Absorbancia.....	17
3. Antecedentes	18
4. Planteamiento del problema	19
5. Pregunta de investigación	20
6. Justificación.....	21
7. Objetivos	22
7.1. Objetivo General.....	22
7.2. Objetivos específicos	22
8. Hipótesis.....	23
9. Diseño metodológico	24
10. Variables.....	25
11. Criterios de selección.....	26
11.1. Criterios de inclusión.....	26
11.2. Criterios de exclusión.....	26
11.3. Criterios de eliminación	26
12. Material y equipo	27
13. Metodología	28

13.1. Preparación de quitosano 0.19%.....	28
13.2. Preparación de Solución de PVA 7.5%.....	28
13.3. Preparación de Solución de gelatina al 20%	29
13.4. Síntesis del Hidrogel.....	29
13.5. Ensayo de Degradación Enzimática e Hidrolítica	30
13.6. Ensayo de citotoxicidad	31
13.7. Ensayo de difusión en agar	32
13.8. Ensayo de microdilución en caldo.....	33
14. Resultados	36
14.1. Ensayo de Degradación Hidrolítica (absorbancia 350 nm).....	36
14.2. Ensayo de Degradación Hidrolítica (pérdida de peso %).....	36
14.3. Ensayo de degradación enzimática (Tripsina absorbancia 350 nm)	37
14.4. Ensayo de degradación enzimática (Colagenasa tipo II absorbancia 350 nm)	37
14.5. ensayo de degradación enzimática (Colagenasa tipo II y Tripsina pérdida de peso %)	38
14.6. Ensayo de citotoxicidad con células SCAPs	39
14.7. Resultados de microdilución bacteriana.....	40
14.7.1. Ensayo de microdilución con <i>Streptococcus mutans</i>	40
14.7.2. Ensayo de microdilución con <i>Escherichia coli</i>	40
14.7.3. Ensayo de microdilución con <i>Staphylococcus aureus</i>	41
14.8. Ensayo de difusión en agar	41
15. Discusión.....	43
16. Conclusión	45
17. Bibliografía	46
18. Anexo 1	49

Resumen

Introducción: Los hidrogeles son reconocidos en el área de la salud por su alta biocompatibilidad y la capacidad de liberar sustancias gradualmente sin adherirse a la superficie celular. El quitosano es un biopolímero usado como sistema de liberación controlada. **Objetivo:** Evaluar las características químico-biológicas de un hidrogel a base de Gelatina tipo A/PVA/quitosano para su uso en odontología. **Metodología:** Se sintetizó un hidrogel con quitosano (0.19%), Gelatina Tipo A (20%) y PVA (7.5%). Se realizaron pruebas de degradación enzimáticas con Tripsina y Colagenasa tipo II, e hidrolíticas con PBS evaluando la pérdida de peso cada 10 min. El efecto citotóxico se evaluó con células troncales de la papila apical dental (SCAPs) incubadas con el hidrogel por 24 h, y la viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT. La actividad antibacteriana se evaluó mediante ensayos de microdilución y difusión contra *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado (n=9). Se aplicaron pruebas de normalidad de Shapiro-Wilks, pruebas. **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 *Staphylococcus aureus* (75.49±16.25%, resistente), *Streptococcus mutans* (43.57±12.11%, sensible) y *Escherichia coli* (45.57±4.18%, sensible) **Conclusiones:** El hidrogel desarrollado demostró un tiempo de degradación adecuado junto con un efecto inhibitorio bacteriana notable, así como nula respuesta de citotoxicidad. Los resultados obtenidos sugieren potencialmente el uso dentro del área clínica odontología.

Abstract

Introduction: Hydrogels are recognized in the healthcare area for their high biocompatibility and ability to release substances gradually without adhering to the cell surface. Chitosan is a biopolymer used as a controlled release system.

Objective: To evaluate the chemical-biological characteristics of a hydrogel based on Gelatin type A/PVA/chitosan for its use in dentistry. **Methodology:** A hydrogel

was synthesized with Chitosan (0.19%), Type A Gelatin (20%) and PVA (7.5%). Enzymatic degradation tests were performed with Trypsin and Collagenase type II,

and hydrolytic with PBS evaluating the weight loss every 10 min. The cytotoxic effect was evaluated with dental apical papilla stem cells (SCAPs) incubated with the hydrogel for 24 h, and cell viability was determined with the MTT assay. Antibacterial

activity was evaluated by microdilution and diffusion assays against *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The assays were carried out in triplicate (n=9). Shapiro-wilks normality tests were applied. **Results:** Enzymatic

and total hydrolytic degradation took 70 and 60 min, respectively. Cell viability was not altered by the presence of the hydrogel. Antibacterial activity results were *Staphylococcus aureus* (75.49±16.25%; resistant), *Streptococcus mutans*

(43.57±12.11%; sensitive) and *Escherichia coli* (45.57±4.18%; sensitive) **Conclusions:** The developed hydrogel demonstrated an adequate degradation time

along with a remarkable bacterial inhibitory effect as well as null cytotoxicity response. The results obtained potentially suggest the use within the clinical area of dentistry.

1. Introducción

Una de las problemáticas actuales a nivel mundial es la resistencia a los antibióticos siendo un factor muy importante el uso desmedido de estos mismos a su vez como la mala administración, efectos adversos, automedicación por parte de la población trayendo consigo infecciones difíciles de tratar, así como mayor índice de morbilidad y mortalidad.

Las bacterias Grampositivas y Gramnegativas resistentes a los antibióticos convencionales han dado resultado en infecciones difíciles de tratar o incluso intratables.

Esto ha conllevado en los últimos años el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento para disminuir el uso de los antibióticos y generando nuevas alternativas (Frieri et al., 2017).

Los hidrogeles han sido muy estudiados en los últimos años por sus características como ser biocompatibles, capacidad de liberación progresiva, biodegradabilidad, tiene una superficie inerte, gran adaptación, hidrofílicos, además de tener una gran captación lo que le permite absorber y retener sustancias para su liberación (Peñaranda & López, 2009).

El quitosano ha sido un recurso muy estudiado, proviene de la quitina y su principal forma de obtención es de los exoesqueletos de los crustáceos convirtiéndose en el segundo recurso más abundante después de la celulosa. el quitosano se han estudiado sus propiedades y propiedades entre las cuales está el ser un antimicrobiano teniendo un espectro antimicrobiano con bacterias Grampositivas, Gramnegativas, así como algunas especies de hongos (Bhattarai et al., 2010).

2. Marco Teórico

2.1. Hidrogel

Los hidrogeles son estructuras tridimensionales conformadas de polímeros que se encargan de la absorción de agua hasta encontrar un equilibrio físico, teniendo características como absorción, retención y liberación bajo condiciones controladas, además de ser insolubles en agua, elástico e hidrofílico. La forma en la que se obtuvo el hidrogel determinará las propiedades de este.

Las aplicaciones en medicina han tenido gran relevancia debido a la fácil obtención del hidrogel y por su biocompatibilidad, capacidad de liberación, biodegradabilidad siendo una alternativa para tratar problemas dentro del área de la salud (Peñaranda & López, 2009).

Los hidrogeles se clasifican por su composición y pueden ser formados por polímeros naturales o sintéticos siendo los de origen natural los que presentan mayor biocompatibilidad y los sintéticos presentan una vida útil más prolongada.

Su síntesis puede darse por procesos químicos como polimerización radical, fotopolimerización, reacciones enzimáticas y entrecruzamiento covalente y su síntesis física está dada por las interacciones físicas con enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas añadiendo copolímeros de injerto, formación de estero complejos y cristalización teniendo con desventaja la formación de una red no permanente (Ahmadi et al., 2015).

2.2. Gelatina tipo A

La gelatina porcina tipo A obtenida del procedimiento de curar la piel porcina, huesos, y tejidos conectivos del ganado porcino mediante un proceso ácido, es usada en ámbitos de la industria alimentaria y farmacéutica por sus propiedades al ser usada como un transporte de sustancias (Nhari et al., 2011).

Las características de la gelatina como resistencia, fuerza y viscosidad dependen de la composición y proporciones de esta, esta ha sido usada dentro de la industria farmacéutica, médica y odontológica por su capacidad de crear hidrogeles que tienen la capacidad de ser térmicamente reversibles y aportar estabilidad al mismo (Etxabide et al., 2017).

2.3. Poli (vinil alcohol) (PVA)

El PVA ha sido usado en múltiples industrias como alimenticia, industrial, comercial y médica. Las características dependen de la síntesis de este clasificando en dos grupos: parcialmente hidrolizado y completamente hidrolizado.

La aplicación del PVA ha sido para la creación de parches transdérmicos, soluciones oftálmicas, así como la en odontología es usada para formulaciones de medicamentos de liberación inmediata o sostenida y regeneración de tejidos (DeMerlis & Schoneker, 2003).

2.4. Quitosano

El quitosano es un polímero con propiedades como biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad en concentraciones bajas, estas características permiten que sea usado en diferentes industrias como la farmacéutica, alimentaria, agricultura y cosmética. todas estas características y sumado a que es considerado como el segundo más abundante en la naturaleza (Cocoletzi et al., 2009).

El quitosano es un biopolímero derivado de la quitina que se encuentra en los exoesqueletos de los crustáceos y se obtiene mediante un proceso de N-desasetilación de estos.

Este biopolímero ha demostrado tener inhibición de crecimiento contra bacterias Gram negativas como (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomona aeruginosa*) y Gram positivas (*Streptococcus mutans*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis*) y sobre algunas especies de

hongos se ha usado como antimicrobiano dentro de la cavidad oral por ser bactericida y bacteriostático (Valencia G. 2015).

2.5. Citotoxicidad

La citotoxicidad es la capacidad de crear una alteración a la célula en alguna función básica de la misma creando un daño que puede ser detectado mediante diversos ensayos.

El empleo de diferentes ensayos ha llevado al desarrollo de pruebas *in vitro* para evaluar el efecto citotóxico de biomateriales experimentales usando modelos experimentales o líneas celulares que permitan al ensayo ser reproducible (Arrebola, 2003).

La concentración máxima reportada de quitosano es de 0.19% antes de causar efecto citotóxico sobre células pulpares humanas y fibroblastos gingivales humanos (Narvaez-Flores et al., 2021).

2.5.1. Ensayo de captación de rojo neutro

Este ensayo se encarga de evaluar la toxicidad debido a la pérdida de la viabilidad celular mediante la captación de un colorante rojo neutro captado por los lisosomas y endosomas de las células viables, evaluando la presencia de este colorante ya que las células no viables no son capaces de retener el colorante (Arrebola, 2003).

2.5.2. Ensayo de enlazamiento al azul de kenacid

Esta prueba se encarga de evaluar el crecimiento celular mediante la concentración de proteínas teñidas con el azul kenacid contenidas en el ensayo midiendo el grado de citotoxicidad del compuesto. Los resultados son obtenidos después de usar la espectrofotometría de luz UV-Vis a 570 nm (Arrebola, 2003).

2.5.3. Ensayo de reducción de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)

Es un método simple en el que se evalúa la citotoxicidad mediante la cantidad de células existentes en el cultivo después de exponerse al compuesto que se evalúa, el uso del MTT es para cuantificar las células viables mediante la coloración con un tono amarillo en las células que tienen una actividad mitocondrial y es cuantificado mediante la espectrofotometría de luz UV-Vis a 550 nm (Arrebola, 2003).

2.6. Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana

Son herramientas estandarizadas por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*, que nos permiten hacer la evaluación de forma reproducible y estandarizada las pruebas de sensibilidad antimicrobianas son: Difusión en agar, Dilución en agar, Microdilución en caldo, Microdilución en caldo, Epsilon test (E test), Métodos automatizados y Pruebas especiales (Cavalieri, 2009).

2.6.1. Pruebas de difusión por disco

Es una prueba antimicrobiana que se ha usado durante más de 70 años y fue creada por los doctores Bauer, Kirby, Sherris y Turck, consiste en el empleo de placas de agar añadiendo una suspensión de bacterias previamente estandarizada y se colocan en discos de papel con diferentes sustancias antimicrobianas. Posteriormente se deja en incubación en un periodo de 18-24 h y posterior al tiempo se miden los halos de inhibición bacteriana de las diferentes sustancias colocadas (Cavalieri, 2009).

2.6.2. Pruebas de dilución en caldo

El ensayo se realiza empleando una placa de 96 pocillos usando el caldo Mueller Hinton, separando los grupos a evaluar por filas teniendo un grupo de control positivo y negativo, además de los grupos experimentales que se desean evaluar (Herrera, 1999).

2.6.3. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

Son Grampositivos facultativos anaerobias formados por cadenas de cocos de 0.5 a 1.5 μm , no son bacterias móviles y son productoras catalasa. capaces de producir inflamación y supuración. Encontrado con frecuencia en infecciones comunitarias y hospitalarias (Cervantes-García et al., 2014).

2.6.4. *Escherichia coli* (*E. coli*)

Es un patógeno Gramnegativo anaerobio facultativo, comúnmente encontrado en la flora intestinal del ser humano, pero sin causar enfermedades, aunque hay cepas que pueden llegar a causar enfermedades graves, se dividen en 6 grupos de acuerdo con su patogenicidad y cuadro clínico (Rodríguez-Angeles, 2002).

2.6.5. *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)

Streptococcus mutans son cocos Grampositivo con capacidad acidogénica, acidófila y acidúrico, tienen capacidad adhesiva, a superficies duras, por las proteínas salivales derivadas de la dieta convirtiéndolos en patógenos oportunistas, favoreciendo la formación de biopelícula dental por la formación de glucanos insolubles a partir de sacarosa y siendo este el patógeno más abundante en la cavidad oral (Van Houte, 1994).

2.7. Espectrofotometría luz UV-Vis

Es una técnica de medición cuantitativa en la que mediante un espectrofotómetro se hace pasar una luz a una longitud de onda específica sobre una solución que nos permite determinar la concentración, en donde se cuantifica el paso de la luz a través de la interacción electromagnética con las moléculas en donde se relaciona linealmente la cantidad de luz absorbida con la concentración de la solución (Díaz et al., 2010).

2.7.1. Absorbancia

La absorbancia es la relación que existe entre el paso de un espectro de luz sobre la concentración de una sustancia, es directamente proporcional a su concentración, dando a mayor número de moléculas en la solución existe mayor interacción con el espectro de luz (Díaz et al., 2010).

3. Antecedentes

El uso de antibióticos en odontología es de suma importancia ya que se opta por usar la terapia antibiótica en procesos de infecciones odontogénicas que van de la mano con la intervención odontológica o incluso para prevenir procedimientos infecciosos como medida de profilaxis, usada después intervenciones como cirugía oral, implantología, endodóntica, periodontal y maxilofacial (Villagrana & Clavel, 2012).

Los hidrogeles fueron desarrollados en 1893 por el científico Jakob Maarten van Bemmelen usando el término para el desarrollo de una estructura gelatinosa y en 1960 Thomas Graham hace referencia a los hidrogeles como un sistema coloidal desarrollando su escrito “La difusión líquido-aplicada al análisis” dando un salto a como conocemos los hidrogeles hoy en día (Velásquez, 2019).

En 2006 se usó un hidrogel con quitosano como adhesivo tisular para aplicaciones quirúrgicas y como apósito, fue capaz de inducir la angiogénesis en ratones con problemas de cicatrización (Ishihara et al., 2006).

En 2014 se usó un hidrogel cargado con quitosano para la administración de insulina vía oral y logró reducir los niveles de glucosa en ratones diabéticos sin presentar toxicidad (Mukhopadhyay et al., 2014).

En 2021 se reportó el uso de un hidrogel de ácido hialurónico como protector sobre materiales de fijación en cirugías maxilofaciales mostrando mayor aceleración de la cicatrización, disminución de la parestesia y previniendo de infecciones (Pedroza et al., 2021).

4. Planteamiento del problema

En México se estima que el nivel de enfermedades orales es ocasionado por la falta de higiene de la población, siendo la enfermedad periodontal y la caries dental las enfermedades más recurrentes en la población (Trejo et al., 2017).

Estas enfermedades si no se atienden pueden derivar en múltiples tratamientos incluyendo una serie de tratamientos quirúrgicos como exodoncia, implantología, periodontal y endodóntica con el fin de que el tratamiento tenga éxito, este tipo de procedimientos requieren de cuidados específicos por parte del paciente en los cuales se incluye el uso de antibióticos y colutorios con principios antimicrobianos (Villagrana & Clavel, 2012).

El uso de la terapia farmacológica convencional presenta varias desventajas además de la actual problemática acerca sobre la resistencia a los antibióticos que es una problemática a nivel mundial y se han estado desarrollando nuevos tratamientos alternativos para disminuir el uso de antibióticos (Frieri et al., 2017).

5. Pregunta de investigación

El hidrogel de gelatina tipo A adicionado con PVA y quitosano ¿Presenta buenas propiedades de degradación, efecto antimicrobiano y viabilidad celular?

6. Justificación

La biodisponibilidad de los fármacos puede generar picos de concentración en el torrente sanguíneo, lo que puede ser problemático en términos de efectividad y seguridad. Para abordar este problema, se propone la aplicación de un hidrogel compuesto por quitosano y PVA. Esta combinación ofrece varias ventajas: en primer lugar, el quitosano es biocompatible, tiene baja citotoxicidad y es biodegradable, lo que lo hace seguro para su uso en aplicaciones médicas. Por otro lado, el PVA proporciona una gran capacidad de hinchamiento, estabilidad a diferentes temperaturas y pH, lo que asegura la integridad y la funcionalidad del hidrogel en diversas condiciones.

La incorporación de estos materiales en el hidrogel tiene como objetivo mitigar los picos de biodisponibilidad del agente antimicrobiano, lo que garantiza una liberación más controlada y sostenida del fármaco a lo largo del tiempo. Esto no solo mejora la eficacia del tratamiento, sino que también reduce el riesgo de efectos secundarios asociados con concentraciones plasmáticas elevadas.

7. Objetivos

7.1. Objetivo General

Elaborar un hidrogel a base de Gelatina tipo A adicionado con PVA y quitosano para evaluar sus características químico-biológicas.

7.2. Objetivos específicos

- Sintetizar un hidrogel a base de Gelatina tipo A, PVA y quitosano.
- Evaluar el tiempo de degradación de hidrogel de forma hidrolítica y enzimática.
- Determinar la citotoxicidad del hidrogel en contacto con células SCAPs.
- Determinar el efecto antimicrobiano por medio de pruebas de difusión y microdilución en cultivo con *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

8. Hipótesis

Se espera que el hidrogel de gelatina tipo A, enriquecido con PVA y quitosano, exhiba propiedades de degradación mejoradas, un efecto antimicrobiano efectivo y sin alterar la viabilidad celular.

9. Diseño metodológico

Tipo de estudio: Experimental puro *in vitro*.

Universo: - Hidrogeles sintetizados de GtA/PVA/Q y grupo control GtA/Q.

- Cultivo celular SCAPs.

- Microorganismos *S. mutans*, *S. aureus* y *E. coli*.

Tipo de muestreo: Muestreo no probabilístico por conveniencia.

Tamaño de muestra: Las pruebas se realizaron por triplicado $n=9$.

Espacio y tiempo: Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, UNAM, febrero 2023-noviembre 2023.

Análisis estadístico: Se analizó mediante promedio, desviación estándar y las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilks y análisis de ANOVA.

10. Variables

Tabla 1. Variables dependientes e independientes.

Variables dependientes	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo
Efecto antimicrobiano	Acción de reducir o eliminar la presencia de microorganismos	mm, nm	Cuantitativa/Cualitativa
Degradación	Capacidad de descomponerse en sustancias menos complejas	gr, nm	Cuantitativa
Efecto citotóxico	Capacidad de daño a la células o tejidos	nm	Cuantitativa
Variable Independiente	Definición conceptual	Definición Operacional	Tipo
Hidrogel de GtA/PVA/Q	Polímero sintetizado a base de gelatina		Cualitativa

mm=milímetro, nm= nanómetro, gr=gramo.

11. Criterios de selección

11.1. Criterios de inclusión

- Muestras de Hidrogel de gelatina tipo A, PVA y quitosano.
- Muestras que tengan buen tiempo de degradación enzimática e hidrolítica.
- Hidrogel sin efecto citotóxico.

11.2. Criterios de exclusión

- Muestras insuficientes.
- Muestras con mal conformación.
- Muestras con burbujas.

11.3. Criterios de eliminación

- Muestras contaminadas.
- Muestras con omisión de pasos establecidos en el protocolo.
- Muestras en las que el proceso de degradación sea deficiente o no sea el establecido en el protocolo.
- Muestras con efecto citotóxico.

12. Material y equipo

Gelatina tipo A (*Gelatin from porcine skin, gel strength 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 mL PVDF Membrane, Merck Millipore Ltd.*), 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 estériles y Papel Parafilm.

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 COz 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 mL (*Thermo Scientific*), Micropipeta 500 mL (*Thermo Scientific*), Micropipeta 100 mL (*Thermo Scientific*), Vasos de precipitado, Matraz Erlenmeyer y Tubos de densitómetro.

13. Metodología

13.1. Preparación de quitosano 0.19%

Se colocaron 100 mL de agua desionizada en un vaso de precipitado sobre una parrilla y se llevó el agua a una temperatura de 60 °C y se agregaron 1.9 gr de quitosano bajo agitación constante con un agitador magnético para posteriormente agregar 100 µL de ácido acético y se dejó en agitación durante 24 h a temperatura ambiente.

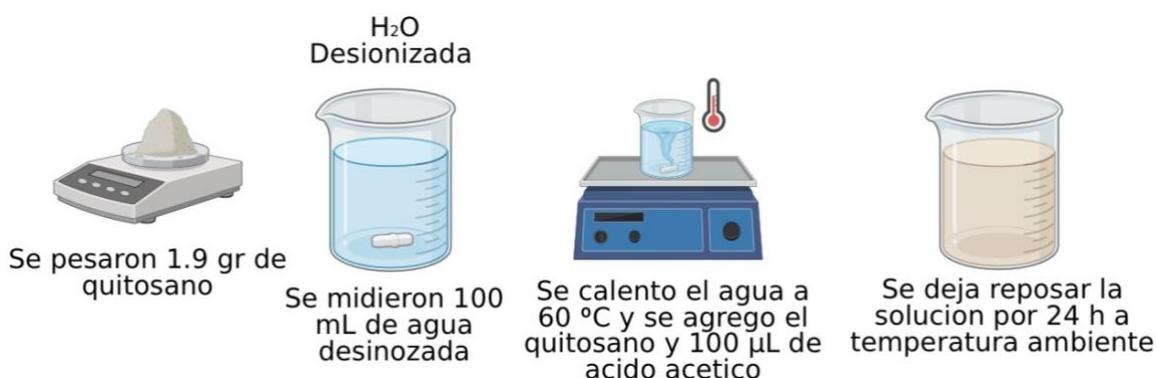


Figura 1. Preparación de Quitosano al 0.19%.

13.2. Preparación de Solución de PVA 7.5%

Se vertieron 30 mL de agua desionizada en un vaso de precipitado y se colocó en una parrilla hasta alcanzar una temperatura de 80 °C, una vez alcanzada esa temperatura se colocaron agregaron 2.25 gr de PVA y se dejó durante 3 h en agitación a temperatura constante de 80 °C.

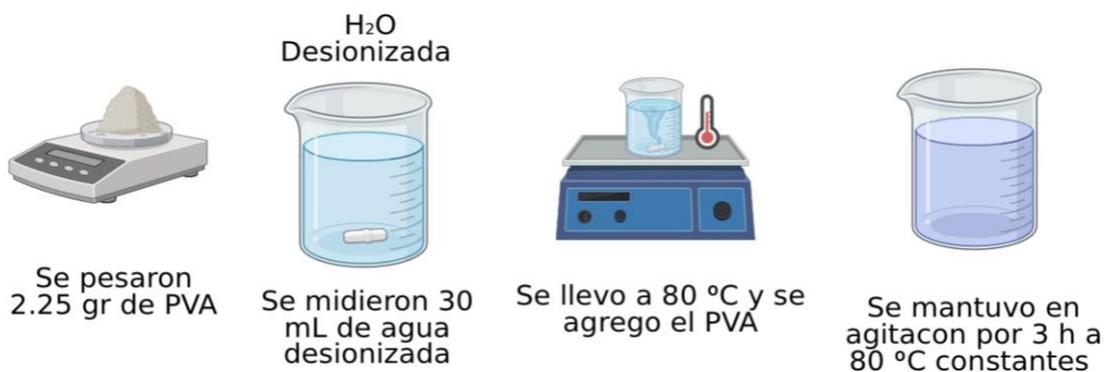


Figura 2. Preparación de solución de PVA al 7.5%.

13.3. Preparación de Solución de gelatina al 20%

Se vertieron 30 mL de agua desionizada en un vaso de precipitado y se calentó a 50 °C y se agregaron 6 gr de gelatina tipo A con agitación y temperatura constante hasta obtener una mezcla homogénea y se dejó en reposo con temperatura hasta su uso.

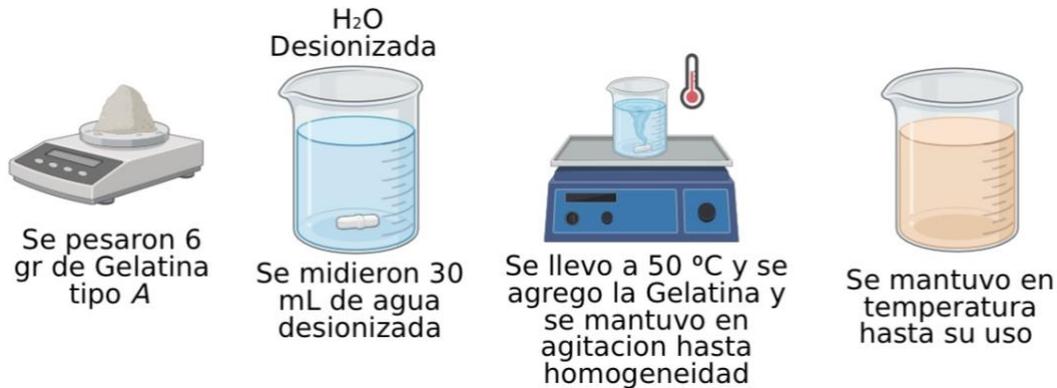


Figura 3. Preparación de solución de gelatina al 20%.

13.4. Síntesis del Hidrogel

Se vertieron en cantidades iguales la solución de Gelatina tipo A y la solución de PVA bajo agitación y temperatura constante posteriormente se agregaron 526 μ L de la solución de quitosano por cada 10 mL de hidrogel preparado manteniendo una concentración al 0.19%. Pasados 5 min y teniendo una solución homogénea se vertió en cajas Petri de 10 cm de diámetro, agregando 20 mL para obtener un espesor de 4 mm y posteriormente se sellaron con papel Parafilm y se transportaron a refrigeración a 4 °C hasta su uso.

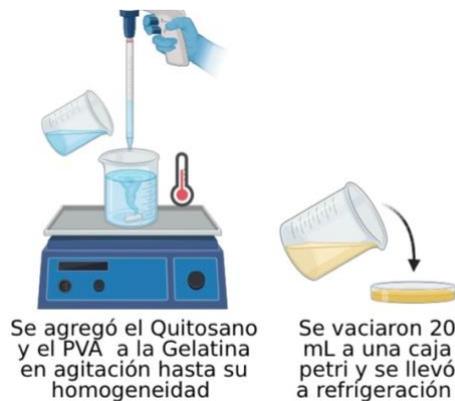


Figura 4. Síntesis del hidrogel de Gelatina tipo A, PVA y quitosano.

13.5. Ensayo de Degradación Enzimática e Hidrolítica

Se realizó el pesaje inicial del grupo control GtA/Q y del grupo experimental GtA/PVA/Q colocando una muestra en la balanza analítica y se registró en la bitácora; posteriormente se colocaron las muestras en tubos *Eppendorf* de 1.5 mL y 1 mL de solución de PBS para la degradación hidrolítica y Tripsina/EDTA al 1% y colagenasa tipo II respectivamente para la degradación enzimática. Los tubos se colocaron en la incubadora con una agitación constante de 60 rpm a 37 °C y cada 10 min se detuvo la agitación para pesar 1 muestra de cada grupo de Hidrogel y este proceso se repitió 8 veces hasta llegar a los 80 min.

Después de 24 h, se midió la absorbancia de 10 μ L de solución de PBS, tripsina/EDTA al 1% y colagenasa tipo II, previamente mezclados mediante Vortex, utilizando una placa de 96 pocillos. Este proceso se repitió para cada grupo de muestras para evaluar los diferentes periodos de tiempo. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro de luz UV-Vis a una longitud de onda de 350 nm.

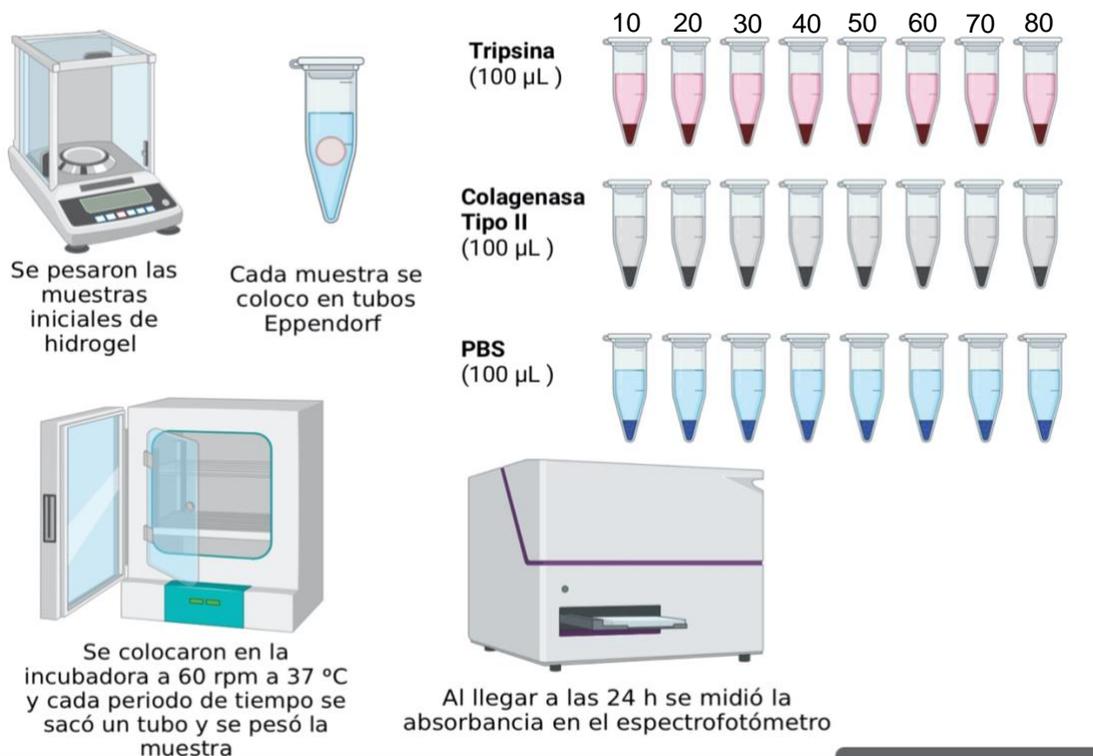


Figura 5. Ensayo de degradación enzimática e hidrolítica.

13.6. Ensayo de citotoxicidad

Se prepararon 2 grupos experimentales para hacer la comparación de los resultados de este estudio:

1. GtA/PVA/Q
2. GtA/Q

Se comenzó aspirando el medio del cultivo de SCAPs, seguido de dos lavados con 3 mL de PBS. Luego, se agregó 1 mL de tripsina EDTA al 1% y se incubó durante 5 min a 37 °C con 5% de CO₂ y humedad relativa.

Después de la incubación, se realizó un conteo celular bajo el microscopio. Posteriormente, se añadieron 7.3 mL de medio a una placa de 24 pocillos, con 300 µL de medio por pocillo.

Las muestras de los grupos control y experimental se expusieron a luz UV durante 15 min en una campana de flujo laminar horizontal. Luego, se obtuvieron muestras con un sacabocados de 6 mm, se dividieron por la mitad y se colocó una mitad en cada pocillo para entrar en contacto con las células. La placa se incubó durante 24 h a 37 °C con 5% de CO₂ y humedad relativa.

Pasadas las 24 h, se aspiraron los grupos experimentales y se lavaron dos veces con 300 µL de PBS. Luego, se agregaron 300 µL de MTT a todos los grupos y se incubaron durante 24 h bajo las mismas condiciones.

Tras la incubación, se aspiró el MTT y se agregaron 300 µL de DMSO en cada pocillo. Se transfirieron 100 µL a una placa de 96 pocillos, con 6 pocillos para cada grupo, y se analizó en un espectrofotómetro de luz UV-Vis a una longitud de onda de 570 nm.

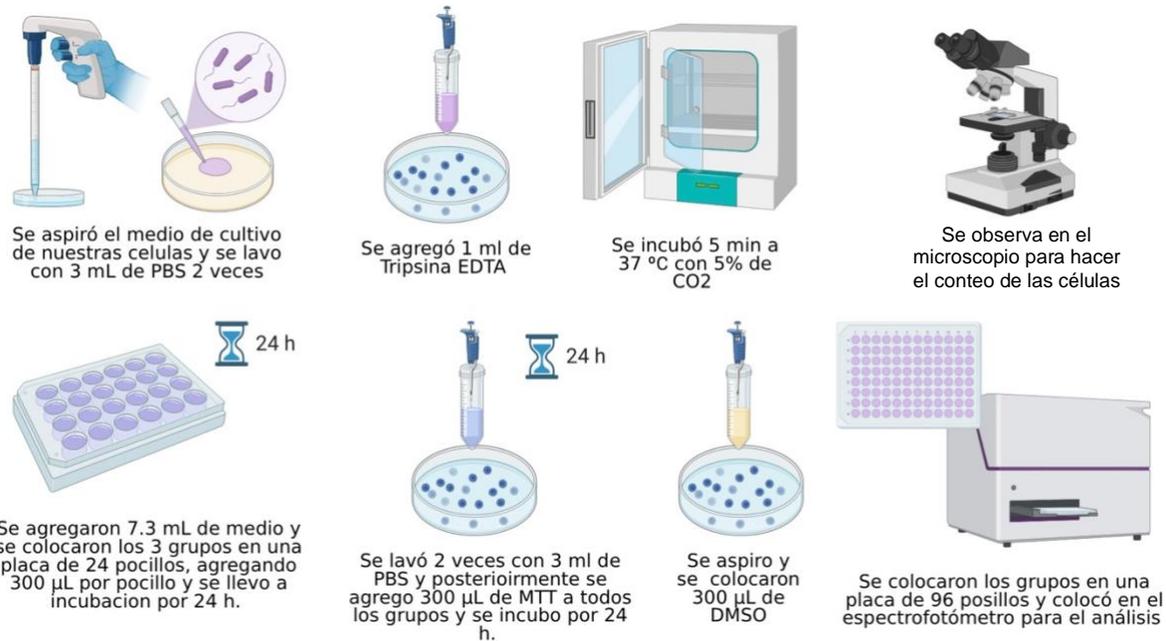


Figura 6. Ensayo de citotoxicidad.

13.7. Ensayo de difusión en agar

Iniciamos preparando los medios de agar Mueller Hinton, pesando 7.6 gr y midiendo 200 mL de agua desionizada. En un matraz Erlenmeyer, se combinaron los 200 mL de agua destilada con el agar y se llevó la mezcla a ebullición, dejándola hervir durante 1 min. Posteriormente, tapamos el matraz y lo autoclavamos durante 20 min a 121 °C. Una vez esterilizado, se preparó la campana de flujo y se llenaron 10 cajas Petri de 20 mL con el agar Mueller Hinton, dejándolas solidificar y luego sellándolas con Parafilm antes de refrigerarlas a 4 °C hasta su uso.

Después, procedimos a la inoculación de las bacterias, incubándolas durante 24 h a 37 °C. Tras este período, estandarizamos la bacteria tomando colonias de las cepas y colocándolas en un tubo densitómetro con 10 mL de cloruro de sodio al 5.25%, midiendo la concentración hasta alcanzar una solución al 0.5 en la escala de McFarland. Luego, se preparó la solución de trabajo en un tubo Falcon, combinando 6 mL de cloruro de sodio con 1 mL de concentrado de bacteria, y se repitió este proceso para cada una de las 3 bacterias utilizadas.

A continuación, se llenaron 6 cajas Petri con agar Mueller Hinton y se agregaron 60 μL de la solución de trabajo, extendiéndose uniformemente sobre el agar con un hisopo estéril. Paralelamente, en 3 portaobjetos estériles, se dispusieron 6 discos de papel estériles, añadiendo 5 μL de clorhexidina a cada uno, 5 μL de cloruro de sodio a otros y dejando un tercer grupo sin adición alguna. Utilizando un sacabocados punch de 6 mm, se realizaron 2 perforaciones en cada caja Petri para insertar los grupos experimentales de GtA/PVA/Q y GtA/Q.

Finalmente, los 5 grupos se distribuyeron de manera equidistante en los medios de cultivo, sellando las cajas Petri con Parafilm antes de incubarlas durante 24 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Al finalizar este tiempo, se midieron los halos de inhibición de cada grupo utilizando un vernier.

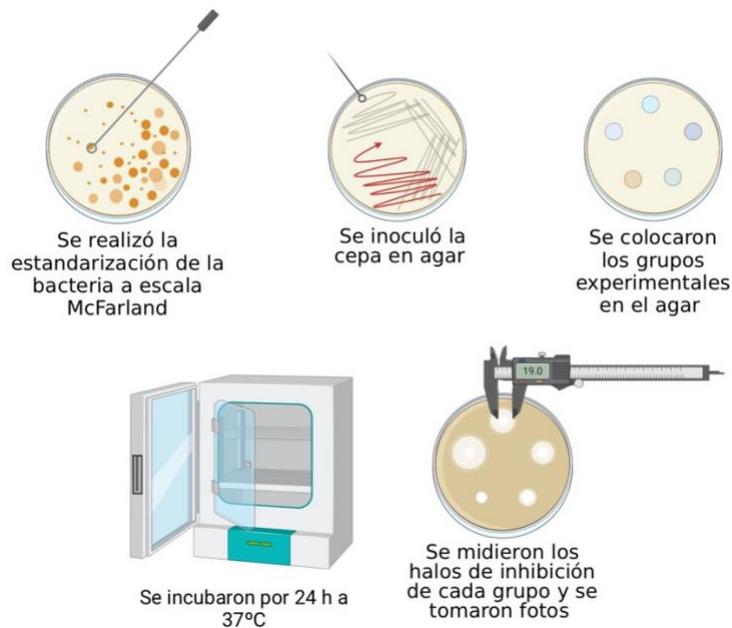


Figura 7. Ensayo de difusión.

13.8. Ensayo de microdilución en caldo

Se procedió a la inoculación de las tres cepas individualmente en cajas Petri con agar Mueller Hinton, las cuales fueron incubadas durante 24 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ para obtener un cultivo joven.

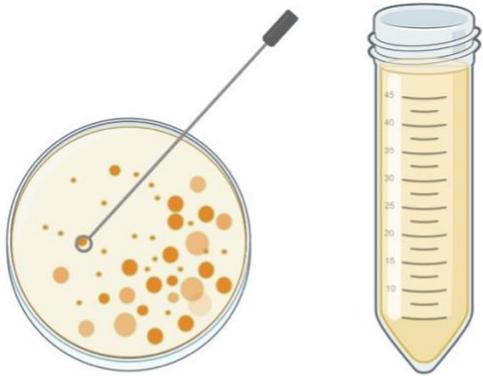
Luego, se prepararon 200 mL de caldo Mueller Hinton, pesando 4.2 gr de caldo y añadiendo 200 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer con agitación constante hasta obtener una solución homogénea. Esta solución se esterilizó a 121 °C durante 20 min y se transfirió a un recipiente con tapa estéril.

Posteriormente, se tomaron colonias del cultivo joven utilizando un asa estéril y se colocaron en un tubo Falcon junto con 10 mL de caldo Mueller Hinton, repitiendo este procedimiento para cada bacteria. Los tubos se incubaron a 37 °C con agitación constante a 60 rpm durante 20 h.

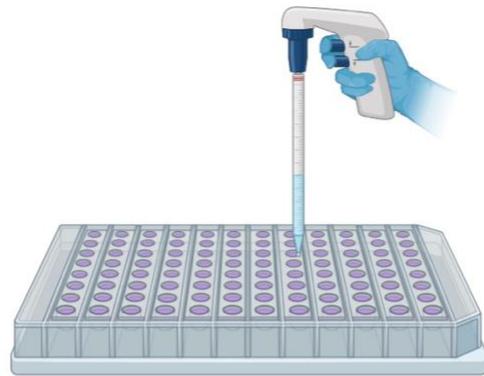
Después de las 20 h, se prepararon las diferentes soluciones de trabajo. Se comenzó con la estandarización de las bacterias, colocando 7 mL de caldo Mueller Hinton en un tubo densitómetro estéril y añadiendo 700 µL de nuestro cultivo. Tras agitar en el Vortex, se llevó al densitómetro para obtener una escala 0.5 McFarland. Una vez estandarizadas las bacterias, se colocaron 10 mL de caldo Mueller Hinton y 100 µL de nuestra bacteria estandarizada en un tubo Falcon para obtener la solución de trabajo.

Con la solución de trabajo lista, se procedió al ensayo cortando muestras del grupo experimental GtA/PVA/Q y del grupo control GtA/Q con un sacabocados punch de 6 mm. Luego, se cortaron las muestras a la mitad y se llevaron a una placa de 96 pocillos de forma seriada. Se colocaron 100 µL de solución de trabajo y 100 µL de caldo Mueller Hinton en cada pocillo, incubándolos durante 24 h a 37 °C. Este proceso se repitió individualmente para cada bacteria.

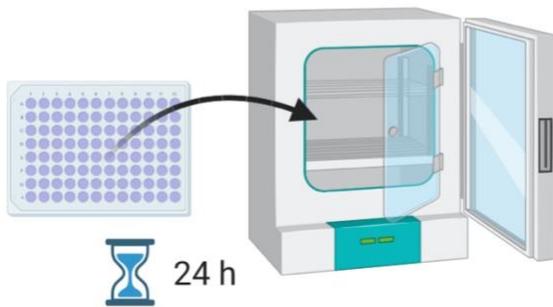
Pasadas las 24 h, se aspiraron todos los grupos colocados y se agregaron 100 µL de MTT, llevándolos nuevamente a la incubadora durante 3 h a 37 °C. Después de las 3 h, se aspiraron nuevamente los grupos y se agregaron 100 µL de DMSO, incubándolos durante 1 h. Una vez transcurrido el tiempo, se llevaron las cajas al espectrofotómetro de luz UV-Vis para medir la absorbancia a 595 nm.



Se estandarizó la cepa a escala Mcfarland



Se colocó caldo agar en la placa de forma seriada y posteriormente los grupos control y experimental



Se incubó por 24 h a 37° C

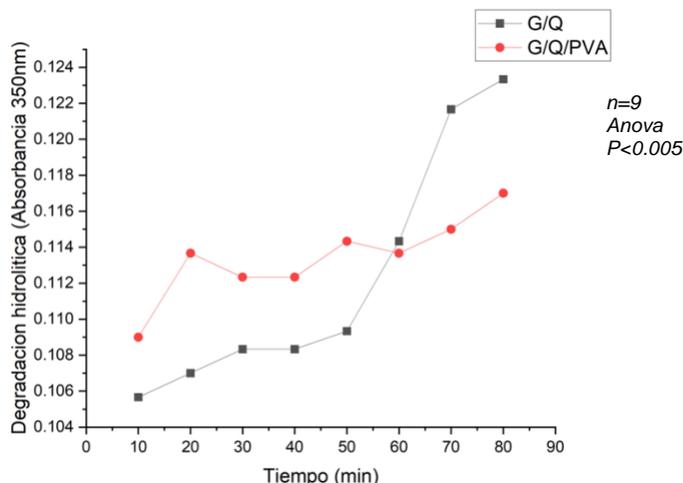


Se analizaron los resultados en espectrofotómetro

Figura 8. Ensayo de microdilución.

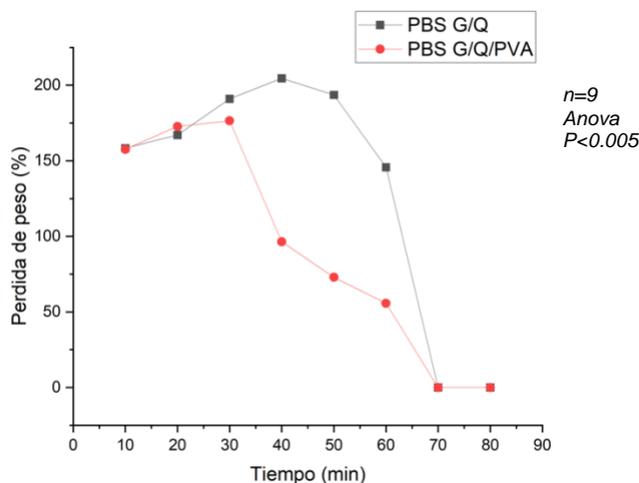
14. Resultados

14.1. Ensayo de Degradación Hidrolítica (absorbancia 350 nm)



Gráfica 1. La gráfica muestra los resultados de la degradación hidrolítica en solución PBS sobre su tiempo. El eje X representa el tiempo en min y el eje Y representa la absorbancia de la degradación hidrolítica a 350 nm. Se observa la comparación de los grupos GtA/PVA/Q y GtA/Q el cual muestra que el grupo de GtA/PVA/Q tuvo una absorbancia más uniforme durante el tiempo evaluado (0.11 ± 0.002 nm) y el grupo de GtA/Q una mayor absorbancia a los 80 min (0.11 ± 0.003 nm).

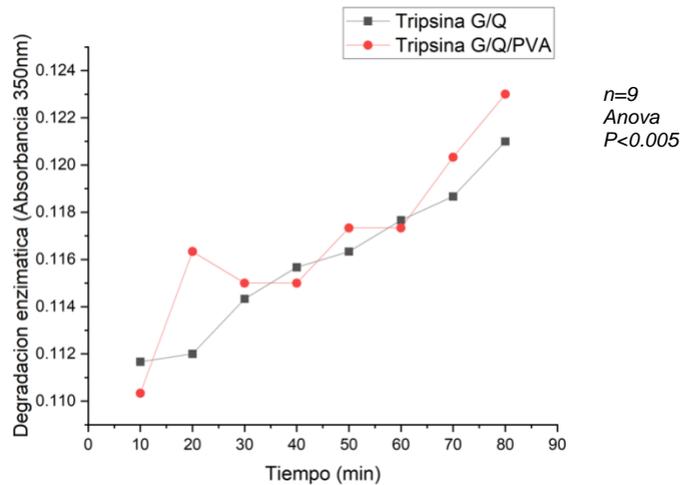
14.2. Ensayo de Degradación Hidrolítica (pérdida de peso %)



Gráfica 2. La gráfica muestra los resultados de la degradación hidrolítica en solución PBS por pérdida de peso. El eje X representa el tiempo en min y el eje Y representa la pérdida de peso en porcentaje de la degradación hidrolítica. Se observa la comparación de los grupos GtA/PVA/Q y GtA/Q, el cual muestra que el grupo de GtA/Q tuvo una absorción de

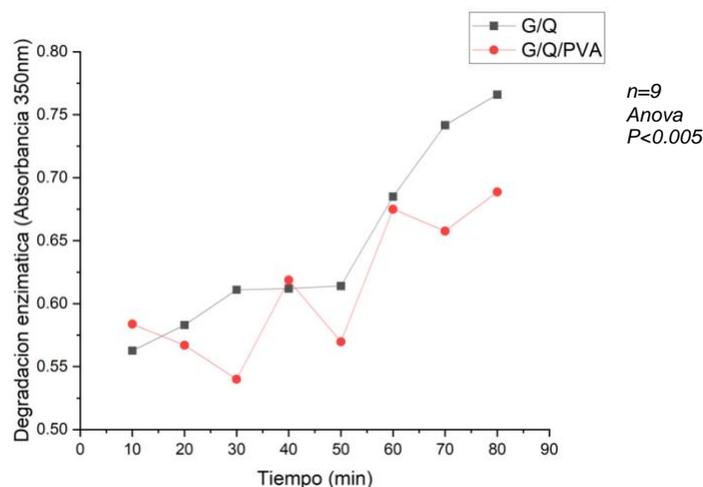
hasta los 40 min y decreció de forma más abrupta ($176.71 \pm 3.31\%$) y el grupo de GtA/PVA/Q tuvo una pérdida de peso más uniforme ($121.98 \pm 2.45\%$).

14.3. Ensayo de degradación enzimática (Tripsina absorbancia 350 nm)



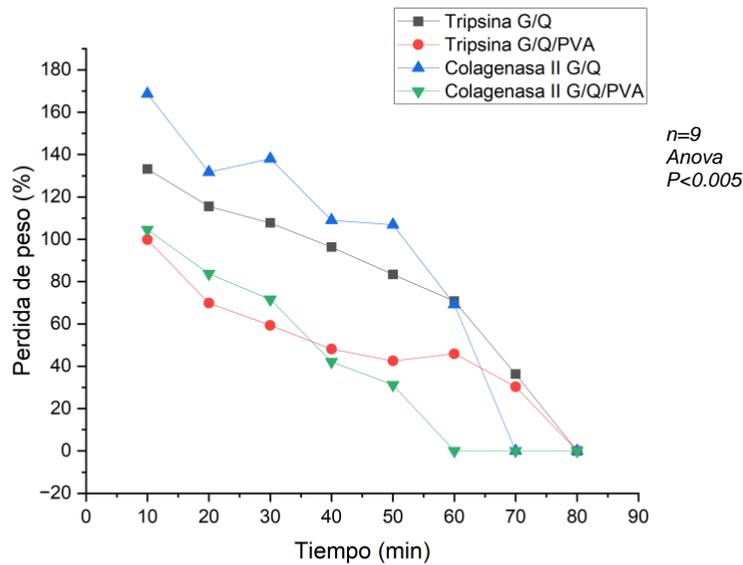
Gráfica 3. La gráfica muestra los resultados de la degradación enzimática en solución Tripsina sobre su tiempo. El eje X representa el tiempo en min y el eje Y representa la absorbancia de la degradación hidrolítica a 350 nm. Se observa la comparación de los grupos GtA/PVA/Q y GtA/Q el cual muestra que el grupo de GtA/PVA/Q (0.11 ± 0.004 nm) tuvo una absorbancia mayor a los 80 min en comparación a diferencia del grupo GtA/Q (0.11 ± 0.002 nm).

14.4. Ensayo de degradación enzimática (Colagenasa tipo II absorbancia 350 nm)



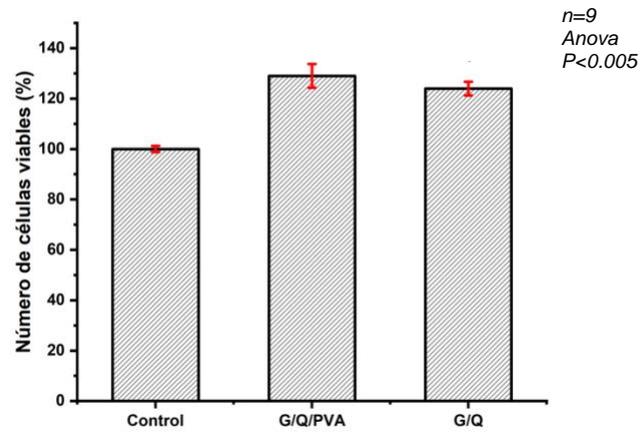
Gráfica 4. La gráfica muestra los resultados de la degradación hidrolítica en solución colagenasa tipo II sobre su tiempo. El eje X representa el tiempo en min y el eje Y representa la absorbancia de la degradación enzimática a 350 nm. Se observa la comparación de los grupos GtA/PVA/Q y GtA/Q el cual muestra que el grupo de GtA/PVA/Q tuvo una absorbancia más irregular durante el tiempo evaluado (0.61 ± 0.08 nm) y el grupo de GtA/Q una mayor absorbancia a los 80 min y más uniforme (0.64 ± 0.05 nm).

14.5. ensayo de degradación enzimática (Colagenasa tipo II y Tripsina pérdida de peso %)



Gráfica 5. La gráfica muestra los resultados de la degradación enzimática en solución Tripsina y colagenasa tipo II. El eje X representa el tiempo en min y el eje Y representa la pérdida de peso en porcentaje de la degradación enzimática. se puede observar que los grupo control y experimental expuestos a la colagenasa tipo II tuvieron más variación siendo el grupo experimental el que sufrió más degradándose por completo a los 60 min ($66.64 \pm 3.46\%$) y el grupo control a los 70 min ($120.58 \pm 4.55\%$) y en comparación a los grupos cuando estuvieron en contacto con la Tripsina tuvieron una degradación más uniforme y por más tiempo por su parte el grupo control ($91.91 \pm 3.72\%$) tuvo un mayor hinchamiento que el grupo experimental ($56.55 \pm 4.58\%$).

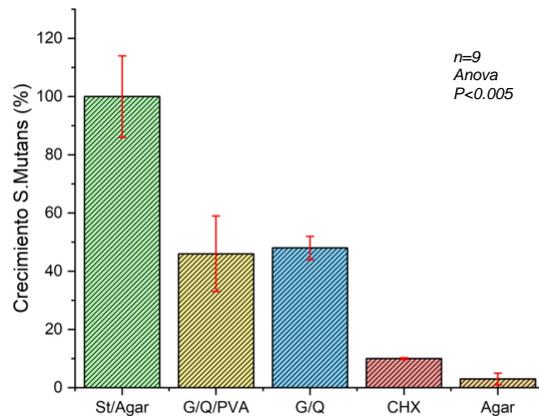
14.6. Ensayo de citotoxicidad con células SCAPs



Gráfica 6. La gráfica muestra los resultados de la viabilidad de las células SCAPs. El eje Y representa el porcentaje de viabilidad de las células SCAPs en comparación con el grupo experimental GtA/PVA/Q (128.77±4.71%) el cual mostró una mayor proliferación celular en comparación con el grupo control negativo de GtA/Q (123.81±2.7%).

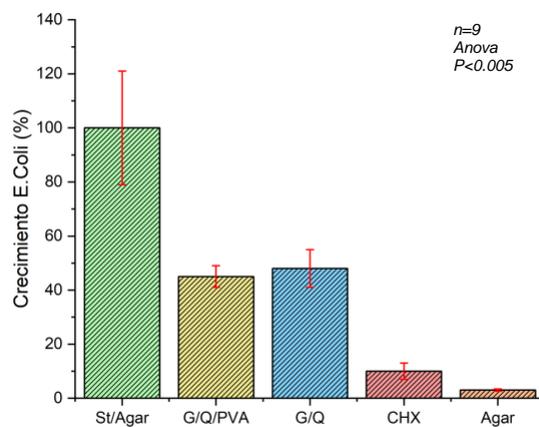
14.7. Resultados de microdilución bacteriana

14.7.1. Ensayo de microdilución con *Streptococcus mutans*



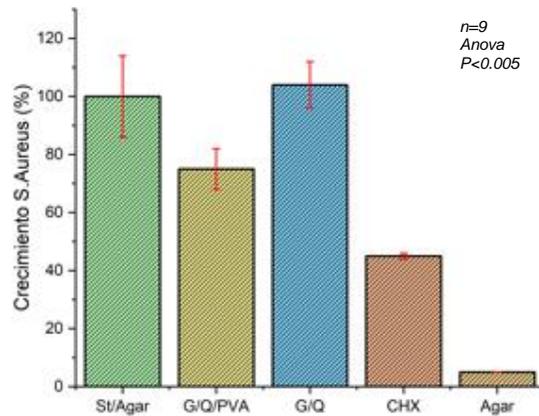
Gráfica 7. La gráfica muestra los resultados del ensayo de microdilución con *Streptococcus mutans*. El eje Y muestra el porcentaje de inhibición de los diferentes grupos usados GtA/PVA/Q (43.57±12.11%), GtA/Q (46.14±3.79%), CHX 0.2% (21.69±0.34%) en comparación con el grupo control *S. mutans* (100%).

14.7.2. Ensayo de microdilución con *Escherichia coli*



Gráfica 8. La gráfica muestra los resultados del ensayo de microdilución con *Escherichia coli*. El eje Y muestra el porcentaje de inhibición de los diferentes grupos usados GtA/PVA/Q (45.57±4.18%), GtA/Q (48.51±7.16%), CHX 0.2% (9.70±2.47%) en comparación con el grupo control *E. coli* (100%).

14.7.3. Ensayo de microdilución con *Staphylococcus aureus*



Gráfica 9. La gráfica muestra los resultados del ensayo de microdilución con *Staphylococcus aureus*. El eje Y muestra el porcentaje de inhibición de los diferentes grupos usados GtA/PVA/Q (75.49±16.25%), GtA/Q (104.20±8.86%), CHX 0.2% (45.41±0.66%) en comparación con el grupo control *S. aureus* (100%).

14.8. Ensayo de difusión en agar

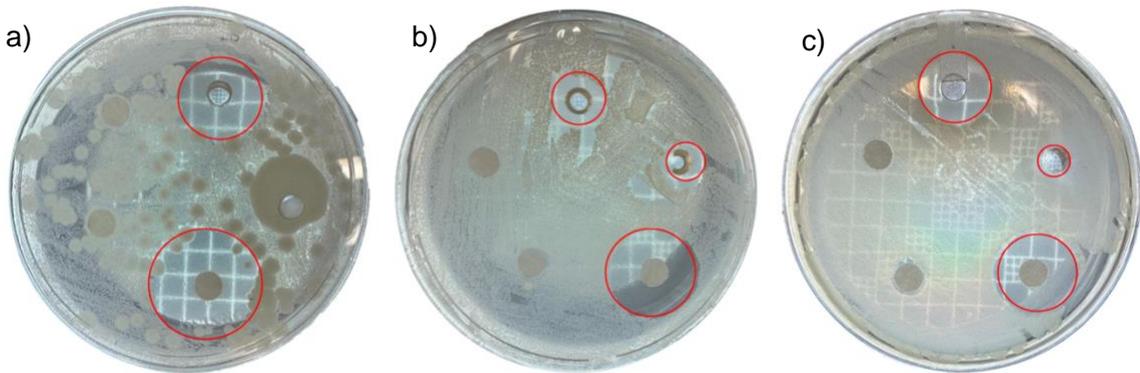


Figura 9. Resultados del ensayo de difusión bacteriana. Se muestran los resultados del ensayo de difusión en agar Mueller Hinton sobre las bacterias a) *S. aureus*, b) *E. coli* y c) *S. mutans*. Se observan los diferentes halos de inhibición antimicrobiana de los hidrogeles GtA/PVA/Q y GtA/Q en comparación con la solución de CHX al 0.2% en donde hubo una mayor inhibición por parte del grupo experimental sobre *S. aureus*, *S. mutans* y por último sobre *E. coli* y por su parte la CHX 0.2% fue el grupo que tuvo mayor inhibición sobre las 3 bacterias y por último el grupo GtA/Q tuvo el menor efecto de inhibición.

Tabla 2. Resultados del ensayo de difusión bacteriana. Se muestran los resultados de los ensayos realizados para cada bacteria con las medidas de los halos de inhibición en mm.

		Halo de inhibición (mm)				
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desviación estándar
Ensayo <i>S. mutans</i>	Grupo experimental	7.25	7.5	7.75	7.25	0.6614378
	Control positivo	9.5	9	9.25	9.25	0.25
	Control negativo	4	4	5	4.333	0.5773503
Ensayo <i>E. coli</i>	Grupo experimental	6.5	5	6.75	6.083333	0.9464847
	Control positivo	8.5	7.5	7.5	7.833333	0.5773503
	Control negativo	3	3.5	3	3.1666667	0.2886751
Ensayo <i>S. aureus</i>	Grupo experimental	8	9.5	9.25	8.9166667	0.836375
	Control positivo	10.75	10	9.75	10.166667	0.5204165
	Control negativo	2	3	2	2.33333333	0.57735027

mm=milímetros, diámetro del halo de inhibición.

En la tabla 2 podemos ver que el grupo GtA/PVA/Q mostró menor sensibilidad a *S. aureus* 8.9 ± 0.83 mm en comparación con *S. mutans* 7.25 ± 0.66 mm y por último *E. coli* 6.08 ± 0.94 mm.

15. Discusión

Este estudio evaluó las características del hidrogel sintetizado de GtA/PVA/Q, el cual demostró ser un biomaterial biocompatible, con viabilidad celular y efecto antimicrobiano.

Bhattarai et al. (2010) realizaron una revisión de la literatura sobre hidrogeles adicionados con quitosano evaluando sus potenciales biomédicos, así como sus avances en la síntesis de estos, reportaron el uso de estos para tratamiento de tumores, así como el uso oftálmico y oral por tener la capacidad de no requerir una reintervención para retirar el material, por su parte se comprobó en este estudio que no es necesario retirar el material por tener la característica de degradación térmica del hidrogel y no causar citotoxicidad.

Narváez-Flores et al. (2021) concluyeron que el uso de quitosano a una concentración mayor a 0.19% tiene efectos citotóxicos sobre células pulpares humanas y fibroblastos gingivales humanos, además reportaron tener propiedades antiinflamatorias de cicatrización, dentro de este estudio se utilizó la misma concentración y tampoco se reportó citotoxicidad sobre células troncales de la papila apical dental.

Gorgieva y Kokol (2012) realizaron pruebas de degradación enzimática con colagenasa tipo II y lisozima sobre un hidrogel sintetizado a partir de gelatina y quitosano, durante 24 h a 37 °C y obteniendo una buena estabilidad del hidrogel frente a estas enzimas, por lo que el hidrogel evaluado en este estudio también tuvo una estabilidad adecuada de 80 min bajo degradación enzimática e hidrolítica.

Bhattarai et al. (2010) reportaron que el uso de hidrogeles a base de quitosano tiene una buena penetración por sus propiedades mucoadhesiva teniendo mejor eficacia terapéutica por mantener niveles estables de agentes antimicrobianos en el fluido crevicular y reportando una absorción sistémica mínima.

Flores Espinoza (2023) realizó un estudio evaluando las características de un hidrogel de gelatina tipo A y quitosano, evaluando las concentraciones de quitosano al 0.2% y 0.5% en un hidrogel, y reportó una degradación más acelerada por parte del grupo con concentración de 0.2% que el de 0.5%, la degradación del hidrogel de este estudio no demostró una diferencia significativa a la degradación en comparación con el hidrogel evaluado de ese estudio con su concentración máxima.

Chung et al. (2004) Evaluaron las propiedades antimicrobianas de coloides de quitosano con un grado de desasetilación del 75-95% reportaron que las bacterias Gramnegativas fueron más sensibles que las bacterias Grampositivas, en comparación con este estudio se confirmó que las bacterias Grampositivas fueron más resistentes por parte del grupo de *S. aureus* teniendo menor inhibición que el resto de grupo de bacterias evaluadas.

16. Conclusión

Los resultados presentados de este proyecto de investigación nos indican que el hidrogel de GtA/PVA/Q podría ser apto para el uso dentro del área clínica odontológica si se sigue desarrollando para el uso como terapia antimicrobiana post quirúrgica.

El ensayo de degradación enzimática con tripsina y colagenasa tipo II mostró que no hay diferencia significativa entre el grupo control experimental y el grupo control sin embargo el grupo experimental mostró ligeramente más estabilidad y mayor absorbancia.

En el ensayo de citotoxicidad se reportó una citotoxicidad nula en comparación de nuestro control ya que en ambos grupos tanto en el grupo experimental como en el grupo control mostraron una proliferación celular, siendo mayor proliferación en el grupo experimental.

En los ensayos antimicrobianos de microdilución podemos concluir que el efecto inhibitorio del grupo experimental es similar en comparación del grupo control para los microorganismos *S. mutans* y *E. coli* con un buen porcentaje de inhibición, siendo mayor para el grupo experimental, sin embargo, no pudieron igualar al grupo control positivo CHX 0.2% que fue el que tuvo mayor inhibición. Para *S. aureus* el grupo experimental tuvo una inhibición mayor en comparación del grupo control, aunque no fue mayor que con los otros microorganismos siendo este menos sensible a ambos grupos.

Para el ensayo de difusión se puede observar que el grupo de control positivo tuvo una inhibición mayor frente a los 3 macroorganismos y el grupo experimental tuvo una mayor inhibición en comparación del grupo control que frente a *S. aureus* mostró efecto nulo de inhibición.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que el hidrogel de GtA/PVA/Q tiene buenas propiedades de degradación, biocompatibles y antimicrobianas siendo este un biomaterial que pudiera ser contemplado como alternativa a futuro para su uso.

17. Bibliografía

1. Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal Of Infection and Public Health*, 10(4), 369-378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
2. Peñaranda, A. A., & López, M. E. L. (2009). Hidrogeles. potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Revista Ingeniería Biomédica*, 3(5), 83-94. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5781205.pdf>
3. Etxabide, A., Uranga, J., & De La Caba, K. (2017). Development of active gelatin films by means of valorisation of food processing waste: a review. *Food Hydrocolloids*, 68, 192-198. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.021>
4. Nhari, R. M. H. R., Man, Y. C., Ismail, A., & Anuar, N. (2011). Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin. *International Food Research Journal*, 18, 813-817. <http://psasir.upm.edu.my/24457/>
5. DeMerlis, C., & Schoneker. (2003). Review of the oral toxicity of Polyvinyl Alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology*, 41(3), 319-326. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(02\)00258-2](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(02)00258-2)
6. Valencia, G. A. (2015). EFECTO ANTIMICROBIANO DEL QUITOSANO: UNA REVISIÓN DE LA LITERATURA. *Scientia Agroalimentaria*, 2, 32-38. <https://revistas.ut.edu.co/index.php/scientiaagro/article/view/743/579>
7. Cocolletzi, H. H., Almanza, E. Á., Agustín, O., Nava, E. V., & Cassellis, E. R. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío*, 22(3), 57-60. <https://www.redalyc.org/pdf/942/94216153012.pdf>
8. Van Houte, J. (1994). Role of micro-organisms in Caries Etiology. *Journal of Dental Research*, 73(3), 672-681. <https://doi.org/10.1177/00220345940730031301>
9. Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Salud Publica De México*, 44(5). <https://doi.org/10.1590/s0036-36342002000500011>
10. Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del Staphylococcus aureus. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40. <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
11. Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., & Fiñana, I. T. (2010). Espectrometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Universidad de Córdoba, 1-8. https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf
12. Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34, 33-41. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010
13. Cavalieri, S. J. (2009). *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. ASM Press. https://www3.paho.org/spanish/ad/ths/ev/labs_sucep_antimicro.pdf

14. Arrebola, D. F. A., Fernández, L. A. R., & Sánchez, D. L. C. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista toxicológica en línea*, 40-53.
15. Zhang, Y. S., & Khademhosseini, A. (2017). Advances in engineering hydrogels. *Science*, 356(6337). <https://doi.org/10.1126/science.aaf3627>
16. Amashta, I. A. K., Trabanca, O. K., & Trabanca, D. K. (2005). Materiales inteligentes: hidrogeles macromoleculares. algunas aplicaciones biomédicas. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 4, 35-50. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/1354681.pdf>
17. González, K., De Gáscue, B. R., & Guaimacuto, P. L. (2020). Evaluación de la capacidad de absorción de polímeros hidrogeles sintetizados desde biopoliésteres. Identificación de bacterias con potencial para su degradación. En *Fondo Editorial Universitario Servando Garcés de la Universidad Politécnica Territorial de Falcón Alonso Gamero / Alianza de Investigadores Internacionales S.A.S. eBooks* (pp. 464-479). <https://doi.org/10.47212/tendencias2020vol.xii.27>
18. 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>
19. Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
20. Ahmadi, F., Oveisi, Z., Samani, S. M., & Amoozgar, Z. (2015). Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Research in pharmaceutical sciences*, 10(1), 1-16. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26430453/>
21. González, K., De Gáscue, B. R., & Guaimacuto, P. L. (2020b). Evaluación de la capacidad de absorción de polímeros hidrogeles sintetizados desde biopoliésteres. Identificación de bacterias con potencial para su degradación. En *Fondo Editorial Universitario Servando Garcés de la Universidad Politécnica Territorial de Falcón Alonso Gamero / Alianza de Investigadores Internacionales S.A.S. eBooks* (pp. 464-479). <https://doi.org/10.47212/tendencias2020vol.xii.27>
22. Giraldo Pedraza, Juan. (2015). PROPIEDADES, OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES DEL QUITOSANO.1-22. [10.13140/RG.2.1.3350.9287](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3350.9287)
23. Bhattarai, N., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 83-99. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019>
24. Castillo, H. E., Carballo, S. M., Alfaro, M. E., Lopretti, M., & Baudrit, J. V. (2021). HIDROGELES HÍBRIDOS DE QUITOSANO Y POLIETILENGLICOL (QUIT: PEG) PARA POTENCIALES APLICACIONES BIOMÉDICAS. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 22, 2.
25. Agüero Luztonó, Lisette. (2016). Hidrogeles sensibles al pH como alternativa al mejoramiento del tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(3), 284-293.

Recuperado en 20 de febrero de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002016000300007&lng=es&tng=es.

26. Velásquez, C. L. (2019). Sobre la confusión actual acerca del origen del término hidrogel. *Avances En Química*, 14(2), 79-81. <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/avancesenquimica/article/download/15589/21921926687>
27. Villagrana, A., & Clavel, J. F. G. (2012). Terapia antibiótica en odontología de práctica general. *Revista de la Asociación Dental Mexicana*, 69(4), 168-175. <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDARTICULO=37624>
28. Ishihara, M., Obara, K., Nakamura, S., Fujita, M., Masuoka, K., Kanatani, Y., Takase, B., Hattori, H., Morimoto, Y., Ishihara, M., Maehara, T., & Kikuchi, M. (2006). Chitosan hydrogel as a drug delivery carrier to control angiogenesis. *Journal Of Artificial Organs*, 9(1), 8-16. <https://doi.org/10.1007/s10047-005-0313-0>
29. Mukhopadhyay, P., Sarkar, K., Bhattacharya, S., Bhattacharyya, A., Mishra, R., & Kundu, P. P. (2014). pH sensitive N-succinyl chitosan grafted polyacrylamide hydrogel for oral insulin delivery. *Carbohydrate Polymers*, 112, 627-637. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.045>
30. 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://www.revistacirurgiabmf.com/2021/03/Artigos/09ArtClinicoHidrogelsobrematerial.pdf>
31. Trejo, C. S. F., Cortés, E. M., Reyes, L. P. F., Rodríguez, J. C. M., & Cisneros, V. O. (2017). Nivel de autocuidado y enfermedades bucales más frecuentes en pacientes de una clínica universitaria / Level of Self-care and Most Frequent Juice Diseases in Patients of a University Clinic. *RICS*, 6(12), 1-18. <https://doi.org/10.23913/rics.v6i12.52>
32. Narvaez-Flores, J. J., Vilar-Pineda, G., Acosta-Torres, L. S., & García-Contreras, R. (2021). Cytotoxic and anti-inflammatory effects of chitosan and hemostatic gelatin in oral cell culture. *Acta Odontológica Latinoamericana*, 34(2), 98-103. <https://doi.org/10.54589/aol.34/2/098>
33. Chung, Y. C., Su, Y. P., Chen, C. C., Jia, G., Wang, H. L., Wu, J. C., & Lin, J. G. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta pharmacologica Sinica*, 25(7), 932-936. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15210068/>

18. Anexo 1

Constancia de participación en el Segundo Congreso Internacional de BioNano Materiales.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

La Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León
a través de la División de Educación Continua e Innovación

Otorga la presente

CONSTANCIA

a

José Leonardo Medrano Alvarez, Benjamin Aranda Herrera, Patricia Alejandra Chávez Granados, René Garcia Contreras

Por su participación en el
Concurso de Presentación de Poster
con el trabajo

Síntesis de un hidrogel de gelatina tipo A/PVA/Quitosano y su evaluación químico-biológica para su uso en odontología

llevado a cabo el
23 de octubre de 2023

en el marco del
**2º Congreso Internacional de
BioNano Materiales**

“Por mi Raza Hablará el Espíritu”
León, Guanajuato, a 27 de octubre de 2023


Dra. Laura Susana Acosta Torres
Directora
ENES Unidad León, UNAM




Esp. Roberto Ruiz Díaz
Jefe de División
Educación Continua e Innovación