



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN

TÍTULO:

“Comparación del efecto antimicrobiano y citotóxico de las nanopartículas de TiO₂ con ácido hipocloroso frente a patógenos dentales”

FORMA DE TITULACIÓN:

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN ODONTOLOGÍA

P R E S E N T A:

MORALES NORIEGA JUAN RAFAEL

TUTOR: Dr. Ravichandran Manisekaran

ASESORES: Dr. René García Contreras

M.C: Christian Andrea López Ayuso

LEÓN, GUANAJUATO. 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.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	4
MARCO TEÓRICO	5
Nanotecnología	5
Nanotecnología en Odontología	7
Nanosolución/ Nanodispersión	8
Nanopartículas de óxido metálicos	9
Síntesis de las Nanopartículas por el método Sol- Gel	9
Nanopartículas de dióxido de titanio (TiO ₂)	11
Método Sol- Gel de las nanopartículas de TiO ₂	11
Aplicaciones de las nanopartículas de dióxido de titanio TiO ₂	13
Aplicaciones de las nanopartículas de dióxido de titanio TiO ₂ en odontología	14
Aplicación y efecto antimicrobiano de las nanopartículas de TiO ₂ en odontología	16
Ácido Hipocloroso	18
Aplicaciones del Ácido Hipocloroso en odontología	20
Células madre de la papila apical (SCAPs)	22
Ensayo de MTT	23
Ensayo de XTT	24
CAPÍTULO 2	26
Antecedentes	27
CAPÍTULO 3	29
Planteamiento del problema	30
Pregunta de investigación	30
Justificación	30
Objetivos	31
General	31
Específicos	31

Hipótesis	31
Hipótesis del estudio	31
Hipótesis alternativa	31
CAPÍTULO 4	32
Marco metodológico	33
Universo o Población del estudio/muestra	33
Criterio de selección del estudio	33
Criterios de inclusión	33
Criterios de exclusión	34
Criterios de eliminación	34
Variables del estudio	34
Variables dependientes	34
Variables independientes	35
Diseño metodológico experimental	36
Materiales para los ensayos	36
Equipos	36
Muestras	37
Instrumental	37
Insumos	38
Desarrollo de la metodología	39
Síntesis de las nanopartículas de TiO ₂	39
Dispersión de las nanopartículas dióxido de titanio (TiO ₂) en el Ácido Hipocloroso (HOCl)	39
Susceptibilidad antimicrobiana y antifúngica	40
Ensayo en agar por el método de difusión.	41
Ensayo en agar por el método en pozo	43
Ensayo de microdilución	43
Ensayo de MTT bacteriano	45
Microdilución fúngica	46
Ensayo de XTT antifúngico	47
Subcultivo de SCAPs	47
Inoculación NPs de TiO ₂ en SCAPs	49
Ensayo de citotoxicidad con MTT	49

Implicaciones éticas	50
Análisis estadístico y representación de datos	50
CAPÍTULO 5	51
Resultados	52
Espectrofotometría de UV-Vis	52
Caracterización estructural	53
Susceptibilidad antibacteriana y antifúngica	53
Resultado antimicrobiano de las pruebas de difusión en agar	53
Resultados antimicrobianos del método de difusión en pozo	55
Resultado antimicrobiano por la cuantificación de la viabilidad bacteriana por medio del ensayo MTT	57
Resultado antifúngico por la cuantificación de la viabilidad fúngica por medio del ensayo XTT	59
Ensayo de citotoxicidad	61
Discusión	62
Conclusiones	64
Referencias	65
Anexos	74

DEDICATORIA

Al concluir una etapa maravillosa de mi vida, quiero ofrecer un agradecimiento a Dios quien me ha dado fortaleza y sabiduría para seguir adelante, poder hacer de mí una mejor persona, y darme la virtud de seguir mejorando como profesionista.

A mis padres Juan Rafael Morales Manzano y Blanca Estela Noriega Serrato por su apoyo incondicional a lo largo de mis estudios, aquellos que junto a mi caminaron en todo momento y siempre fueron mi inspiración.

A mis hermanos por brindarme el apoyo a lo largo de este proceso.

A mi abuelita Eloísa Álvarez Serrato y a mi tía Marcela Noriega que, aunque ahora no esté aquí presente siempre fueron mi guía y un motivo para no detenerme, dándome fuerzas para no rendirme creyendo en mí y en mi potencial para conseguir mis metas.

A mi tía Rosa Morales Manzano, Armanda Morales Manzano y Margarita Escamilla por su cariño, comprensión y apoyo a lo largo de mi vida.

A mis tíos Matilde Morales , Ramon Hernández , José Luis Morales, Olga, Norma, José Luis por confiar en mis habilidades a la hora de brindarles mi atención odontológica como estudiante.

A mi novia Daniela Asunción Gutiérrez López, por su cariño, amor, comprensión, apoyo y acompañamiento durante este proceso, por alentarme para no rendirme y continuar logrando mis metas.

A mis compañeros Abisay Trujillo, Jorge López, Osvaldo Nila, Mario García Valdez y Rubén Torres por su apoyo y por haberme acompañado durante esta etapa de formación académica.

A mis profesores y doctores por haberme brindado sus conocimientos, para llevarlos a la práctica y así irme formando como profesional.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ravichandran Manisekaran Shanthi por su paciencia, por su apoyo, comprensión y por guiarme en este proceso de titulación ya que puso mucho de su parte para enseñarme cada uno de los pasos del experimento y estar en todo momento, por el gran interés que mostró para la realización del proyecto.

A la Dra. Christian Andrea López Ayuso por su asesoramiento y apoyo incondicional, paciencia, por enseñarme con una buena actitud en el paso para la evaluación antimicrobiana y antifúngica.

A la Dra. Patricia Alejandra Chávez por su ayuda en la orientación de la etapa metodológica y de redacción de la tesis, que siempre resolvía mis dudas.

A la Dra. Paloma por enseñarme hacer el RPMI.

Al Dr. Rene García por todo su apoyo, asesoramiento y darme la oportunidad de tomar el proyecto de investigación.

A mis asesores el doctor Rene García Contreras y la doctora Christian Andrea López Ayuso les quiero dar las gracias por haberme encaminado al término de mi tesis como también a mi tutor el doctor Ravichandran Manisekaran Shanthi.

A todos los pacientes que dejaron su salud dental en mis manos y me brindaron su Confianza, su apoyo para que yo pudiera practicar, y de esta manera crecer tanto profesional como académicamente, ya que sin ellos no se hubiera logrado llegar a mi titulación.

Al apoyo financiero de la DGAPA-UNAM-PAPIME (N° PE201622).

A la ayuda técnica de Lourdes Palma (INB-UNAM) para TEM, Hugo Alvarado Garnica (LII, ENES-UNAM) para estudios de células, y Marina Vega González (Centro de Geociencias, Universidad Autónoma de México).

Gracias.

RESUMEN

Introducción:

El uso continuo e inadecuado de los antibióticos como el uso incorrecto de agentes antimicrobianos usados tradicionalmente han provocado la aparición de cepas bacterianas multirresistentes (MDR) y la mutación de los microorganismos en el campo de la odontología.

Por lo tanto las investigaciones proponen el empleo de diversas nanopartículas contra varias cepas resistentes. Uno de los materiales más interesantes son las nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂) que se ha considerado un agente antimicrobiano atractivo debido a su naturaleza fotocatalítica, estabilidad química, no toxicidad y precursores económicos. Además, varios estudios han revelado excelentes propiedades antifúngicas y antibacterianas. Por lo tanto, se exploran varios nanocompuestos o nanodispersiones basados en TiO₂ preparándose con agentes antimicrobianos bien conocidos en el mercado, como el ácido hipocloroso (HOCl) para potenciar el efecto antimicrobiano.

Objetivo General: Comparar el efecto antimicrobiano, antifúngico y citotóxico de la nanodispersión del HOCl con las NPs de TiO₂ tanto experimental y comercial.

Metodología experimental:

Se sintetizó las NPs experimentales de TiO₂ por medio del método de síntesis sol-gel y se utilizó las NPs de TiO₂ de la marca Sigma Aldrich.

Se caracterizó el nanocompuesto sintetizado y posteriormente se estudió el efecto antimicrobiano y la citotoxicidad. La susceptibilidad bacteriana se evaluó mediante los métodos de difusión en agar y difusión en pozo para las cepas de *S. mutans*, *S. aureus* y *C. albicans*. Se realizó el ensayo de microdilución, MTT bacteriano y XTT fúngico, analizando diferentes concentraciones de la nanodispersión para determinar el porcentaje de inhibición con las cepas de *S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *C. albicans*. Para evaluar el efecto citotóxico, se inocularon células madre de la papila apical (SCAPs) en una placa de 96 pocillos donde se evaluó su efecto mediante un bioensayo MTT a 24 horas.

Resultados:

Las NPs de TiO₂ experimentales en concentraciones altas presentaron un efecto antimicrobiano mejorado en comparación con las comerciales, casi sin efectos citotóxicos en altas concentraciones, a bajas concentraciones se encontró una proliferación de las células SCAPs.

Conclusión: La nanodispersión del HOCl con la NPs de TiO₂ experimentales tienen un mayor efecto bacteriano con una alta estabilidad. Además, al ser mucho menos tóxico podría ser utilizado como un prometedor agente antimicrobiano en el campo del tratamiento de diversos patógenos dentales.

Palabras claves: Nanopartículas de TiO₂, HOCl, efecto antimicrobiano, efecto citotóxico, SCAPs.

ABSTRACT

Introduction:

The continuous and inappropriate use of antibiotics as well as the incorrect use of traditionally used antimicrobial agents have caused the appearance of multi-resistant bacterial strains (MDR) and the mutation of microorganisms in the field of dentistry. Therefore, research proposes the use of various nanoparticles against various resistant strains. One of the most interesting materials is titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles, which has been considered an attractive antimicrobial agent due to its photocatalytic nature, chemical stability, non-toxicity, and inexpensive precursors. Additionally, several studies have revealed excellent antifungal and antibacterial properties.

Therefore, various TiO₂-based nanocomposites or nanodispersions are explored by preparing them with well-known antimicrobial agents on the market, such as hypochlorous acid (HOCl), to enhance the antimicrobial effect.

General Objective: Compare the antimicrobial, antifungal and cytotoxic effect of the HOCl nanodispersion with both experimental and commercial TiO₂ NPs.

Experimental methodology:

The experimental TiO₂ NPs were synthesized by means of the sol-gel synthesis method and the TiO₂ NPs of the Sigma Aldrich brand were used.

The synthesized nanocomposite was characterized and the antimicrobial effect and cytotoxicity were subsequently studied. Bacterial susceptibility was assessed by agar diffusion and well diffusion methods for *S. mutans*, *S. aureus* and *C. albicans* strains. The microdilution assay, bacterial MTT and fungal XTT were performed, analyzing different concentrations of the nanodispersion to determine the percentage of inhibition with the strains of *S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis* and *C. albicans*. To evaluate the cytotoxic effect, stem cells from the apical papilla (SCAPs) were inoculated in a 96-well plate where their effect was evaluated by a 24-h MTT bioassay.

Results:

The experimental TiO₂ NPs at high concentrations presented an improved antimicrobial effect compared to the commercial ones, with almost no cytotoxic

effects at high concentrations, at low concentrations a proliferation of SCAPs cells was found.

Conclusion: The HOCl nanodispersion with the experimental TiO₂ NPs have a greater bacterial effect with high stability. Furthermore, being much less toxic, it could be used as a promising antimicrobial agent in the field of treatment of various dental pathogens.

Keywords: TiO₂ nanoparticles, HOCl, antimicrobial effect, cytotoxic effect, SCAPs.

INTRODUCCIÓN

El uso continuo e inadecuado de los antibióticos como el uso desmedido de agentes antimicrobianos, ha provocado la aparición de cepas bacterianas multirresistentes (MDR) y la mutación de los microorganismos en el campo de la odontología y con esto la aparición de la resistencia bacteriana a los antibióticos de los agentes antimicrobianos, lo que conlleva a que las infecciones tienden a agravarse o no se lleguen a tratar adecuadamente provocando así un daño a la salud de nuestros pacientes (1,2). No obstante, con la problemática existente en la actualidad hay una indiscriminada administración de agentes antimicrobianos químicamente sintetizados comerciales que se asocian a numerosos inconvenientes, uno de ellos es su efectividad por el continuo uso e insuficiencia de parte del agente antimicrobiano, que aunado a ello, puede ser citotóxico en los tejidos (3,4). Un claro ejemplo es la clorhexidina ya que es el estándar de oro en odontología como agente antimicrobiano debido a su propiedad de sustantividad, ya que se puede adsorber en las superficies dentales, desestabiliza las paredes celulares bacterianas e interfiere con la ósmosis celular, lo que lleva a la lisis de las células bacterianas y puesto que en concentraciones bajas es bacteriostática, mientras que en concentraciones altas es bactericida(5,6). El uso prolongado de clorhexidina puede provocar la decoloración de los dientes, de la mucosa bucal, del dorso de la lengua como de las restauraciones como deteriorar las propiedades mecánicas de las mismas y además del mal sabor que tiene, que puede provocar xerostomía como también que asocia con alteraciones del gusto, efectos perjudiciales de la microflora oral y además de ser citotóxico en los tejidos orales(7).

Por tal motivo se ha optado por la nanotecnología debido a que las nanopartículas se han utilizado actualmente en varias ramas de la odontología, puesto que proporcionan excelentes características mecánicas mejoradas como también antimicrobianas comparables a los materiales convencionales(8,9). Debido a que las nanopartículas poseen mecanismos de acción bactericida completamente diferentes a los antibióticos y algunos agentes antimicrobianos tradicionales, proporcionando así una opción diferente(10). Por lo tanto actualmente ya se

prueban contra varias cepas resistentes debido a sus actividades antibacterianas y biológicas de amplio espectro debido a la capacidad bactericidas que están relacionada a su naturaleza de las NPs y a sus propiedades intrínsecas de las nanopartículas, a su tamaño nanométrico (1-100 nm), lo cual les facilitan introducirse con mayor facilidad en los microorganismos específicamente por la pared celular y producir daños en la membrana, por lo tanto, influye en los procesos intracelulares que provocan una mayor reactividad, propiedad antimicrobiana y por su relación del volumen y área que posibilita un mayor contacto e interrelación con los microorganismos en donde liberan iones metálicos (11,12).

Las nanopartículas (NPs) óxidos y sus nanocompuestos metálicos han ganado más atención en odontología, especialmente debido a sus propiedades antibacterianas (13). Se ha demostrado que las NP tienen un alto grado de interacción con la pared celular además que exhiben propiedades biológicas mucho mejores que las NPs de los metales originales(14). Una de las NPs óxido metálicas más interesantes es el dióxido de titanio (TiO_2) ya que ha sido considerado como un compuesto antimicrobiano atractivo debido a su naturaleza fotocatalítica y porque es una sustancia químicamente estable, no citotóxica, precursores económicos y generalmente las NPs de TiO_2 son reconocida como segura con una buena resistencia a la erosión, corrosión y alta resistencia de refracción y fácil control, excelente morfología superficial(15–17). Además, varios estudios también han revelado que demuestra excelentes propiedades antibacterianas contra varias cepas microorganismos como bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como propiedades antifúngicas (18,19).

Por lo tanto, se exploran varios nanocompuestos/nanodispersiones basados en su preparación con NPs de TiO_2 y la combinación con agentes antimicrobianos no antibióticos bien conocidos en el mercado, como es el ácido hipocloroso (HOCl) para poder disminuir la carga bacteriana sin ser citotóxico(20).

El ácido hipocloroso es agente antimicrobiano no antibiótico que no puede provocar resistencia a las bacterias y hongos, además que es un agente utilizado para

prevenir infecciones, reducir la inflamación y promover cicatrización de heridas con efectos adversos mínimos eficaz contra una amplia gama de microorganismos(21).

Además, las NPs de TiO_2 y el ácido hipocloroso tiene un efecto oxidante y también están catalogados dentro del grupo de unas diminutas moléculas que son llamadas especies reactivas del oxígeno (ROS), por donde el HOCl se obtiene por medio de las células del sistema inmune (neutrófilos y de los macrófagos) mediante un proceso inmunológico que se conoce por "estallido respiratorio", durante el proceso de fagocitosis de antígenos(22–24). Por el contrario, el mecanismo de acción antimicrobiano de las NPs de TiO_2 está vinculada con sus especies reactivas de oxígeno (ROS) y estas tienen un mayor efecto bajo la irradiación de luz UV, estas dañan a las células bacterianas y conducen a su apoptosis(25,26). Por lo cual la combinación de dos agentes antimicrobianos con dichas particularidades podrá tener un amplio espectro contra las bacterias Gram-negativas, Gram-positivas y algunas especies de hongos, que será de gran importancia para superar la MDR y las mutaciones de los microorganismos (27).

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

Nanotecnología

La nanotecnología se refiere a las partículas menores de 1 μm en la nanoescala, este término fue presentado por el Profesor Noro de la Universidad de Ciencias de Tokio en el año de 1974(28). Pero anteriormente la idea de la nanotecnología fue concebida por el físico teórico estadounidense que obtuvo el premio nobel Richard P. Feynman en el año de 1959 en su conferencia en el *Annual Meeting of the American Physical Society* diciendo su frase icónica “Hay mucho espacio en el fondo”, así sugiriendo la inevitabilidad de la transición de la tecnología médica del nivel macro al nivel micro y más allá al nivel atómico(29). También se puede definir como un campo de la ciencia o tecnología que incluye la investigación y desarrollo, creación como la utilización de materiales, dispositivos u objetos con tamaño nanométrico en dimensiones entre 1 y 100 nm de diferentes tipos y con ciertas clasificaciones particulares(30). En la actualidad existen diferentes tipos de nanomateriales/ nanocompuestos como también nanopartículas que son utilizadas para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades a nivel médico, pero a nivel global tiene otros usos. véase la figura 1, que explica la clasificación de las nanopartículas por su origen, dimensión y configuración electrónica (31).

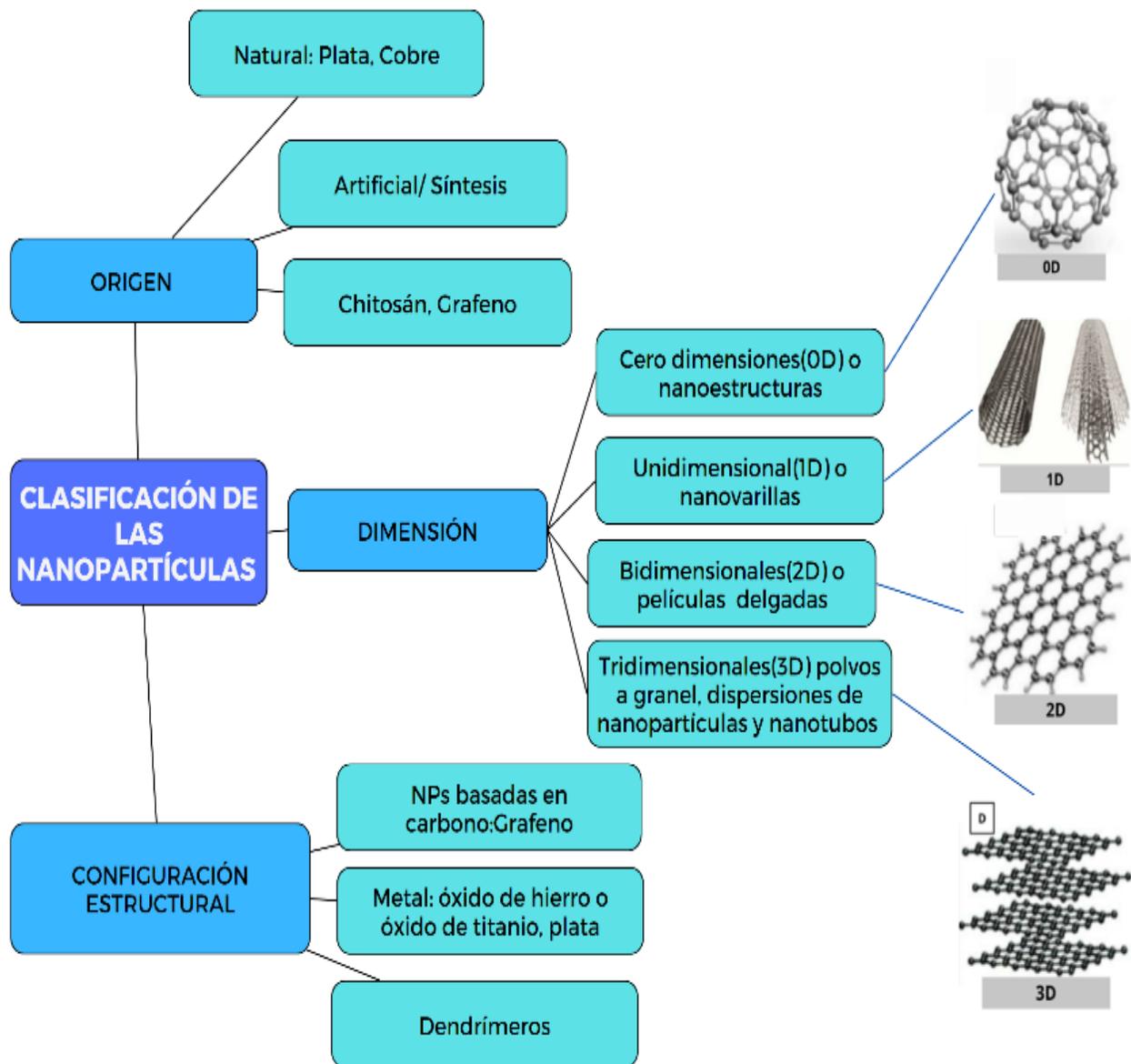


Figura 1. Clasificación de las nanopartículas, la primera es por su origen el cual puede ser natural o artificial / síntesis y como basados en chitosán y grafeno, en la segunda clasificación abarca el tipo de dimensión que va desde 0D a 3D en la figura se observan las estructuras de cada tipo de dimensión, por último, por su configuración estructural que son NPs basadas en una configuración estructural de carbono o grafeno, metales u óxidos y por dendrímeros lo cuales son estructuras que se basa en polímeros lineales. (Fuente propia)

Nanotecnología en Odontología

El término "Nano-odontología" fue inventado por Freitas en el año de 2000, quien realizó diversas investigaciones en torno a nanomateriales, nanorobots, que ayudaron en la regeneración de la dentición, como también para favorecer el campo de la ortodoncia y también desarrolló dentifrobots (dentífricos nanorobóticos)(32). Pero debido a la propiedades de la nanopartículas se ha logrado resolver problemas que anteriormente no creía tener solución, por lo tanto, varios investigadores han mostrado mucho interés en las nanopartículas/ nanomateriales y nanodispositivos ya que hoy por hoy las aplicaciones de la nanotecnología son muy amplios en odontología ya que su uso incluye en el diagnóstico, como en la odontología preventiva, materiales dentales, prostodoncia, endodoncia, odontología conservadora y estética, periodoncia, implantología y odontología regenerativa y nanoproduitos pero en estos momentos está abriendo nuevas alternativas impensables, tales como la renaturalización de la dentición, curas permanentes de hipersensibilidad, creación de huesos, de dientes artificiales, anestesia local, materiales de ortodoncia, mantenimiento de la salud oral y estrategias para la regeneración tisular, en la maneras para administrar fármacos y la creación de nuevos, véase la figura 2 que explicas los usos de las NPs que existen en la actualidad en la odontología y en su distintas ramas con ejemplos de nanomateriales dentales (33,34).

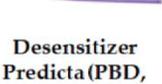
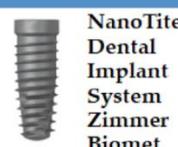
		OPERATORIA	PREVENTIVA	ENDODONCIA	PERIODONCIA	PRÓTESIS DENTAL
Materiales restauradores		 3M ESPE Ketac No100	 Toothpaste NanoCare Gold	 EndoSequence BC Sealer	 Arestin Microspheres	 Nanotechnology Elite HD+
		 3M ESPE Filtek Supreme	 BrushiteBond	 Roeko GuttaFlow sealer	 Orthogen Nanogen	 GC OPTIGLAZE color
		 KERR Premise™	 Desensitizer Predicta (PBD, Parkell)	 Epiphany SE sealer	 Nanorobotics	<div style="background-color: #0056b3; color: white; padding: 5px; text-align: center;">IMPLANTOLOGÍA ORAL</div>  NanoTite Dental Implant System Zimmer Biomet
Sistemas adhesivos		 3M AdperSingle Bond+				
		 VOCO Futurabond M+				

Figura 2. En la figura se muestra una variedad de productos dentales que utilizan las NPs estos son usados para mejorar las propiedades de los materiales de uso dental, el cual es amplio ya que en la actualidad se usan en todas las áreas de la odontología (9) .

Nanosolución/ Nanodispersión

La aplicación biomédica en odontología necesita que las nanopartículas estén en su forma coloidal en el agua o en una solución líquida ya que permite una mejor interacción con una interfaz biológica debido en que su forma coloidal le permite ser más accesibles para objetivos remotos como son órganos, células y compartimientos subcelulares y fácil uso (35).

Pero las nanopartículas más utilizadas en dispersiones coloidales son las metálicas u óxido metálicas ya que se sintetizan normalmente mediante la reducción de complejos metálicos, en soluciones diluidas en condiciones de reacción de reducción controlada, además que poseen excelentes propiedades antimicrobianas ya que pueden liberar muchos más cationes metálicos en solución, lo producen iones que a su vez causan daño a la pared celular y de igual manera a la membrana

celular, produciendo la oxidación de proteínas y lípidos como la interrupción del enlace de hidrógeno entre las cepas de ADN como la liberación de radicales libres que destruyen la estructura celular(36).

Nanopartículas de óxido metálicos

Las nanopartículas de óxido metálicos se sintetizan más debido a su mayor reactividad y eficacia, algunos ejemplos son el óxido de cerio (CeO_2), el óxido de zinc (ZnO), el óxido de aluminio (Al_2O_3), el óxido de titanio (TiO_2), la magnetita (Fe_3O_4), el óxido de hierro (Fe_2O_3) y dióxido de silicio (SiO_2), que son óxidos frecuentemente sintetizados porque exhiben características excepcionales en comparación a las NPs metálicas (37).

Últimamente los materiales antibacterianos de tamaño nanométrico han atraído mucha atención en la rama de la odontología, específicamente las nanopartículas de óxido metálicos, ya que destacan que debido a su actividad antibacteriana fuerte y de amplio espectro contra diferentes tipos de microorganismos, además de fortalecer las propiedades mecánicas de los materiales y prevenir el desarrollo de caries esto gracias a que liberan iones metálicos que inducen un estrés oxidativo y como los mecanismos no oxidativos, por tal motivo existen varios estudios con las NPs de óxido de metal para desarrollar materiales dentales antimicrobianos para la restauración de resina, la terapia endodóntica, en el tratamiento de ortodoncia como la reparación de la superficie del implante y la prótesis removible y han encontrado que las propiedades antibacterianas de los materiales de tamaño nanométrico se mejoran significativamente, su producción fácilmente escalable(38,39).

Síntesis de las Nanopartículas por el método Sol- Gel

Uno de los métodos que son más usados para sintetizar las nanopartículas o nanomateriales existentes, son por el método sol-gel debido a su facilidad y eficacia, su alta pureza del producto, la estrecha distribución del tamaño de la partícula y el logro de una nanoestructura uniforme, además de que implica la

conversión de soluciones en un sol coloidal y luego el sol coloidal a un sol a gel esto causado por calentamiento adicional a altas temperaturas que da como resultado la formación de nanopartículas con alta cristalinidad. En la figura 3 se muestra cómo se clasifican las formas de síntesis de nanopartículas(40).

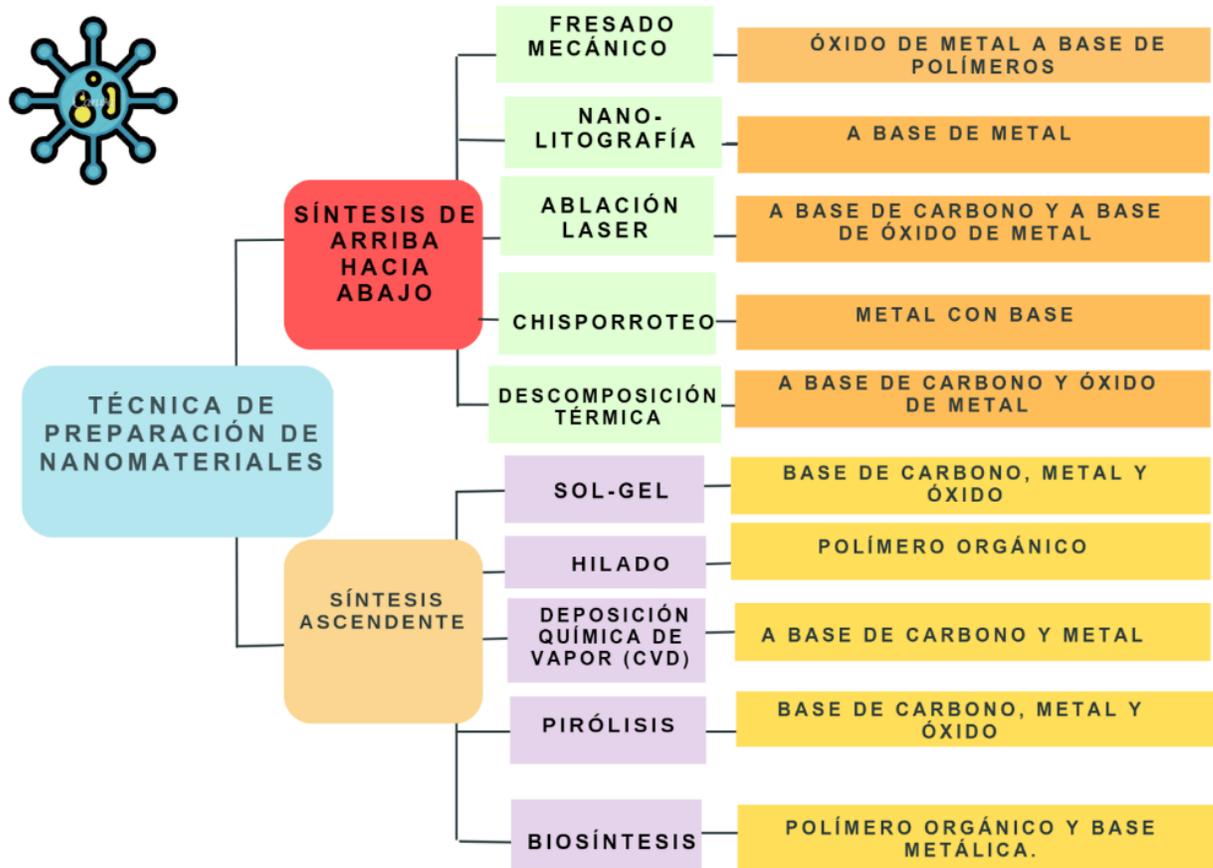


Figura 3. Técnicas de síntesis convencionales para las nanopartículas(37,40).

Los pasos involucrados en cualquier sol-gel. son la hidrólisis, la condensación, la gelificación, el envejecimiento, el secado y la densificación, en este método, los precursores de metales como nitratos metálicos, cloruros metálicos y acetatos son inicialmente disueltos en soluciones acuosas, luego el agente quelante como el ácido cítrico o ácido salicílico se utiliza para formar complejos metálicos estables (41,42).

Además, los alcoholes como el polietilenglicol (PEG) o el etilenglicol (EG) se utilizan como agentes de reticulación para la formación de resinas poliméricas homogéneas

a nivel molecular. Este gel reducirá la segregación de iones metálicos particulares y confirma la homogeneidad de la composición. El gel se sintetiza a altas temperaturas para eliminar los aditivos orgánicos y formar el producto final con fase pura y buena cristalinidad (43).

Nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂)

El dióxido de titanio (óxido de titanio (IV), Titania, TiO₂) es un compuesto inorgánico que se encuentra naturalmente en la naturaleza, presentan una gran superficie, excelente morfología superficial, es un óxido metálico de transición semiconductor que muestra características especiales, como fotoactividad y propiedades fotocatalítica que permiten degradar la materia orgánica siendo así catalogadas como excelentes agentes antibacterianos y antifúngicos como antitumoral(44,45).

Además las NPs de TiO₂ es un pigmento blanco que se han investigado y fabricado ampliamente debido a sus bajos costos y fácil producción esto comprobado a que representa el 70 % del volumen total de producción anual de pigmentos a nivel global que comenzó a principios del siglo XX, como un sustituto no tóxico de un tinte blanco para pinturas por su brillo e índice de refracción muy alto, como también por ser consideradas entre las cinco principales NPs utilizadas en productos de consumo esto debido a poseer excelentes propiedades de oxidación y mecánicas, aceptable estabilidad química y térmica, tener una película delgada de transparencia e inercia biológica y química, hidrofilia, alta eficiencia de conversión de luz, absorción óptica y conductividad térmica, resistencia a la corrosión y al desgaste, ser biocompatibles(46,47).

Método Sol- Gel de las nanopartículas de TiO₂

El método de síntesis de sol-gel es unas de las técnicas más fáciles y eficaces para sintetizar diferentes NPs de TiO₂ debido que es una técnica económica utilizada en la fabricación de nanopartículas en donde se puede obtener una alta cantidad en los cristales de óxidos los cuales permiten la regulación del tamaño como la morfología de su superficie de las NPs, como también se ha verificado como una ruta superior para controlar el volumen, propiedades superficiales de los óxidos a

baja temperaturas, además de disposición de fases en precursores de diversas concentraciones, y es simple de realizar (48).

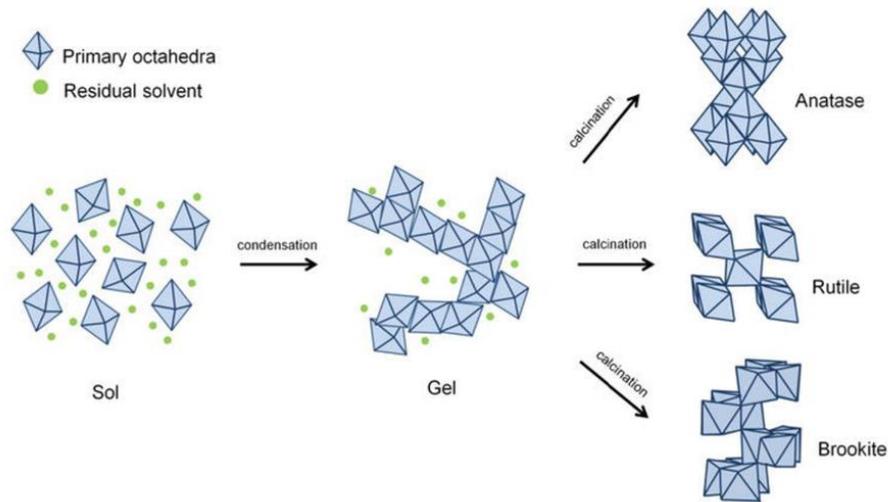


Figura 4. El proceso de hidrólisis, condensación y calcinación del método sol-gel en la síntesis de las nanopartículas cristalinas de anatasa, rutilo y brookita TiO_2 .(49).

El método sol-gel para la síntesis de NPs de TiO_2 es un proceso de transformación de los soles (son partículas sólidas que están suspendidas en líquido) en geles (son redes de soles de las partículas) que involucra dos reacciones principales: hidrólisis y condensación, previa a la obtención de nanopartículas de TiO_2 cristalinas por calcinación véase la Figura 4 que explica las etapas de método sol-gel para la síntesis de las NPs de TiO_2 (49).

Para sintetizar las NPs de TiO_2 , los precursores comúnmente más usados incluyen el $\text{Ti}(\text{OBU})_4$, TiCl_3 , TiCl_4 , TiBr_4 ya que estos precursores luego se hidrolizaron agregando agua u alcoholes (hidrólisis), lo que resultó en la formación de una red tridimensional compleja que dependiendo de la relación precursor-agua y el pH se obtendrá diferentes tamaños como morfologías de las nanopartículas, en la fase de calcinación debe determinarse cuidadosamente ya que la transformación de fase del TiO_2 está muy influenciada por la temperatura empleada dando como resultados los polimorfos cristalinos de TiO_2 (anatasa, rutilo y brookita) se forman así a partir de la suspensión coloidal y dependiendo de los parámetros(50).

Aplicaciones de las nanopartículas de dióxido de titanio TiO₂

Las aplicaciones que tienen las nanopartículas de TiO₂ tienen una amplia gama en las distintas áreas incluidos materiales electrónicos, energía, medio ambiente, salud y medicina, catalizadores, física, química, entre otros. Algunas áreas son como en la industria farmacéutica se usan para la producción de cremas dermatológicas, protectores solares y fabricación de medicamentos, en la industria cosmética para la fabricación de shampoo, cremas, bálsamos labiales y maquillaje como colorante en plásticos blanco, en la industria alimentaria como pigmento alimentario, en la fabricación de alimentos enlatados, aditivos alimentarios y además que ayudan a proteger a los alimentos, las bebidas y los suplementos, como en la manufacturación de pinturas, tintas y de papel, para opacificar los materiales plásticos otros usos son como la generación y almacenamiento de energía, en la tecnología de imagen en la fabricación de celdas solares, dispositivos electromagnéticos, transistores de electrones, plantas productoras de energía como en la purificación del agua y aire, como agentes desinfectantes y de limpieza (51–53).

Las NPs de TiO₂ por sus propiedades son utilizadas en medicina como material reforzado o recubrimientos para la superficie desnuda de los implantes de titanio, esto para cubrir algunas de las deficiencias de los implantes de titanio en la fabricación de medicamentos para la osteoporosis, anticancerígenos y antibióticos, y usarse como sistemas locales de administración de medicamentos y también como dispositivos antibacterianos a base de TiO₂ para la prevención y el tratamiento de infecciones, de tal forma como desinfectante de los dispositivos médicos y hospitalarios como en la fabricación de biosensores, agentes fotosensibilizadores en el tratamiento del cáncer, así como en la inactivación fotodinámica de bacterias resistentes a los antibióticos véase la figura 5 que explica los usos actuales y futuros de las NPs TiO₂ (54,55).

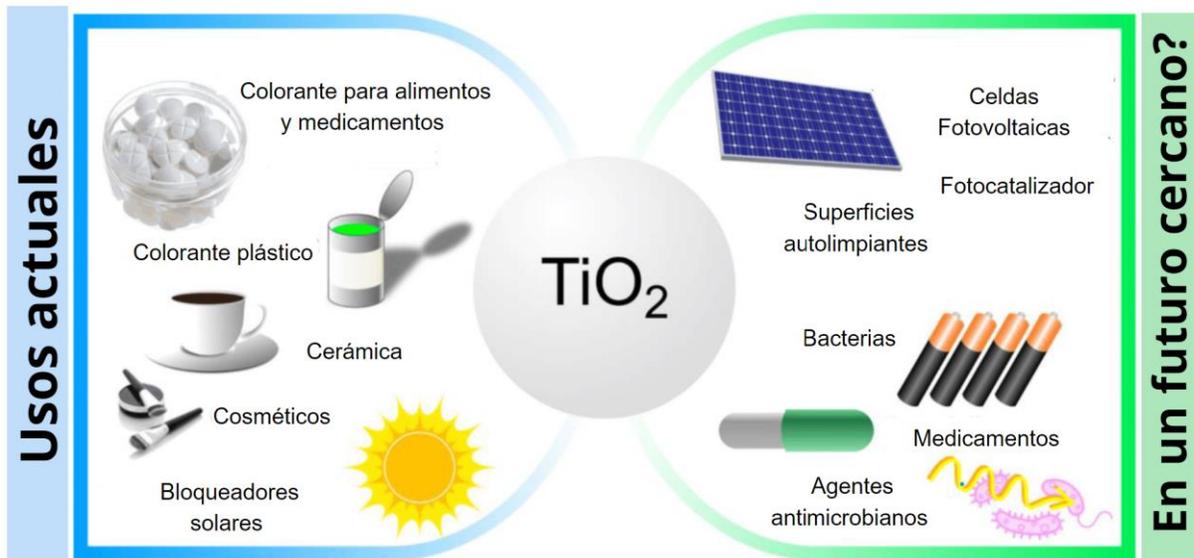


Figura 5. Aplicaciones actuales y usos potenciales en un futuro de las NPs de TiO_2 (44).

Aplicaciones de las nanopartículas de dióxido de titanio TiO_2 en odontología

El uso que tiene las NPs de TiO_2 en odontología son muy amplias ya que se utilizan en las diferentes áreas de la odontología pero en general su uso es muy extenso que van desde la odontología preventiva, en el diagnóstico, como en el tratamiento de patologías, enfermedades relacionadas a la cavidad oral, mejorar la eficacia de los materiales y dispositivos dentales existentes en el mercado, como de tal manera usado como agentes antimicrobianos, antifúngicos y antivirales debidos a las propiedades que poseen las NPs de TiO_2 (56,57).

Algunos ejemplos más comunes y explotados del uso de las NPs de TiO_2 en odontología es para la fabricación de pastas y enjuagues bucales como desinfectantes orales, pero también tienes muchos más usos específicos en cada una de las ramas de la odontología véase la tabla 1 y la figura 6 (58–60).

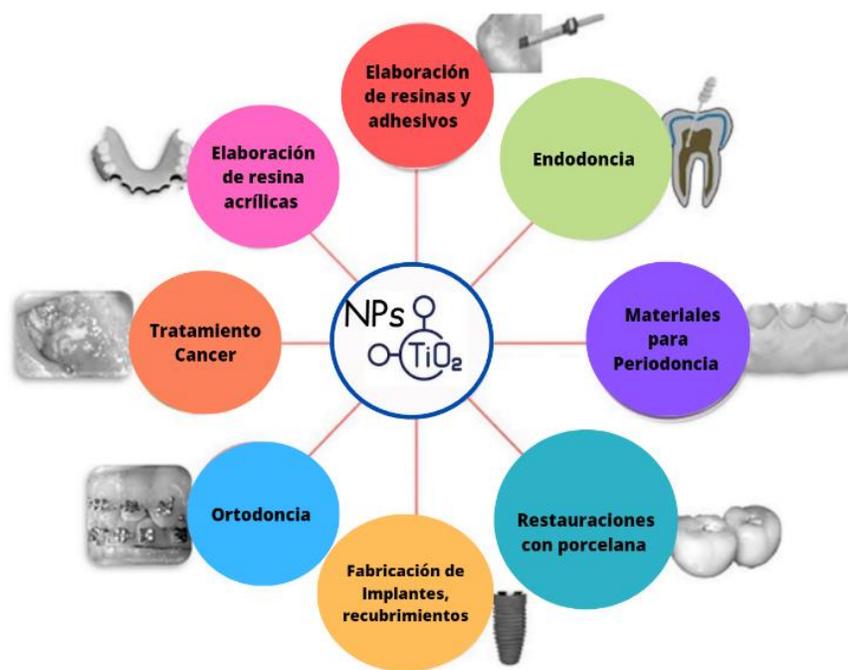


Figura 6. Ejemplos de materiales dentales que contienen NPs de TiO_2 en su composición, se usan como recubrimientos en su superficie o son utilizados para tratamientos (59).

Tabla 1. Uso de las nanopartículas de TiO_2 en los campos de odontología (61,62)

Ortodoncia	Prótesis/Operatoria	Periodoncia /Implantología	Endodencia	Patología /Cirugía
Fabricación para brackets y ligas como alambres, adhesivos, resinas y acrílicos.	1. Agentes Blanqueadores, resinas y ionómeros de vidrio, resinas fluidas y adhesivos. 2. En el pretratamiento de la superficie de la dentina o el esmalte.	1. Desinfectantes antibacterianos orales. 2. En la fabricación de implantes o recubrimientos para implantes. 3. Como enjuague dental.	1. Selladores de conductos apicales y materiales de obturación. 2. En el tratamiento de la hipersensibilidad dental.	1. Tratamiento de tumores orales o en la fabricación de medicamentos. 2. En la fabricación de placa óseas y férulas. 3. Como agente antifúngico.

		<p>4. En biomateriales.</p> <p>5. En la fabricación de pastas dentales.</p>	<p>3. En soluciones para irrigar los conductos.</p> <p>4. Como aditamento para el MTA (63).</p> <p>5. En recubrimientos de limas rotatorias.</p>	
--	--	---	--	--

Aplicación y efecto antimicrobiano de las nanopartículas de TiO₂ en odontología

El uso y aplicación que tiene las nanopartículas de dióxido de titanio como agente antibacteriano usado en el campo de la odontología y en la medicina es muy investigado debido a que tienen excelentes propiedades antibacterianas más altas que la clorhexidina u otros agentes antibacterianos, ya que poseen un color agradable, tienen una alta biocompatibilidad, además que las NPs de TiO₂ han demostrado tener propiedades antiadhesivas frente a *Streptococcus mutans*, esto debido al fuerte poder oxidante por generación de radicales libres que forman un nivel de energía tan alto que pueden reaccionar con diferentes materiales orgánicos y degradarlos, como también el tamaño de las NPs facilita su penetración en los túbulos dentinarios y su probable liberación sostenida, posterior y así poder tener efectos antibacterianos más prolongados, las nanopartículas pueden inhibir la adherencia bacteriana y por lo tanto, la proliferación de bacterias (64,65).

Además que el efecto antimicrobiano también podría atribuirse a las propiedades de la superficie y la estructura de las nanopartículas de TiO₂ que incluyen; ser nanocristalino, efecto de superficie hidrófila, reflectividad infrarroja y actividad antimicrobiana sin contacto debido a estas propiedades pueden interferir con los mecanismos biológicos vitales incluyendo la respiración, la reacción de fosforilación

oxidativa y semipermeabilidad, su mecanismo de acción simplificado de las NPs de TiO₂ contra las bacterias, su efecto antimicrobiano en materiales dentales se ilustra en la tabla 2 (66,67).

Tabla 2. Efecto antimicrobiano que tienen las nanopartículas de TiO₂ en combinación con materiales de uso Odontológico.

Autor y año	Tamaño de NPs	Bacterias	Estudio antimicrobiano	Aplicación
Ibrahimn et al.2017(68).	21 nm en combinación –(Quitano).	<i>Streptococcus mutans</i>	Ensayo de MTS	Cemento de ionómero de vidrio (GIC)
Karasev et al.2015 (36).	100 y 200 nm (agua bidestilada).	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Difusión agar	Agente antibacteriano
Ahrari et al. 2015 (69) .	40 y 60 nm (agua).	<i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus sangius</i>	Difusión en agar	Enjuagues bucales
Ragheb et al. 2021(70).	< 20 nm (monómero)	<i>Candida albicans</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermis</i>	Difusión en agar	Aditamento de prótesis dentales.

Rimjhim et al. 2016 (71) .	50 nm	<i>Streptococcus mutans</i> y <i>Enterococcus spp</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Selenomonas</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Pseudomonas spp</i> , <i>Lactobacillus fermentii</i> y <i>Peptostreptococcus spp</i> .	Difusión en pozo de agar	Pasta dental y colutorios.
----------------------------	-------	--	--------------------------	----------------------------

Ácido Hipocloroso

El ácido hipocloroso (HOCl) es un desinfectante y sanitizante ideal el cual no es citotóxico, es ideal para desinfectar las superficies, como no corrosivo, efectivo en varias formas y de bajo costo, además que el HOCl es una sustancia endógena en todos los mamíferos y es eficaz contra una amplia gama de microorganismo, además de ser un poderoso agente oxidante/desproteinizante en solución acuosa también tiene propiedades tanto proinflamatorias como antiinflamatorias y parece desempeñar un papel importante en el sistema inmunitario ya que se clasifica dentro del grupo especies reactivas del oxígeno (ROS) que son producidas por las células del sistema inmune que son los neutrófilos y macrófagos durante una etapa inmunológica y biológica conocido como "estallido respiratorio" durante la fagocitosis de los antígenos véase la figura 7 que representa la producción del HOCl a nivel intracelular (72,73).

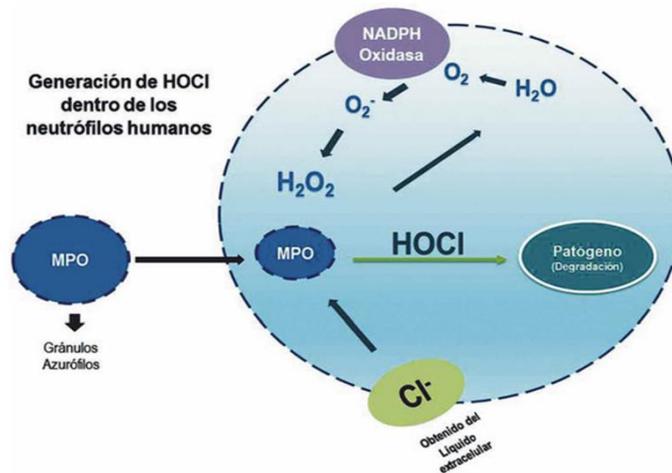


Figura 7. Se observa la producción de HOCl y como se obtiene a nivel intracelular durante el proceso del estallido respiratorio, esta existe debido a la fagocitosis de un antígeno, la cual es representada en la figura de una manera esquemática (73).

El ácido hipocloroso (HOCl) es utilizado para prevenir enfermedades, para disminuir la inflamación y acelerar la curación de heridas con menos efectos secundarios adversos, hasta la fecha ha habido numerosos informes sobre la potente actividad microbicida y la seguridad de HOCl en la desinfección ambiental y la antisepsia. Los estudios in vitro también han demostrado que el HOCl es un excelente agente antimicrobiano no antibiótico con efectos significativos sobre los siguientes microorganismos patógenos orales como son el *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, y varillas entéricas que viven en la biopelícula dental de los dientes y los implantes dentales y también es eficaz contra micobacterias, esporas, hongos, virus e incluso el resistente *Clostridium difficile* por lo tanto es utilizado en odontología como medicina como agente antimicrobiano debido a los distintos mecanismo de acción antibacteriana que tiene el HOCl véase la figura 8 que explica los diferente mecanismo antibacteriano del HOCl (74,75)

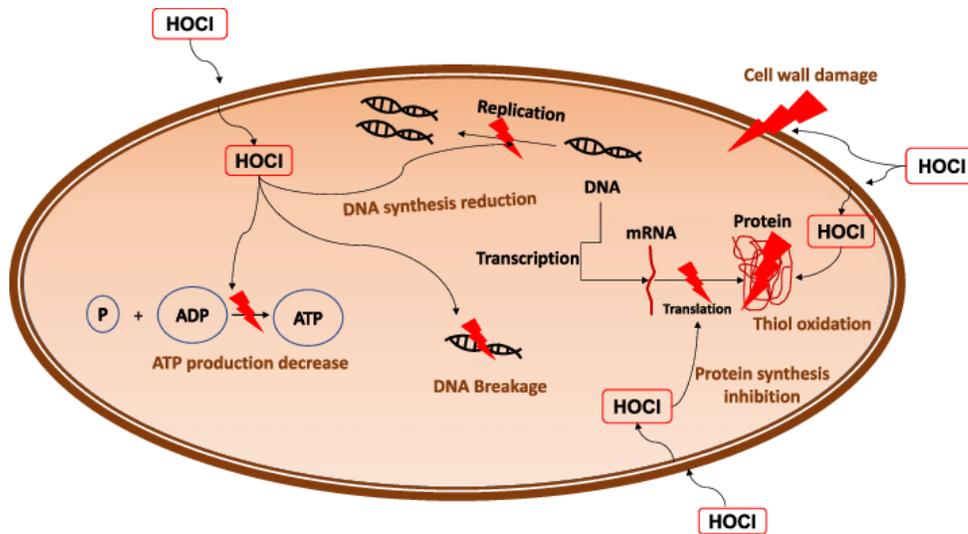


Figura 8. Mecanismos de acción del HOCI contra las células bacterianas(76).

Aplicaciones del Ácido Hipocloroso en odontología

En odontología el ácido hipocloroso (HOCl) es usado debido a su bajo peso molecular que le permite una difusión rápida y a la falta de carga que evita que sea repelido por las superficies de células bacterianas cargadas negativamente, el HOCl tiene un alto potencial para usarse como sustancia antimicrobiana contra las biopelículas de una variedad de bacterias orales, además de no causar la erosión en la superficie del diente y de no que afectar la viabilidad de los queratinocitos y que pueda ser capaz de disolver y eliminar la fase orgánica del barrillo dentinario (77,78).

También es empleado como un enjuague bucal (particularmente eficaz después de cualquier tipo de cirugía bucal), en el tratamiento de agua de las unidades dentales, en el área de endodoncia como una solución de irrigación endodóntica y como agente quimioterapéutico para el tratamiento de la periodontitis como también el HOCl es efectivo para limpiar superficies de implantes contaminadas con biopelículas y tiene el potencial de ser un antiséptico para el tratamiento de la perimplantitis como un desinfectante de impresiones e instrumentos dentales, baños ultrasónicos y también tiene un uso como desproteinizante del barrillo dentinario véase la tabla 3 sobras aplicaciones antimicrobianas del HOCl en odontología(79).

Tabla 3. Efecto antimicrobiano en odontología y medicina del Ácido hipocloroso como aplicaciones.

Autor y Año	Tipo y concentración del ácido hipocloroso usado	Estudio antimicrobiano	Bacterias	Uso
Anwar et al.2022 (80).	Ácido hipocloroso al 0,01%	Ensayo en agar por el método de difusión en pocillos de copa de Kirby-Bauer.	<i>Enterococcus faecalis</i>	Solución de irrigación de heridas
Chen et al. 2106(79).	Relación de volumen 4:1 de HOCl	Ensayo alamarBlue y la detección de lipopolisacáridos (LPS)	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus sanguis</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Agente antimicrobiano de superficies de implantes titanio contaminadas
Feng et al.2002(81).	El HOCl comercial en 550 ppm y experimental de 750 ppm	Difusión en agar	<i>Enterococcus faecalis</i>	Desinfectante de superficies
Haapasalo et al.2010 (82) .	Aquatine Endodontic Cleanser	Modelo <i>in-vitro</i> con dientes	<i>Enterococcus faecalis</i>	Solución de Irrigación del sistema de conductos
Hsieh et al.2020 (83).	Agua EO compuesta por ácido hipocloroso (HOCl)	Difusión	<i>Streptococcus mutans</i>	Enjuague bucal
Shajahan et al.2016(84).	200 ml de solución desinfectante (clean cert) en cada depósito de agua	Análisis con el microscopio electrónico de barrido (SEM)	Biopelícula	Desinfectante para desinfectar las líneas de agua de la unidad dental

Células madre de la papila apical (SCAPs)

La papila apical es la porción apical de la papila dental, está unida libremente al ápice se encuentra solo en dientes de crecimiento antes finalización del desarrollo de la raíz dental, en el desarrollo de los dientes permanentes en erupción además esta contribuye a la formación de los dientes ya que existe una zona rica en células entre la papila apical y la pulpa dental (85). En los últimos años se descubrió que la papila apical tiene una gran importancia en la maduración como formación de la raíz dental y de las células madre de la papila apical (SCAPS) que son de células madre mesenquimales células aisladas de la papila apical permanente inmadura humana que fueron inicialmente aisladas por Sonoyama en el año de 2006 que tiene la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, odontoblastos y adipocitos como también de poder diferenciarse en otros tipos de células no nativas, como las células neurales, condrocitos y los hepatocitos, además las SCAPs tienen un alto potencial proliferativo de regeneración de dientes a base de célula por lo cual SCAPs parece ser más adecuado para la regeneración de tejidos que DPSCS y las PDLSC porque SCAPs tiene una mayor una mayor capacidad para la regeneración nervios y potencial de mineralización y de poseer la capacidad de diferenciarse en células multilínea, pueden considerarse como una fuente de células prometedor para las terapias basadas en células madre (86,87).

El uso que tienen la SCAPs en la actualidad es el tratamiento de endodoncia regenerativa para apoyar el desarrollo de la raíz de los dientes inmaduros que anteriormente experimentaron necrosis de pulpa y periodontitis periapical ya que se ha demostrado que las SCAPs demuestran la capacidad de promover la regeneración de tejidos mineralizados dentro de la raíz de los dientes previamente necróticos o en el tejido periapical después de que se resuelve la infección severa ya que las SCAPs tienen aptitud inherente para sobrevivir como prosperar en un entorno hipóxico debido a que su nicho normalmente está poco vascularizado y su nutrición depende de la difusión pasiva de los tejidos circundantes (88,89).

Ensayo de MTT

La prueba de MTT se usa para cuantificar la actividad metabólica celular, como indicador de la viabilidad, la proliferación celular, para evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas o de los nanomateriales. Es un ensayo colorimétrico que se basa en la reducción de la sal de tetrazolio amarilla (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o conocido como MTT) llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a cristales de formazán de color morado por las células metabólicamente activas, las células viables contienen enzimas oxidorreductasas y deshidrogenasa y donantes de electrones dependientes del NADPH que reducen el MTT a formazán (90). Los cristales de formazán insolubles se solubiliza con un disolvente como el dimetilsulfóxido (DMSO) para una medición homogénea y la disolución coloreada resultante se cuantifica midiendo la absorbancia de la cantidad de formazán que se refleja por medio de la densidad óptica en un rango de a 540 y 720 nm con un espectrofotómetro multipocillos de barrido multipocillo (lector ELISA) y muestran un alto grado de precisión véase la figura 18 que explica los mecanismo general del ensayo de MTT (91). Cuanto más oscura sea la disolución, mayor la cantidad de formazán producido que resulta ser el número de células metabólicamente activas viables, pero no puede medir las células muertas, y la señal generada depende del grado de activación de las células(92).

Este sistema de ensayo colorimétrico no radiactivo en el que se utiliza MTT fue descrito por primera vez por Mosmann et al en 1983 y mejorado en los años siguientes por otros investigadores (93). El ensayo de proliferación celular (MTT) es optimizado ya que contiene reactivos listos para usar y no requiere pasos de lavado ni la adición de más reactivos (94). Se trata de un ensayo cuantitativo que permite una manipulación rápida, cómoda de un gran número de muestras y la ausencia de cualquier radioisótopo (95).

Las pruebas (MTT) puede utilizarse para las siguientes aplicaciones:

- Medir la citotoxicidad *in vitro* de los fármacos o compuestos a diferentes concentraciones en líneas celulares establecidas o células primarias de pacientes.
- Pruebas de sensibilidad de nuevos medicamentos.

- Estudio de resistencia cruzada entre fármacos relacionados y no relacionados.
- Medición de la proliferación celular en respuesta a factores de crecimiento, citocinas y nutrientes.
- Estudia la activación celular.
- Cuantificación del crecimiento y la viabilidad celular.
- La actividad mitocondrial/metabólica de las células.
- Determinar el crecimiento bacteriano
- Ensayos de actividad antimicrobiana (96,97).

Ensayo de XTT

El ensayo colorimétrico para la cuantificación no radiactiva ya que no utiliza isótopos radiactivos, de la proliferación celular, la viabilidad y la citotoxicidad que utiliza el 2,3 bis (2 metoxi-4-nitro-5 sulfofenil) 2H tetrazolio, 5 carboxanilida (XTT) fue descrito por primera vez por Scudiere, P.A. et al. en el año de 1988 y mejorado en años posteriores por varios otros investigadores, este reactivo permite lecturas de absorbancia directas, eliminando así un paso de solubilización y acortando el procedimiento de ensayo de crecimiento de microcultivo, con la adición de metosulfato de fenazina (PMS) mejora notablemente la reducción celular de XTT en un rango de 4hrs para medir la absorbancia se usa una longitud de onda en de 450- 660 nanómetros con un espectrofotómetro (lector ELISA) véase la figura 18 en donde explica los mecanismo del XTT (98,99).

El nuevo reactivo XTT que es sensible al redox celular, a la reducción intracelular como también a las células que respiran activamente que se reducen mediante deshidrogenasas de células metabólicamente activas que convierten el compuesto XTT que se basa en la reducción de una sal amarilla de tetrazolio a un formazán que es soluble en agua de un color naranja correspondiente a la viabilidad celular relativa, esta conversión ocurre solo en células viables proporcionando así un ensayo de crecimiento celular, citotoxicidad in vitro como también en la actividad metabólica, en pruebas antimicrobianas con posible aplicabilidad en una variedad de problemas en farmacología y biología celular, en la actualidad se usa más ya

que ofrece ventajas significativas sobre MTT, como resultado de la reducción del tiempo de ensayo y la manipulación de muestras, al tiempo que ofrece una sensibilidad equivalente (100,101).

CAPÍTULO 2

Antecedentes

En la actualidad no existe una línea de investigación de una nanosolución de ácido hipocloroso (HOCl) con NPs de dióxido de titanio (TiO₂) pero en cambio existen productos u investigaciones similares que utilizan el HOCl, pero con diferentes tipos de nanopartículas que pueden ser metálicas u óxido metálicas en diferentes tipos de microorganismo como también con distintas aplicaciones por lo cual nos da la pauta para seguir una línea de investigación parecida pero siguiendo un enfoque en el campo de odontología utilizando la NPs de dióxido de TiO₂ debido a su propiedades y efecto antimicrobiano véase la tabla 4 de antecedentes de nanocompuestos/nanosoluciones de HOCl y la figura 19 que representa una patente y ejemplos la nanopartículas en combinación con el HOCl.

Tabla 4. Antecedentes de la combinación de nanopartículas con HOCl.

Autor y Año	NPs	Tamaño y Forma	Ensayo antimicrobiano	Microorganismos	Aplicación
BÜYÜKÜNAL et al.2022(102).	CuO ZnO AgO	200 ppm HOCl + 100 nm CuO 200 ppm HOCl + 100 nm ZnO 200 ppm HOCl +100 nm AgO (Sigma-Aldrich 792004) (Sigma Aldrich 721077), (Sigma-Aldrich 730777)	Difusión en agar	<i>Salmonella Typhimurium</i> , <i>Salmonella Enteritidis</i> , <i>Salmonella Dublin</i> <i>Salmonella Infanti</i>	Desinfectante de superficies
Kuwabara et al 2020 (103) .	Ag	Las Ag NP eran esféricas con un tamaño de	Modelo in vivo ratones diabéticos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Desinfectantes de heridas

		partícula promedio de 5,17 ± 1,92 en soluciones de HClO (200ppm, pH 6,5) y compuestos CNFS/Ag NPs			
--	--	--	--	--	--

CAPÍTULO 3

Planteamiento del problema

El uso continuo e inadecuado de los antibióticos por partes de los pacientes y algunos odontólogos han provocado la aparición de cepas bacterianas multirresistentes (MDR) en el campo de la odontología, causando que los antibióticos y agentes antimicrobianos que se utilizaban anteriormente en el tratamiento de infecciones de origen dental no tengan el mismo efecto, por lo cual se están buscando alternativas que no sean antibióticas, no provoquen resistencia y a su vez que no sean citotóxicas.

Pregunta de investigación

¿Existe un efecto antimicrobiano, antifúngico y no citotóxico usando la nanodispersión de NPs de TiO₂ con HOCl como agente antimicrobiano en odontología?

Justificación

- Las NPs de TiO₂ pueden reducir el crecimiento bacteriano de bacterias multirresistentes al dañar las membranas celulares bacterianas, lo que conduce a una mayor permeabilidad y como consecuencia de la pérdida de componentes celulares vitales a la muerte de las bacterias, para tener el efecto antibacteriano deseado(104) .
- El uso de las NPs TiO₂ en combinación con un agente antimicrobiano usado ya comercialmente como el HOCl para caracterizar una nanodispersión de los dos, puede ayudar a obtener una mayor eficacia antimicrobiana contra los microorganismos multirresistentes a los medicamentos ya que el HOCl es un agente antimicrobiano no antibiótico, clasificado biológicamente como una especie reactiva del oxígeno, lo cual le es extremadamente eficaz y rápido ya que actúa localmente, reacciona con diferentes moléculas como lípidos, nucleótidos y proteínas de microorganismos tanto en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, como en cepas de Candida (105).

Objetivos

General

Comparar el efecto antimicrobiano, antifúngico y citotóxico de la nanodispersión del HOCl con las NPs de TiO₂ tanto experimental y comercial.

Específicos

Sintetizar las NPs con el proceso de sol-gel.

Formar la nanodispersión coloidal de NPs TiO₂ (comerciales y experimentales) con HOCl.

Caracterizar NPs TiO₂, nanodispersión coloidal NPs TiO₂/ HOCl.

Evaluar el efecto antimicrobiano y antifúngico de la nanodispersión de las NPs de TiO₂ tanto experimental y comercial.

Evaluar el efecto citotóxico de la nanodispersión del HOCl con las NPs de TiO₂ en las células cultivadas de SCAPs.

Comparar la eficacia antimicrobiana, antifúngica y citotóxica entre la nanodispersión de las NPs de TiO₂ comerciales y experimentales

Hipótesis

Hipótesis del estudio

Las NPs de TiO₂ tendrán un efecto antimicrobiano en cultivo con *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* y un efecto antifúngico en *Candida albicans* sin ser citotóxico lo que permitirá su posible aplicación como un agente antimicrobiano de uso odontológico.

Hipótesis alternativa

Las NPs de TiO₂ tendrán un efecto antimicrobiano en cultivo con *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* y un efecto antifúngico en *Candida albicans* siendo citotóxico lo que no permitirá su posible aplicación como un agente antimicrobiano de uso odontológico.

CAPÍTULO 4

Marco metodológico

Tipo de estudio: Experimental e *in vitro* puro.

Diseño del estudio: Descriptivo, prospectivo, comparativo y puro.

Universo o Población del estudio/muestra

Universo de estudio:

1. Las NPs de TiO₂ experimentales con HOCl en las concentraciones a evaluar y grupo control positivo, negativo y el HOCl.
2. NPs de TiO₂ comerciales con HOCl en las concentraciones evaluar y grupo control positivo y negativo y el HOCl.
3. El número de las células orales cultivadas del tejido oral humano específicamente de SCAPs.
4. Microorganismos *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*.

Muestra: No probabilístico.

Tamaño de la muestra: Es un triplicado de las pruebas independientes n=9

Criterio de selección del estudio

Criterios de inclusión

- Ácido hipocloroso de la marca Water COT (Consortio Odontológico Traslacional, Toluca del Estado de México).
- Nanosolución de las NPs de TiO₂ experimentales mediante el método sol-gel de morfología anatasa con un tamaño de 15 nm.
- Nanosolución de las NPs de TiO₂ comerciales marca Sigma-Aldrich de morfología anatasa de tamaño de 25 nm con una pureza de 99.7%.
- Microorganismos: *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.
- Cultivos celulares de SCAPs con confluencia mayor de al 80% con una densidad mínima de (1 x10⁵ cel/mL)

Criterios de exclusión

- Nanosolución de HOCl que no permitan la dispersión NPs de TiO₂ experimentales y comerciales.
- Cultivos celulares con más de 15 divisiones.

Criterios de eliminación

- Cultivos celulares y/o bacterianos contaminados.
- Cajas Petri con superficies anormales y con áreas que no estén bien sembradas.
- Agares con más de un mes de almacenamiento.
- Nanodispersión de HOCl y NPs de TiO₂ de comerciales y experimentales contaminados.
- Muestras que no presenten proliferación después de 24 horas.

Variables del estudio

Variables dependientes

Variable	Definición Conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Citotoxicidad	Establece la cantidad de las células que están vivas en la muestra total de células en un determinado tiempo.	Mediante ensayo biológico de MTT con el valor de absorbancia de 550 nm.	Cuantitativa Continua	Razón
Efecto antimicrobiano	Determina el crecimiento del microorganismo infectante o el patógeno, que es	Mediante el método de determinación de sensibilidad antimicrobiana, por difusión en agar y la microdilución.	Cuantitativa Continua	Razón

	inhibido por una concentración de un agente antimicrobiano en una muestra total de bacterias.	En el método de microdilución para evaluar el efecto antimicrobiano se realizó un ensayo de MTT bacteriano y XTT antifúngico con el valor de absorbancia de 550 nm para MTT y de 510 nm para XTT.		
--	---	---	--	--

Variables independientes

Variable	Definición Conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Concentración de nanopartículas	Es la relación que se establece al comparar la cantidad de soluto y el nivel de disolvente presentes en una disolución.	Cantidad de nanodispersión de las nanopartículas de dióxido de titanio presentes en la solución HOCl.	Cuantitativa Continua	Ordinal
Células SCAPs	Son células madres de la papila apical que se sitúan de los dientes permanentes e inmaduros, que tienen las capacidades de alto potencial proliferativo,	Se colocó la concentración de la nanodispersión de HOCl con la NPs de TiO ₂ en contacto con las SCAPs.	Cuantitativa Continua	Razón

	de autorrenovación, de diferenciación celular y baja inmunogenicidad.			
Tipo de nanopartículas	Nanopartícula en forma anatasa y esférica, menor de 50 nm en nanodispersión en HOCl	Se colocó la nanodispersión para evaluar efecto antimicrobiano y citotoxicidad	Cuantitativa Continua	Razón

Diseño metodológico experimental

Materiales para los ensayos

Equipos

- Campana por flujo laminar para bacterias horizontal (Lumisell^{MR} LH-120, Guanajuato, México)
- Campana por flujo laminar para levaduras (Thermo Scientific TM, Grand Island, New York)
- Centrifugadora (Beckman, J2-MC, Indianapolis, USA)
- Incubadora (Binder, Tuttlingen, Germany)
- UV-VISIBLE SPECTROSCOPY (Thermo ScientificTM, Grand Island, New York, USA)
- Agitador magnético IKA C-MAG HS7 (IKA Works, Wilmington, USA)
- Balanza analítica (Denver instrument, Colorado, US)
- Vortex (Genie 2 Daigger, Vernon Hills, Illinois, US)
- Densitómetro (Grant-bio, Grant Instruments, Cambridge, United Kingdom)
- Incubadora de agitación (VORTEMP 1550 LABNET, Edison, Nueva Jersey, US)
- Autoclave (Tuttnauer, Hauppauge, Nueva York, USA)
- Microscopio óptico (LEICA DM IL LED, Wetzlar, Germany)
- Horno de mufla de Thermolyne TM (Thermo Scientific [®]. Grand Island, New York, USA)

York, USA)

- Aspirador de laboratorio Accuris ASPIRE™ (Accuris Instruments, Edison, New Jersey, USA)
- Filtro Millipore ® (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- Baño de Ultrasonido Elmasonic P (Elma, Frechen, Germany)
- Campana de flujo horizontal para células (Biobase, Wolfenbüttel, Alemania)

Muestras

- Nanopartículas de TiO₂ en forma anatasa del tamaño de 15 nm que se obtuvieron de manera experimental por el método sol-gel
- Nanopartículas de TiO₂ en forma anatasa del tamaño de 25 nm con pureza de 99.8% (Sigma-Aldrich, Estado de México, México)
- Ácido hipocloroso de la marca Water COT (Consortio Odontológico Traslacional, Toluca del Estado de México)
- Nanodispersión de HOCl con las nanopartículas en forma anatasa de TiO₂ experimentales
- Nanodispersión de HOCl con nanopartículas de TiO₂ comerciales (marca Sigma-Aldrich).
- Clorhexidina (FGM, Joinville, Santa Catarina, Brasil)
- Agua estéril Inyectable Pisa Frasco con 500 ml (Laboratorios PISA, Guadalajara, Jalisco, México)
- Bacteria ATCC. *S. mutans* Clarke 35668
- Bacteria *Enterococcus faecalis* aislado clínico
- Levadura ATCC. *Candida albicans* Clarke 90028
- Bacteria *Staphylococcus aureus* aislado clínico
- Células SCAPs de aislado clínico

Instrumental

- Micropipetas de 1000,200 µL (Thermo Scientific™, Austin, TX, EUA)
- Micropipetas de 50.0 µL (Thermo Scientific™, Austin, TX, EUA)
- Micropipetas de 1.00 µL (Thermo Scientific™, Dallas, TX, EUA)
- Placa de Petri pequeñas de 6-cm y grandes de 10- cm (Thermo Scientific, Richardson, TX, EUA)

- Frascos de vidrio autoclavable de 3,3 x 250 ml (KIMAX)
- Matraz Erlenmeyer
- Vaso de precipitados
- Mortero de porcelana
- Asa bacteriológica
- Tubos falcón de 10 mL y de 50 mL
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL y de 5mL
- Microplacas de 96 pozos (Thermo Scientific, *Denver, CO, EUA*)

Insumos

- Medio de cultivo para células DMEM (Minimum Essential Medium Eagle) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% antibiótico penicilina-estreptomicina y 1% de glutamina (Sigma-Aldrich, *Sain Louis, MO, USA*)
- Buffer de fosfato (PBS, Ph 7.4)
- Bromuro de tetrazolio (Sigma -Aldrich, *Saint Louis, MO, USA*)
- Dimetilsulfóxido (MEYER, Tláhuac, México)
- Cloruro de titanio IV (Fluka ® Analytical Monterrey, N.L, México)
- Alcohol Etilico Absoluto (Karal, León, Gto, México)
- Campo operatorio
- Agua bidestilada (Karal, León, Gto, México)
- Agar Mueller Hinton Broth (Sigma – Aldrich *Saint Louis, MO, USA*)
- Agar Mueller Hinton™ (Becton Dickins, Cuamatla Estado de México, México)
- Agar Dextrosa Sabouraud Oxoid™ (Becton Dickins, Cuamatla, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México)
- Agar Enterococcus Selective Agar (Sigma – Aldrich *Saint Louis, MO, USA*)
- RPMI Medium 1640 (Gibco ® *Grand Island, New York, USA*)
- Ácido 3-morfolinopropanosulfónico, (MOPS 500 G, J.T Baker ®, Ecatepec de Morelos, Estado de México, México)
- Solución de cloruro de sodio (Sigma – Aldrich *Saint Louis, MO US*)
- Membrana de filtración (Thermo Scientific ®. Grand Island, New York, USA)
- XTT sodium salt, (Sigma -Aldrich, *Saint Louis, MO US*)
- Phenazine methosulfate (PMS, Sigma -Aldrich, *Saint Louis, MO US*)

Desarrollo de la metodología

Cada uno de los experimentos se llevó a cabo en la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León (UNAM) en las instalaciones del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria (LII) en el área de Nanoestructuras & Biomateriales.

Síntesis de las nanopartículas de TiO₂

Para sintetizar las nanopartículas experimentales de dióxido de titanio (TiO₂) que se utilizaron para la nanodispersión de HOCl para los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana y de citotoxicidad se optó por realizar el método sol-gel ya que se podría obtener una NPs en forma anatasa similares a las NPs comerciales que se utilizarían para comprar, cual tiene mayor eficacia en las pruebas previamente mencionadas. Así que se procedió a colocar en un vaso de precipitado los 60 mL de alcohol etílico absoluto, después se coloca en una plancha de calentamiento con agitación en una temperatura de 120° C por 1 hora, posteriormente se agregan 6mL del precursor de TiCl₄, en el proceso de gelatinización, las especies TiCl absorbieron agua de la atmósfera para formar el precursor Ti(OH)₄, que se polimeriza para convertirse en un polímero inorgánico que se intensificó con el tiempo de gelatinización. Finalmente, el polvo obtenido en la etapa de gelificación, se colocó en la vasija del mortero en donde se calcinó en el horno de mufla de Thermolyne™ una temperatura de 500°C por 1 hora, para eliminar el componente orgánico del precursor y con el mortero se procedió a triturar los granos gruesos del polvo, para obtener las NPs de TiO₂ en forma anatasa, en un tamaño de grano del polvo homogéneo y fino (106).

Dispersión de las nanopartículas dióxido de titanio (TiO₂) en el Ácido Hipocloroso (HOCl)

En la balanza analítica se pesó la cantidad de 25 µg tanto de nanopartículas experimentales, comerciales y posteriormente en un tubo Falcón de 50 mL con la ayuda de la pipeta se colocó 25 mL del ácido hipocloroso de la marca Water COT y ya después se agregó los 25 µg de las nanopartículas en el tubo Falcón con los 25 mL de ácido hipocloroso y posteriormente se colocó el tubo Falcón en la tina de ultrasonido y se sonificó por 1 hora, después se pasó a vortex por 5 minutos hasta

obtener una mezcla homogénea, para evitar la sedimentación de las nanopartículas y obtener una nanodispersión del HOCl con las NPs de TiO_2 tanto experimentales y comerciales en solución stock de 25 μg de NPs de TiO_2 / 25 mL de HOCl véase la figura 9 en donde explica el procedimientos de la dispersión las NPs experimentales y la figura 10 de la dispersión de la nanopartículas comerciales en el HOCl.

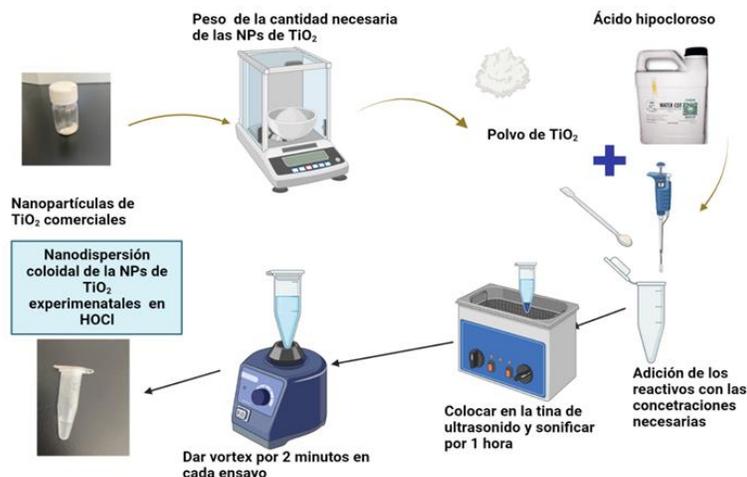


Figura 9. Diagrama de cómo se realizó la nanodispersión de las nanopartículas de TiO_2 experimentales disueltas en el HOCl de la marca Water COT. (Fuente propia- BioRender)

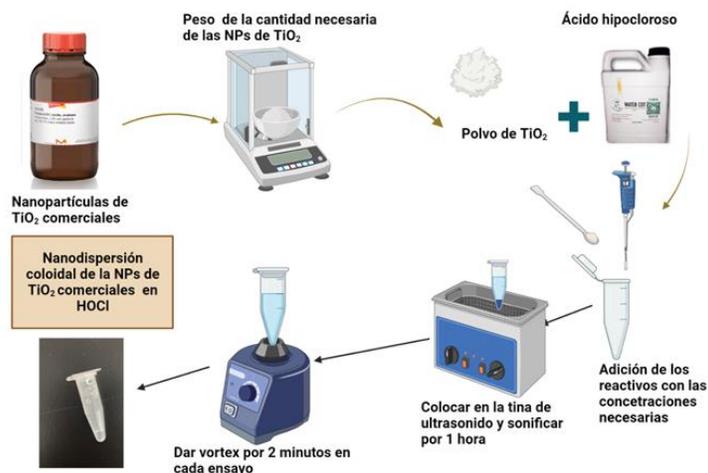


Figura 10. Diagrama de cómo se realizó la nanodispersión con las nanopartículas de TiO_2 comerciales de Sigma -Aldrich disueltas en el HOCl de la marca Water COT. (Fuente propia- BioRender)

Susceptibilidad antimicrobiana y antifúngica

Para la evaluación del efecto antimicrobiano de la nanodispersión de las NPs de TiO_2 en HOCl tanto experimental y comercial se utilizaron los siguientes

microorganismos: *S. mutans*, *Candida albicans*, *S. aureus*, *S mutans* y *E. faecalis* en los siguientes ensayos *in vitro*; difusión en agar, difusión en pozo, microdilución, para la viabilidad bacteriana: reducción metabólica del MTT para el caso de bacterias y XTT fúngico para levaduras.

Ensayo en agar por el método de difusión.(107)

Se realizaron agares Mueller Hinton™ (Becton Dickinson, Cuamatla, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México) para cultivo bacteriano de *S. mutans*, y de *S. aureus*, en el caso del *E. faecalis* se usó agar Enterococcus Selective Agar (Sigma – Aldrich *Saint Louis, MO US*), para la levadura de *C. albicans* se usó Agar Dextrosa Sabouraud Oxoid™ (Becton Dickinson, Cuamatla, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México) se pusieron 20 mL de agar en las placa de Petri de 10 cm. Posteriormente se tomó un inóculo de cada microorganismo antes mencionado y se incubó por 24 horas a 37°C, véase la figura 11 que explica la manera en la cual se siembra la bacteria para un cultivo joven.

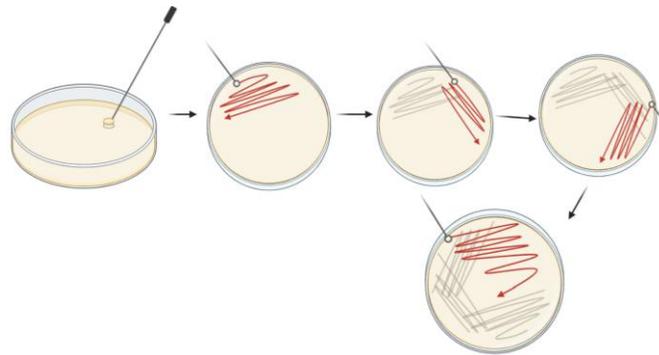


Figura 11. Proceso de cómo realizar un cultivo joven, en donde se muestra la manera en la cual se siembra la bacteria alrededor del plato de agar. (Fuente propia- BioRender)

Se preparó una solución de trabajo utilizando solución salina isotónica al 0.85 % de NaCl estéril en la cual se suspendieron un aproximado de 3- 5 colonias de microorganismos de 1mm de diámetro, posteriormente se ajustó la dilución al patron de turbidez de 0.5 de la escala estándar de McFarland (equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL). Una vez ajustada la solución de trabajo se colocaron 90 μ L y con

ayuda de un hisopo estéril se realizó un sembrado de una manera homogénea en las cuatro direcciones con la técnica de estriado.

En la prueba por el método de difusión de agar se analizaron a los siguientes microorganismos *C. albicans*, *S. aureus* y *S. mutans* así que un en los platos con agar Mueller Hinton™ (Becton Dickinson, Cuamatla, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México) y Sabouraud Dextrosa Oxoid™ (Becton Dickinson de México, Cuamatla, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México) se colocó la nanodispersión de las NPs de TiO₂ en ácido hipocloroso de 1000 ppm en las siguientes dosis que fueron de 50, 25, 12.5 µg/mL de los 3 grupos controles respectivamente, usando como control positivo clorhexidina y como control negativo agua bidestilada estéril, en donde se colocaron los discos de papel filtro en contacto con en el agar y de igual manera con los microorganismos e incubados por 24 horas véase la figura 24 que representa la caja Petri que explica la forma en la cual se colocó los discos de papel en su concentraciones como también los controles negativos y positivos.

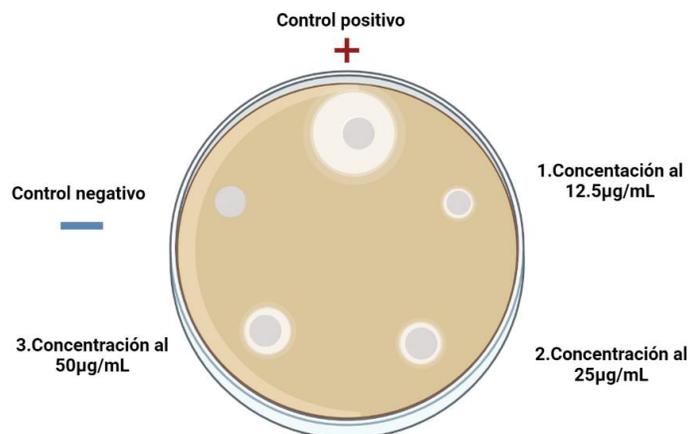


Figura 12. Representa en la forma en la cual se acomodó alrededor de la caja los discos de papel estériles con las concentraciones de la nanodispersión como el control negativo con agua estéril y el control positivo de clorhexidina. (Fuente propia- BioRender)

El efecto antimicrobiano se evaluó midiendo el diámetro de las zonas de inhibición producido por la nanodispersión véase la figura 12 que muestra los pasos simplificados de la prueba de agar por el método de difusión.

Ensayo en agar por el método en pozo

Para el ensayo de difusión son los mismo pasos solo cambia en los siguiente: que en un plato con agar Mueller Hinton (Becton Dickinson de México, Cuamatla, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México) y Sabouraud Dextrosa (Becton Dickinson de México, Cuamatla, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México) se realizaron cortes circulares en el agar para la formación de pozos y se colocó en la dosis de 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ de la 1000 ppm de la nanodispersión, clorhexidina (control positivo) y agua bidestilada (control negativo) para *S. aureus*, *S. mutans* y *C. albicans*, los platos fueron incubados por 24 horas, véase la figura 13 la cual representa como se colocaron los pozo en la caja Petri para evaluar el efecto antimicrobiano.

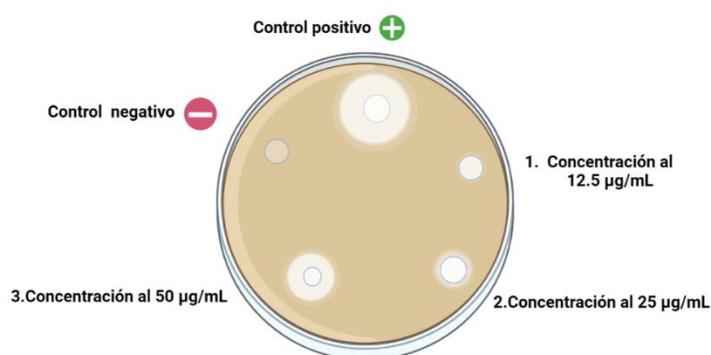


Figura 13. Representación de la caja Petri de la colocación de los pozos en los controles tanto positivo (clorhexidina) y negativo (agua estéril) como las concentraciones que se analizaron de la nanodispersión. (Fuente propia -BioRender)

Ensayo de microdilución.(107)

Para conseguir los datos de susceptibilidad y determinar la concentración mínima inhibitoria de las distintas concentraciones a valorar de la nanodispersión, se optó por hacer los ensayos de microdilución en las microplacas de 96 pozos por triplicado por cada cepa bacteriana a evaluar.

Primero se empleó agar Mueller Hinton (Becton Dickinson, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México) para hacer cultivo bacteriano y para levaduras se usó agar Dextrosa Sabouraud (Becton Dickinson, Cuautitlán Izcalli, Estado de México,

México) para cultivo fúngico, en el caso de *E. faecalis* se usó agar Enterococcus Selective Agar (Sigma – Aldrich Saint Louis, MO US). Se agregaron 20 mL del agar correspondiente a la cepa bacteriana a evaluar dentro de las placas Petri de 6 cm para obtener cultivo joven de cada cepa.

Se elaboraron 1000 mL de caldo de agar mueller Hinton Broth (Sigma – Aldrich Saint Louis, MO US), luego se agregó 15 mL de medio MHB en un tubo falcón de 50 mL con el asa se tomó de 3 a 5 colonias bacterianas de *S. aureus*, *S. mutans* y *E. Faecalis* del cultivo joven de cada bacteria. El tubo falcón con bacteria se colocó en agitación por la noche, en incubación a una temperatura constante de 37 °C (*overnight de 16 a 18 horas*), posteriormente en un tubo falcón de 50 mL, se agregó 7 mL de caldo de agar Mueller Hinton Broth y se colocó aproximadamente 750 µL del *overnight* para preparar un inóculo estandarizado a 0.5 de la escala McFarland de cada bacteria. Después se preparó la solución de trabajo, colocando en un tubo falcón estéril 15 mL de medio correspondiente a cada microorganismo y se añadió 15 µL del inóculo previamente ajustado (dilución 1:1000), para obtener una solución final de trabajo de 1×10^4 UFC/mL.

Posteriormente se efectuó un stock de la dispersión con 25 µg de NPs de TiO₂ tanto experimental, comercial y 25 mL de HOCl con el cual se realizó las nanodispersiones, en las siguientes concentraciones para evaluar su efecto antimicrobiano que fueron al 100µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12.5 µg/ml 6,25 µg/ml en el ensayo de microdilución.

En una microplaca de 96 pozos se colocó la solución stock en las distintas concentraciones (100µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12.5 µg/ml 6,25 µg/ml), se agregaron 100 µL de la bacteria previamente ajustada en cada pocillo. Se colocaron controles positivos y negativos, el HOCl sin nanopartículas se utilizó como blanco colocándolo con 100 µL de solución de trabajo. Las microplacas de 96 pozos con las diluciones a evaluar se colocaron en la incubadora a una temperatura de 37°C durante 24 horas como en agitación.

Ensayo de MTT bacteriano

Después de las 24 horas de incubación de los ensayos de microdilución a evaluar de cada una de las cepas bacterianas, se preparó el MTT bacteriano por lo cual en la balanza analítica se pesó 0.0020g de bromuro de tetrazolio (Sigma -Aldrich, Saint Louis, MO US), posterior a esto se utilizó 10 ml de caldo Mueller Hilton el cual se agregó dentro de un tubo falcón de 15 ml en la campana de bacterias y ahí mismo se añadió el bromuro de tetrazolio, después se colocó en agitación por 15 a 20 segundos hasta que esté homogénea. Se removió el medio con el Aspirador de laboratorio Accuris ASPIRE™ (Accuris Instruments, Edison, New Jersey, USA) y se agregaron 100 μ L del MTT bacteriano preparado en cada pozo de la placa, se incubó por 3 horas a una temperatura de 37 °C. Posteriormente se retiró el MTT y se colocaron 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) y se dejó en incubación por 2 horas pasando el periodo se efectuó la mediciones de la absorbancia de cada una la cepas evaluadas en el espectrofotómetro de UV-Visible a una longitud de onda de 570 nm correspondiente a *S. aureus*, en 550 nm respectivos a *S. mutans* y *E. faecalis*, véase la figura 24 en donde se observan los pasos que se llevan a cabo para el ensayo de MTT bacteriano véase la figura 14 que representa los procedimientos del ensayo del MTT bacteriano para determinar la actividad bacteriana.

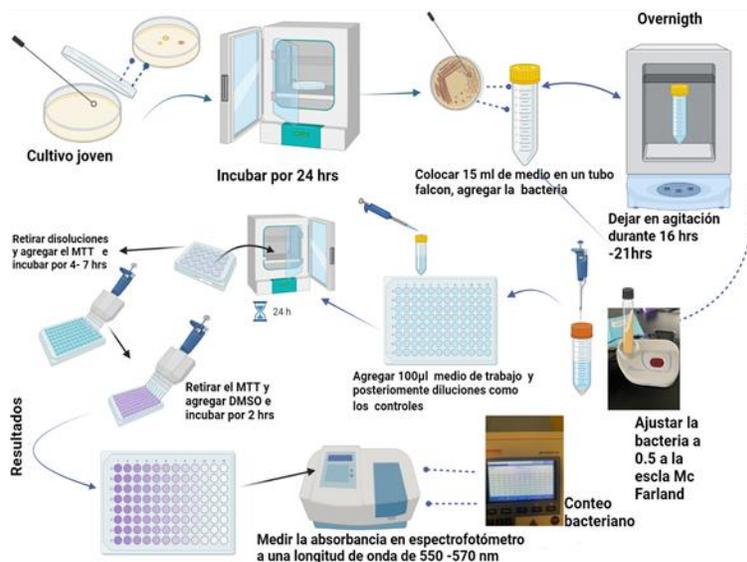


Figura 14. Diagrama del procedimiento del ensayo de MTT bacteriano el cual se utiliza para determinar la actividad antimicrobiana de la nanodispersión de las NPs de TiO₂ con el HOCl en la cepa de *S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis* en una placa de 96 pocillos. (Fuente propia -BioRender)

Microdilución fúngica.(107)

Para obtener los datos de susceptibilidad antifúngica y como determinar la concentración mínima inhibitoria de las diferentes concentraciones de la nanodispersión se optó por hacer un ensayo de microdilución en microplacas 96 pozos, realizar un triplicado para evaluar *C. albicans*.

Se hizo agar Dextrosa Sabouraud (Becton Dickinson de México, Cuamatla, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México) para cultivo fúngico de *C. albicans*, el cual se obtiene agregaron 20 mL de agar en placas de Petri pequeñas.

El siguiente paso fue elaborar 1 litro de RPMI Medium 1640 (Gibco® *Grand Island, New York, USA*), el cual se ajustó el pH a una escala neutra con ayuda del potenciómetro, posteriormente se filtró con el Filtro Millipore (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Después se colocaron 15 mL de RPMI Medium 1640 en tubos falcón de 50 ml agregando de 3 a 6 colonia de la levadura. Posteriormente se colocó el tubo con bacterias en agitación por la noche, transcurrido el tiempo en un tubo de densitómetro se añadió 7 mL de RPMI Medium 1640, se comprobó que el densitómetro marcará 0, se agregó aproximadamente 650 µL de Overnight de la cepa de *C. albicans*, el cual se adaptó a una escala de 0.5 McFarland. Luego de haber ajustado la densidad en otro tubo falcón de 50 mL colocamos 30 mL de RPMI Medium 1640, agregamos 30 µL del hongo previamente ajustado.

Previamente se realizó un stock compuesto por 25 µg de NPs de TiO₂ tanto experimental, comercial y 25 mL de HOCl con el cual se realizó las nanodispersiones, en las siguientes concentraciones para evaluar su efecto antimicrobiano que fueron al (100µg/ml,75 µg/ml,50 µg/ml, 25 µg/ml, 12.5 µg/ml 6,25 µg/ml), en la prueba de microdilución.

En las microplacas de 96 pozos se colocó la solución stock con la ayuda de la pipeta en sus distintas concentraciones (100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 6.25 µg/ml y con sus respectivos controles), se agregaron 100 µL de la levadura previamente ajustada en cada pocillo. Se colocaron controles positivos y negativos, el HOCl sin nanopartículas que fueron probadas en 100 µL del medio de trabajo, en el ensayo se realizó triplicado del experimento en donde cada uno se colocó en la incubadora a una temperatura de 37°C durante 24 horas y en agitación.

Ensayo de XTT antifúngico

Después de 24 horas de incubación del ensayo de microdilución, se preparó el XTT de Sigma-Aldrich (*Saint Louis, MO US*), se pesó en la balanza analítica 0.01 gr y posteriormente se agregaron 25 µL de PBS, nuevamente en la balanza analítica se pesó un total de 0.0001 gr de Phenazine methosulfate (PMS, Sigma -Aldrich, *Saint Louis, MO US*) ya por último se utilizó 10 mL RPMI Medium 1640 (Gibco® *Grand Island, New York, USA*) el cual se agregó dentro de un tubo falcón de 15 mL en la campana de levaduras y ahí mismo se añadió tanto el XTT, PBS como el PMS y el cual se agito en el por 20 segundos hasta que la solución sea homogénea. Se removió el medio con el Aspirador de laboratorio Accuris ASPIRE™ (Accuris Instruments, Edison, *New Jersey, USA*) y se agregan 100 µL de la solución de XTT en cada pocillo, la microplaca se incubó por 3 horas a una temperatura de 37 °C. Después de tiempo se llevó a cabo la medición de la absorbancia en el espectrofotómetro de UV-Visible a una longitud de onda en 510 nm para *C. albicans*.

Ensayo de citotoxicidad de la nanodispersión de NPs TiO₂ comercial vs experimental en HOCl

Se realizó el ensayo de citotoxicidad utilizando cultivo de (SCAPs) del laboratorio de investigación interdisciplinarias de la Escuela Nacional de Estudios Superiores de la Unidad León, UNAM subcultivadas en una placa 96 pocillos donde se inocularon la NPs de TiO₂ para cuantificar la viabilidad celular, mediante ensayo biológico de MTT después de 24 horas de contacto.

Subcultivo de SCAPs

Se utilizaron subcultivo de células troncales de la papila apical dental de humanos (SCAPs, del inglés *Stem cells from the apical papilla*), de un plato de cultivo en una densidad de 8×10^5 para esto se corroboró mediante el microscopio óptico (LEICA DM IL LED, Wetzlar, Germany) hasta que las células SCAPs presentará una confluencia mayor del 80%. Posteriormente se retiró el medio de cultivo del plato de 3 cm y se lavó en tres ocasiones con solución buffer de fosfato PBS para agregar 0.5 mL, EDTA-2Na al 0,05 % (Sigma-Aldrich) y se incubó por 5 minutos a una temperatura de 37°C , 95 % de humedad y al 5% de CO_2 , se realizó el pase celular a un nuevo plato de cultivo, agregando 2 mL Medio de cultivo para células DMEM (Minimum Essential Medium Eagle) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% antibiótico penicilina-estreptomicina y 1% de glutamina (Sigma-Aldrich, Sain Louis, MO, USA) para luego pipetear para inactivar la tripsina, lograr el volumen deseado, desprender las SCAPs e disgregarse, luego comprobar en el microscopio el desprendimientos de la células, con una pipeta se colocan 100 microlitros del medio que contiene las células, en la placa de 96 pocillos y se esperó a 24 horas para que el cultivo esté bien establecido y poder inocular la NPs TiO_2 véase la figura 15 sobre cómo realizar el subcultivo celular de SCAPs.

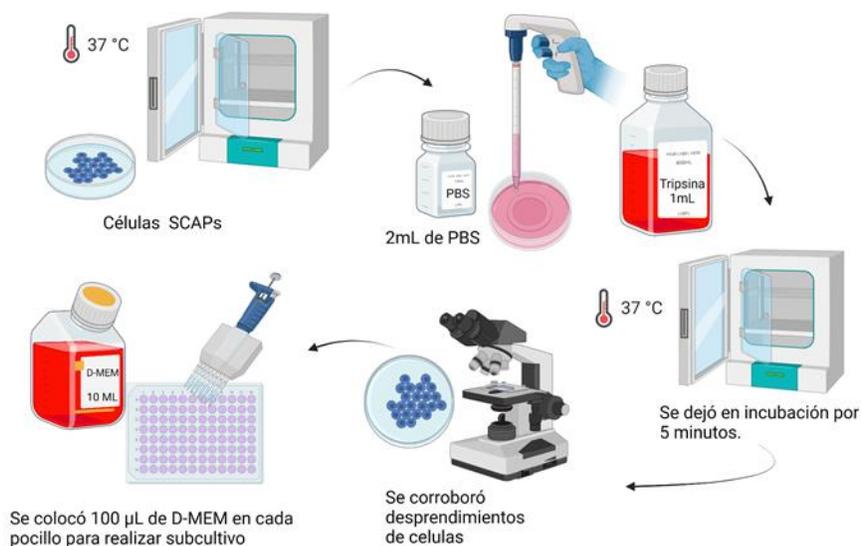


Figura 15. Esquema de cómo se realizó el subcultivo celular de SCAPs para el ensayo de citotoxicidad. (Fuente propia-BioRender)

Inoculación NPs de TiO₂ en SCAPs

Se colocaron 100 µL de medio fresco en el cultivo celular de las microplacas de 96 pocillos, posteriormente se realizó una microdilución seriada en donde se colocó los 100 µL en cada una de las concentraciones de la nanodispersión que se analizaron: 0.5.,1,5,10,20,30,40,50,100 µg/mL, en seguida, se agregó el control positivo y el HOCl sin nanopartículas, el cual fue incubado a una temperatura de 37°C con el 5 % de CO₂ y con 95 % humedad relativa por 24 horas véase la figura que representa la manera en la cual se acomodó la placa de 96 pocillos.

Ensayo de citotoxicidad con MTT

Pasando el tiempo indicado se determinó el número relativo de las células viables por medio del ensayo de MTT [“0.2 mg/mL,”- bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazolio]. Se colocó 10 mL de medio de cultivo en un tubo falcón de 15 mL, después se midió en la báscula analítica el MTT a una cantidad de 0.0020g, el cual se agrega en el tubo falcón con el medio de cultivo, que después se colocó en agitación durante 5 minutos. Las muestras de la nanodispersión, el HOCl como el control positivo se retiraron y se agregaron 100µL de (0.2 mg/mL) de solución MTT a cada pocillo. Se incubaron por 3 horas a una temperatura de 37° C con el 5 % de CO₂ y al 95 % humedad relativa. Terminando la 3 hora se removió y agregaron los 100 µL del disolvente (dimetilsulfóxido; DMSO) para ser analizado en el espectrofotómetro de UV-Vis a una longitud de onda de 570 nm véase la figura 16 del proceso del ensayo de MTT para evaluar la citotoxicidad.

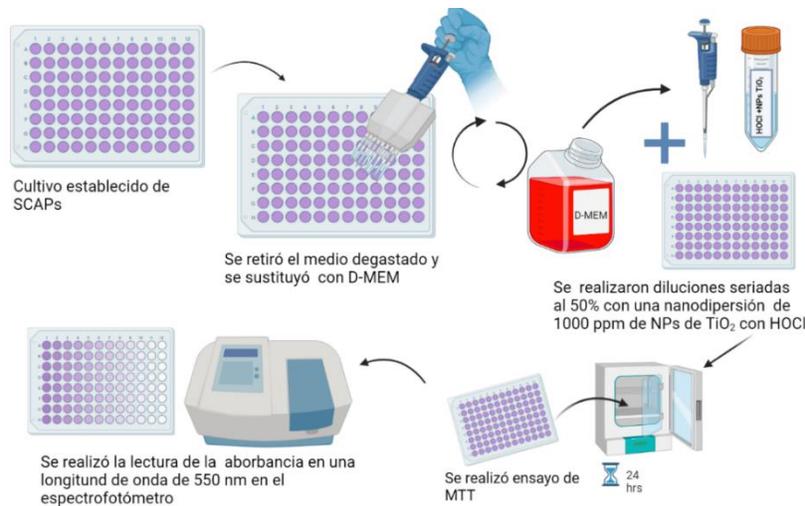


Figura 16. Esquema del ensayo de citotoxicidad este se realizó para determinar el efecto citotóxico (n= 24), se realizó un subcultivo celular de SCAPs y se inoculó la nanodispersión de las NPs TiO₂ experimentales y comerciales con HOCl en concentraciones de [0.5-100µg/mL] mediante una dilución seriada por 24 hrs a 37°C, 95 % de humedad y 5% de CO₂ y este se evaluó según norma ISO 10993-5. (Fuente propia-BioRender).

Implicaciones éticas

En el presente trabajo de investigación no se presentó la evaluación ante el comité de bioética, debido que los experimentos involucraron no involucraron a pacientes, sino que meramente fueron un experimento *in-vitro* desarrollado en los laboratorios de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad León (UNAM) específicamente en el departamento de Investigación Interdisciplinaria (LII) en el área de Nanoestructuras & Biomateriales.

Análisis estadístico y representación de datos

Los experimentos se realizaron por triplicado en 3 experimentos independientes (n=9). Se calcularon los resultados por medio de porcentajes, promedio y desviación estándar. Los datos que obtuvieron se analizaron con el software SPSS (Statistical Packegen for Social Science) del año 2016 versión 29.0 con las siguientes pruebas de normalidad Shapiro-Wilks y pruebas de ANOVA, pos Hoc de Tukey y se graficaron con el software de OriginPro del año 2018 (64-bit) SR1 versión b9.5.1.195.

Se determino una significancia estadística con valor de $p < 0.05$.

CAPÍTULO 5

Resultados

Espectrofotometría de UV-Vis

El análisis de UV-Vis es una técnica ampliamente utilizada ya que proporciona una evaluación no invasiva y rápida en tiempo real del tamaño, la concentración y el estado de agregación de las NPs o nanomaterial debido que su proceso es fácil y económico con una preparación mínima de la muestra, su uso es amplio puesto que evalúa las características de las NPs o nanomateriales, como el tamaño, el estado de agregación y el índice de refracción mediante una simple medición de absorción. En el presente experimento el análisis de UV-Vis se usó para evaluar la caracterización de la nanodispersión de NPs de TiO_2 comerciales, experimentales en HOCl como de igual manera de las NPs de TiO_2 tanto experimentales y comerciales véase la figura 17.

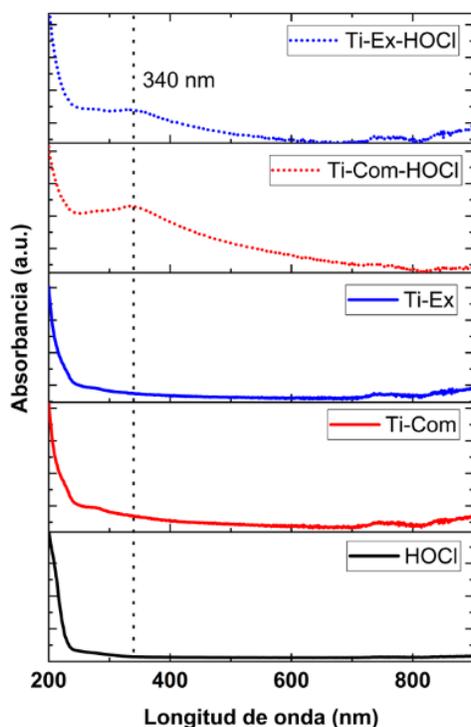


Figura 17. En la imagen se muestra la caracterización óptica del HOCl, de las nanopartículas de TiO_2 tanto experimental y comercial, como también la caracterización de nuestra nanodispersión de HOCl con nanopartículas de TiO_2 experimental y comercial, en donde el HOCl y las NPs de TiO_2 tiene una absorbancia en la región visible completa, pero al agregar el HOCl a las NPs forma un pico a los 340 nm de ion hipoclorito (ClO^-), que confirma la formación de la nanodispersión.

Caracterización estructural

Para la realización estructural se realizó en el microscopio electrónica de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy) donde se utiliza un haz de electrones con alta energía que genera una variedad de señales dentro de la superficie de toda la muestras sólida que se desea analizar, en la cual la señales se van a derivar de las interacciones muestra-electrón que representa la información sobre la muestra que incluye desde su morfología externa como la composición química, su estructura cristalina y la orientación de los materiales que componen la muestra véase la figura 18 que representa imágenes detalladas de las superficies de las nanopartículas experimentales y comerciales por medio de la microscopia electrónica de barrido.

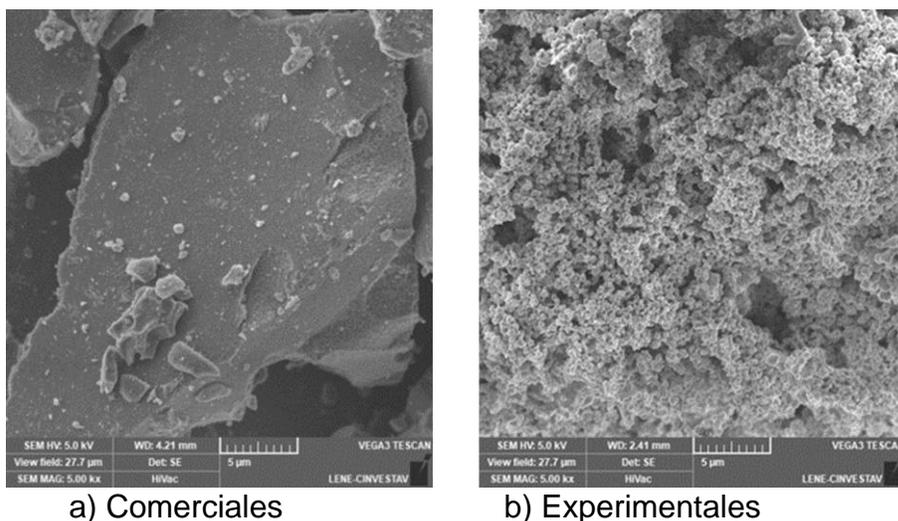


Figura 18. Imágenes detalladas de las superficies de las nanopartículas en donde la en la figura a) Comerciales que tienen un tamaño de 25 nm, pero con agregación. b) Experimentales que tiene un tamaño de 15 nm con agregación de una forma esférica.

Susceptibilidad antibacteriana y antifúngica

Resultado antimicrobiano de las pruebas de difusión en agar

Se analizó el efecto antimicrobiano por medio del método de difusión en agar con los discos de papel filtro que contienen las concentraciones de la nanodispersión de HOCl con las NPs de TiO₂ experimentales y comerciales en contacto con las cepas que se analizaron de *S. mutans*, *S. aureus* como *C. albicans* por 24 horas, después de tiempo transcurrido en la incubadora no se observó ningún halo de inhibición en las concentraciones de la nanodispersión de las NPs de TiO₂

experimental, comercial con HOCl frente a los microorganismos antes mencionados como se puede apreciar en la figuras 19 y 20 donde se pueden observar los agares de cada una de la cepas evaluadas en el experimento.

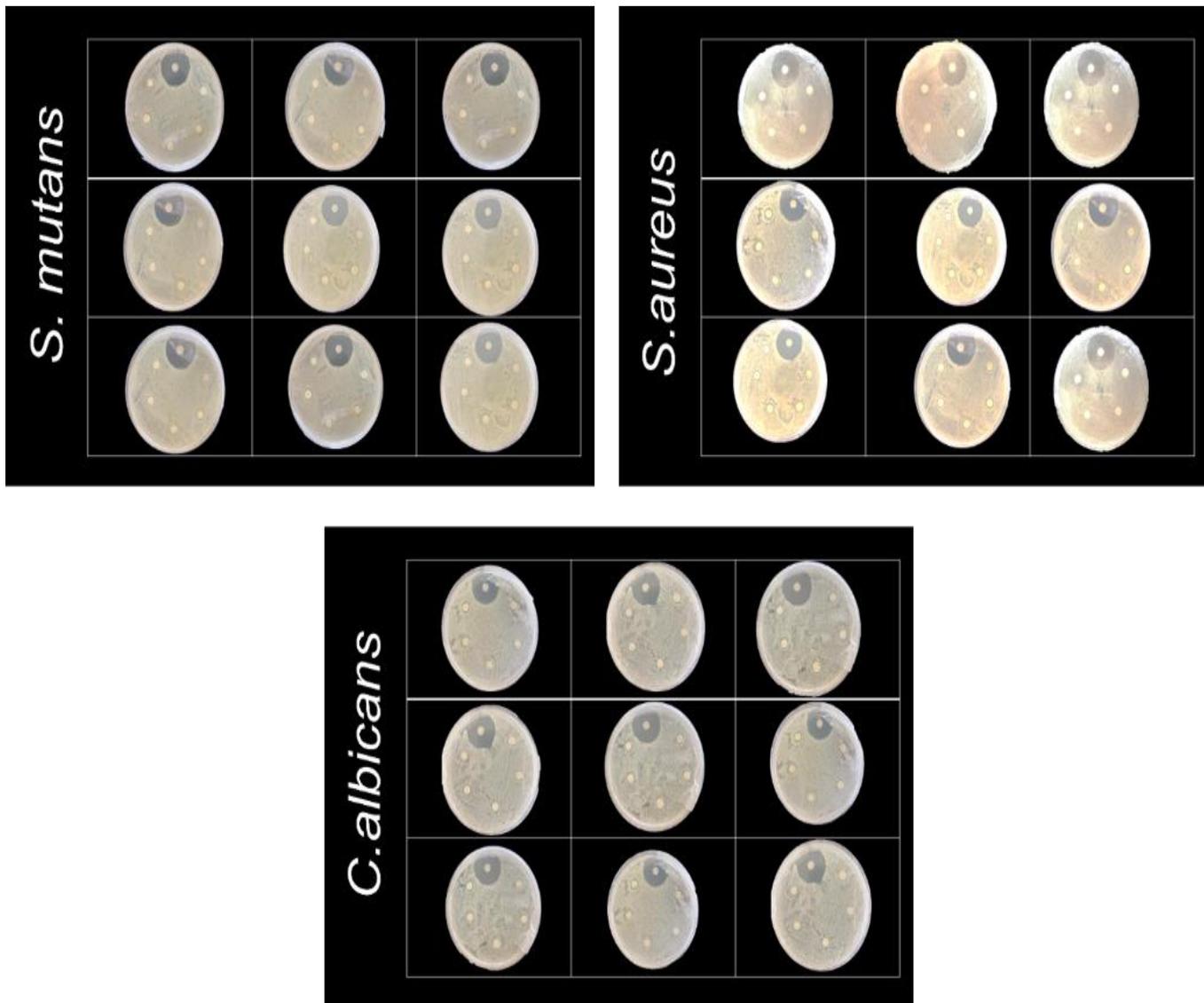


Figura19. Se observa el ensayo por el método de difusión en agar que demuestra la actividad antimicrobiana de la nanodispersión experimental en la cepa de *S. mutans*, *S. aureus* y *C. albicans*. (Fuente directa)

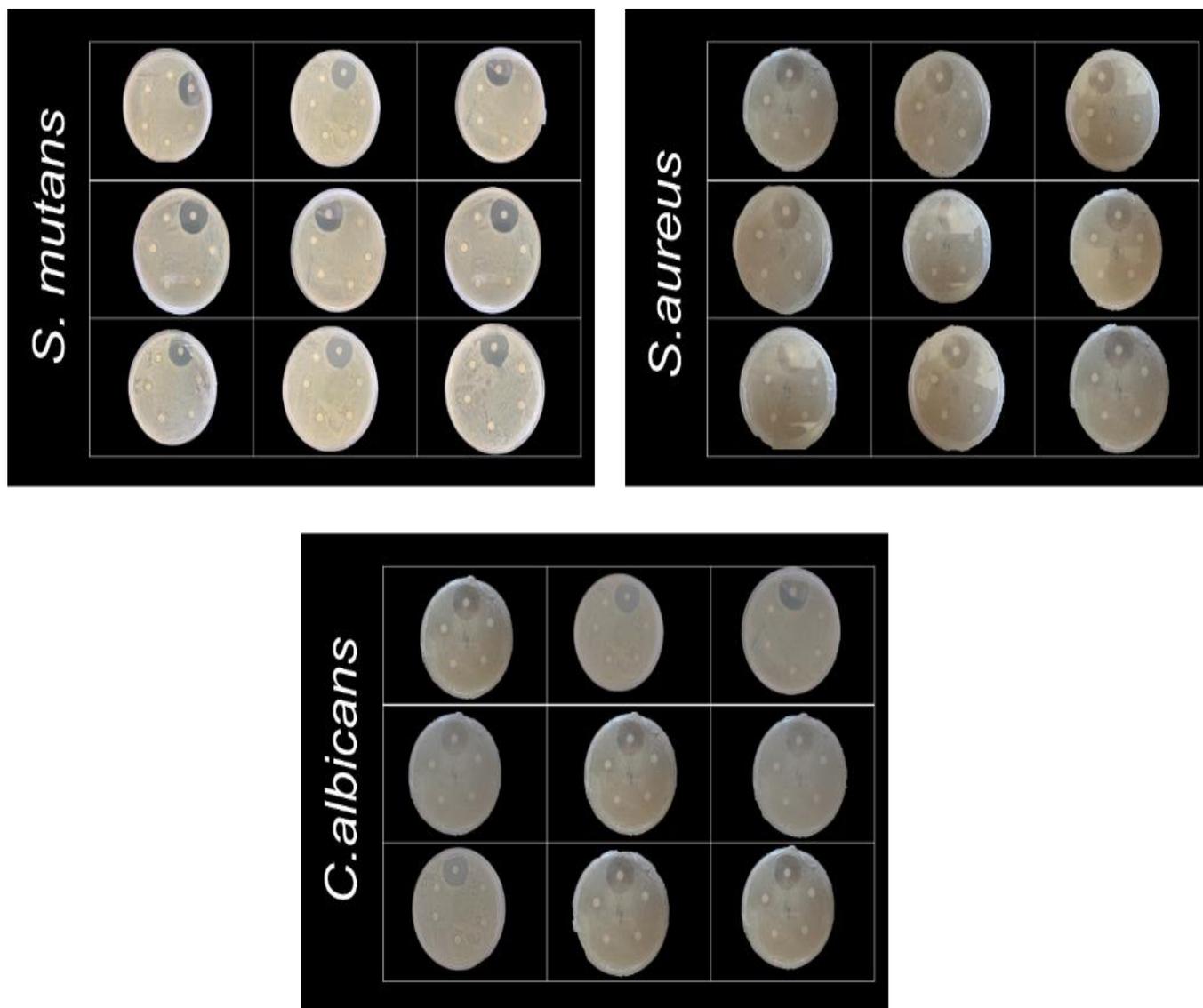


Figura 20. Ensayo de difusión agar en la cepa de *S. mutans*, *S. aureus* y *C. albicans*, en donde se observa la actividad antimicrobiana de la nanodispersión de ácido hipocloroso con NPs de TiO_2 comerciales.

Resultados antimicrobianos del método de difusión en pozo

En el ensayo de difusión en pozo es otra forma para observar la actividad antimicrobiana de la nanodispersión a evaluar en contacto con las cepas de *S. mutans*, *S. aureus* y *C. albicans* en donde se incubaron los agares por 24 horas pero no se observó ningún halo de inhibición véase la figura 21 y 22, en la primera se muestra los resultados de la prueba difusión en pozo con la nanodispersión experimental evaluada con sus correspondiente triplicado de cada microorganismo

evaluado pero en ninguna se observó un halo de inhibición y la segunda figura muestra la nanodispersión comercial pero de igual manera no se observó ningún un halo de inhibición contra los mismo microorganismo en triplicado en los resultados obtenidos.

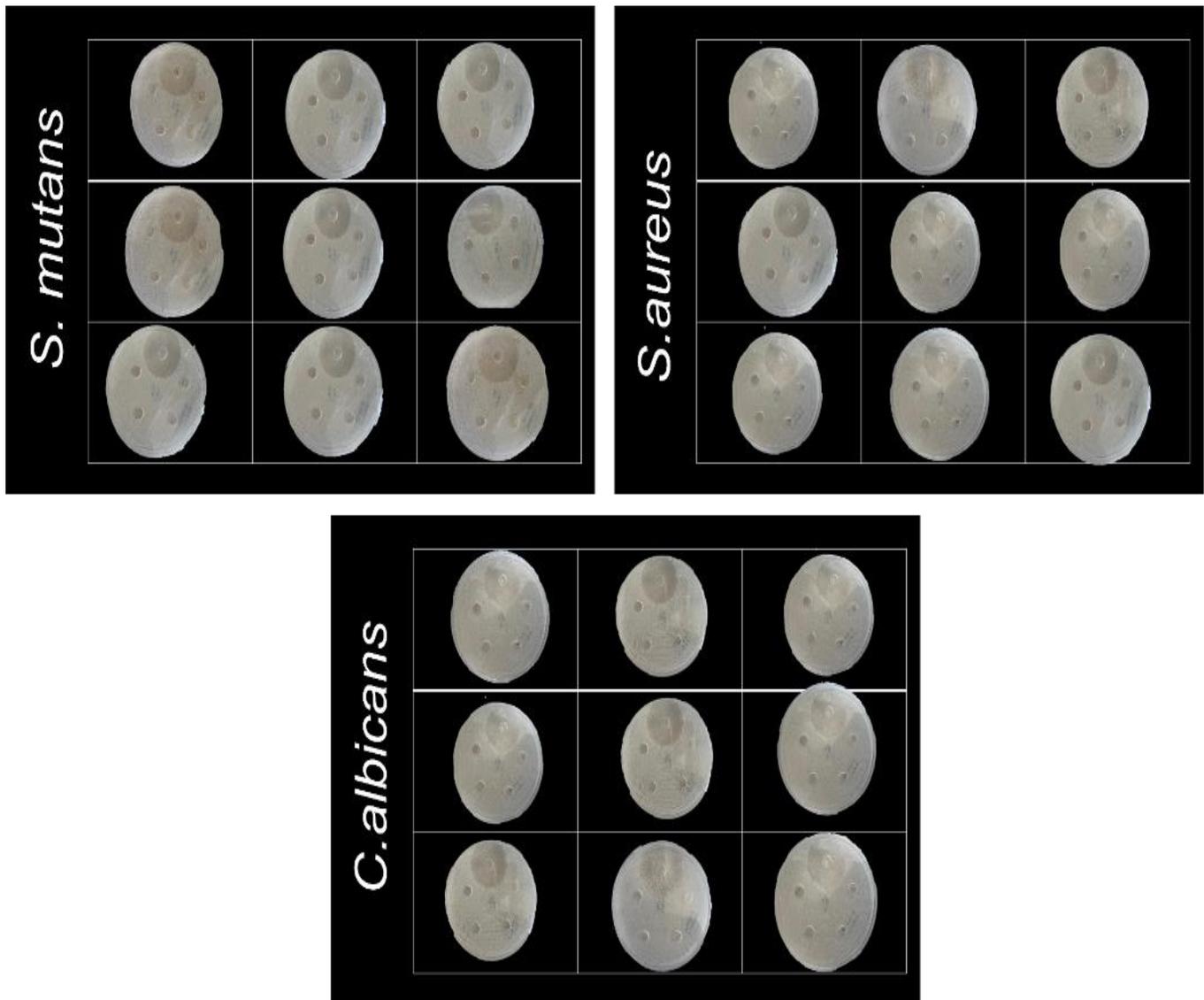


Figura 21. Ensayo antimicrobiano en agar por el método en pozo que indica la actividad antimicrobiana de la nanodispersión experimental en la cepa de *S. mutans*, *S. aureus* y *C. albicans*. (Fuente directa)

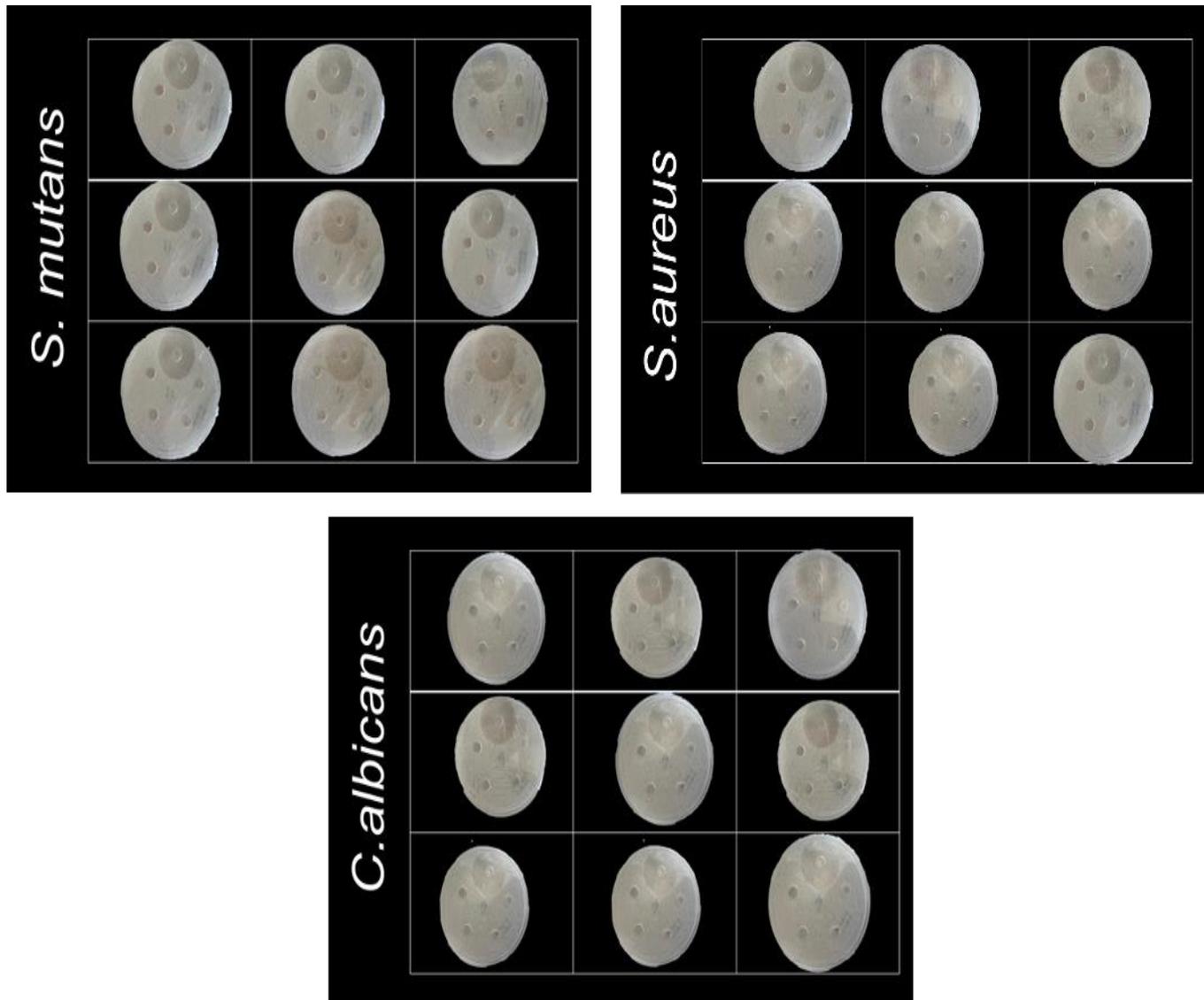


Figura 22. Ensayo de la actividad antimicrobiana de la nanodispersión de ácido hipocloroso con NPs de TiO_2 comerciales por el método de difusión agar en las cepas de *S. mutans*, *S. aureus* y *C. albicans*.

Resultado antimicrobiano por la cuantificación de la viabilidad bacteriana por medio del ensayo MTT

En el ensayo que se realizó de MTT por un periodo de 24 horas se verificó la existencia de las bacterias activas metabólicamente, después se procedió a realizar las lecturas con base al protocolo del fabricante y en base a la evidencia científica con una densidad óptica para de 570 nm para *S. aureus* y en 550 nm para *S.*

mutans y *E. faecalis* se leyó en una lectura de 550 nm con triplicado, obteniendo los siguientes resultados que observan en la figura 23 se representan los resultados de *S. mutans* en porcentaje representado en gráficas de barra de error, como en la figura 24 y 25 se observan los resultados *S. aureus* y finalmente de *E. faecalis* ambos en porcentaje y representados en grafica de barra de error en los tres resultados obtenidos durante el ensayo se puede observar la significancia entre la nanodispersión de la NPs de TiO₂ experimental vs las NPs de TiO₂ comercial.

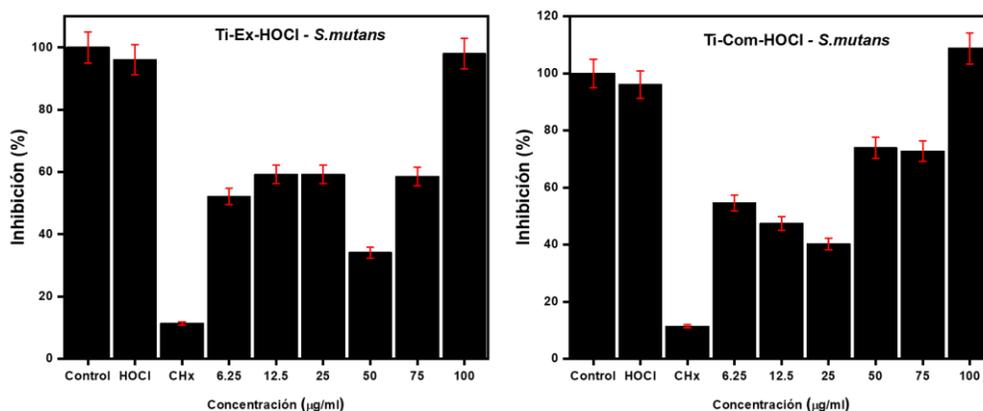


Figura 23. Resultados de las pruebas antimicrobianas de *S. mutans* con las NPs de TiO₂ comerciales y experimentales.

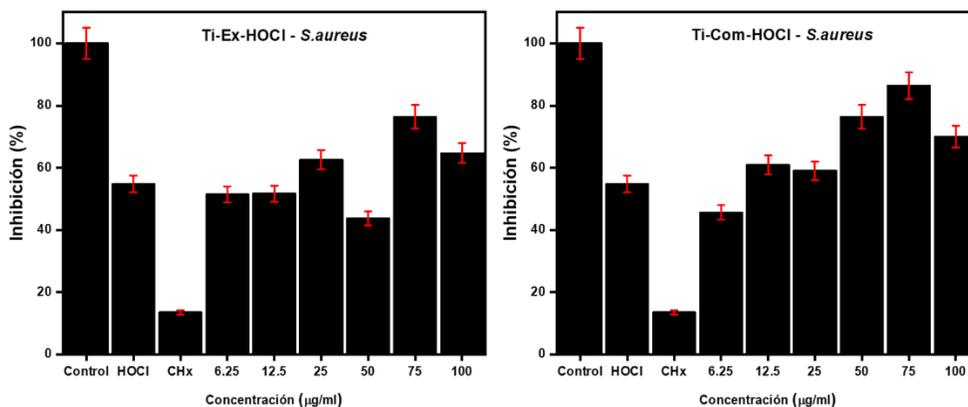


Figura 24. Resultados de las pruebas antimicrobianas de *S. aureus* con las NPs de TiO₂ comerciales y experimentales.

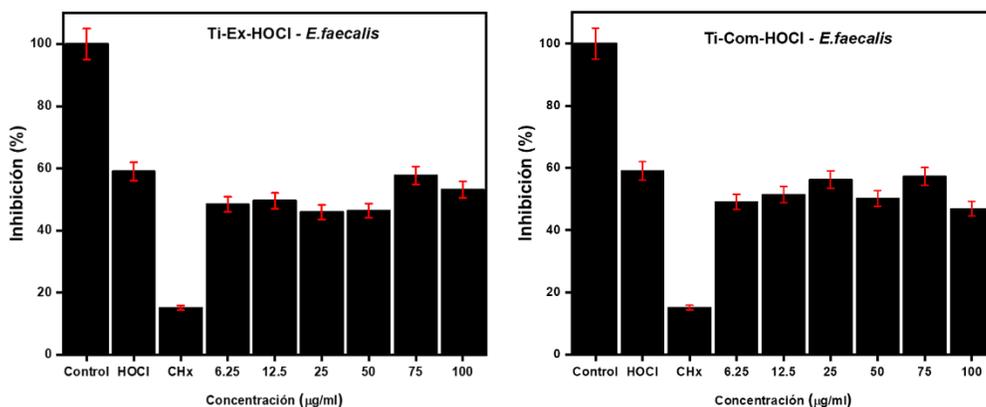


Figura 25. Resultados de las pruebas antimicrobianas de *E. faecalis* con las NPs de TiO₂ comerciales y experimentales.

Resultado antifúngico por la cuantificación de la viabilidad fúngica por medio del ensayo XTT

La prueba de XTT se realizó por un periodo de 24 horas para determinar si existen bacterias activas metabólicamente después de terminar el experimento. Las lecturas se realizaron con base a los establecido por el fabricante y en base a la evidencia, con una densidad óptica para de 510 nm para la cepa de *C. albicans* con triplicado, véase la figura 26 donde se observan los resultados del ensayo por XTT con la cepa de *C. albicans* en porcentaje representado en gráficas de barra de error, véase la tabla 5 que se muestra el análisis estadísticos del efecto antimicrobianos de cada microorganismos entre los grupos de TiO₂ experimental y comercial con HOCl .

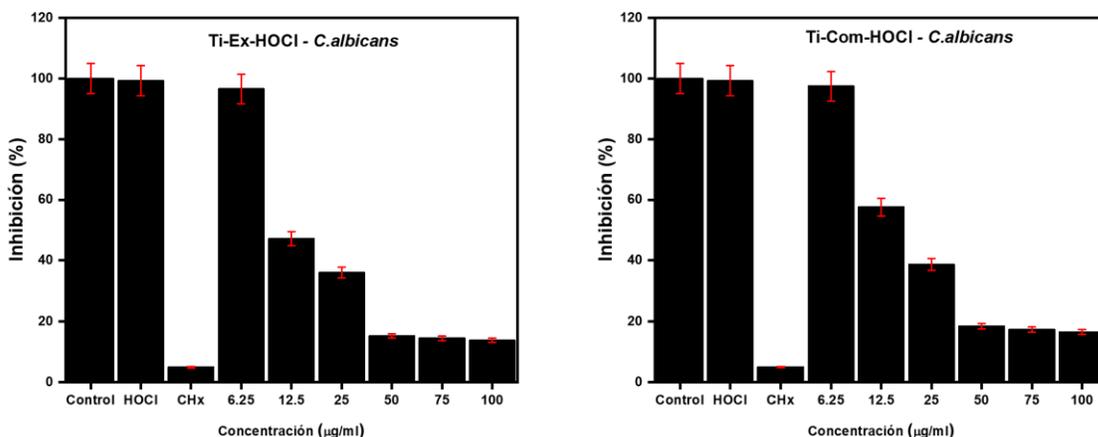


Figura 26. Resultados de pruebas antimicrobianas de *C. albicans* con las NPs TiO₂ comerciales y experimentales

Tabla 5. Análisis estadísticos del efecto antimicrobianos para cada microorganismo evaluado entre los grupos de TiO₂ Experimental y Comercial con HOCl.

Inhibición de *C. albicans* (%)

Dose (%)	Grupos	Nps TiO2 exp	Nps TiO2 com
100		13±2.5	16.53±3.5*
75		14±1.4	17±4.5*
50		15±2.9	18±3.9
25		35±9.8	38±7.06
12.5		47±10.07	57±12.1
6.25		96±7.5**	97±8.6

Diferencia significativa intragrupo p<0,05* p<0,001**, Diferencia significativa entre grupos p<0,05 + p<0,01 ++, pos Hoc Tukey 0,05, IC 95%.

Inhibición de *S. mutans*(%)

Dosis (%)	Grupos	Nps TiO2 exp	Nps TiO2 com
100		78±14.4	98±41.3
75		53±17.9	66±11.9
50		30±16.8	67±27.9
25		32±12.5	36±12.6
12.5		53±24	43±8.42
6.25		47±3.6	49±18.1

Diferencia significativa intragrupo p<0,05* p<0,001**, Diferencia significativa entre grupos p<0,05 + p<0,01 ++, pos Hoc Tukey 0,05, IC 95%.

Inhibición de *E.fecalis*(%)

Dosis (%)	Grupos	Nps TiO2 exp	Nps TiO2 com
100		53±8.12+	46±15.2
75		57.71±10.14+	57±20.4
50		46±13.6+	50±7.7
25		45±9.9	56±11.8
12.5		49±5.2	51±9.5
6.25		48±3.2	49±3.4

Diferencia significativa intragrupo $p < 0,05$ * $p < 0,001$ ** , Diferencia significativa entre grupos $p < 0,05$ + $p < 0,01$ ++, pos Hoc Tukey 0,05, IC 95%.

Inhibición de *S.aureus* (%)

Dosis (%)	Grupos	Nps TiO2 exp	Nps TiO2 com
100		64±15.07	70±25.2
75		76±9.6	86±14.06
50		43±21.4	76±16.1
25		62±10.4	59±18.7
12.5		51±10.9	60±10.4
6.25		51±11.6	45±14.2

Diferencia significativa intragrupo $p < 0,05$ * $p < 0,001$ ** , Diferencia significativa entre grupos $p < 0,05$ + $p < 0,01$ ++, pos Hoc Tukey 0,05, IC 95%.

Ensayo de citotoxicidad

Se evaluó el ensayo de citotoxicidad de las nanodispersiones mediante la prueba de MTT siguiendo el protocolo establecido en donde su uso una línea celular de SCAPs en el experimento se observó un aumento de las células siendo superiores al control positivo, en un rango de tiempo de las 24 horas en las bajas concentraciones de 0.5-10 $\mu\text{g/ml}$ evaluadas, pero al aumentar la concentración se observa que son ligeramente citotóxico en un rango de 20- 100 $\mu\text{g/mL}$ tanto la nanodispersión experimental y comercial esto con los estipulado en la norma ISO 10993-5:2009, véase la figura 27 que se observan los resultados del ensayo de citotoxicidad con el protocolo de MTT.

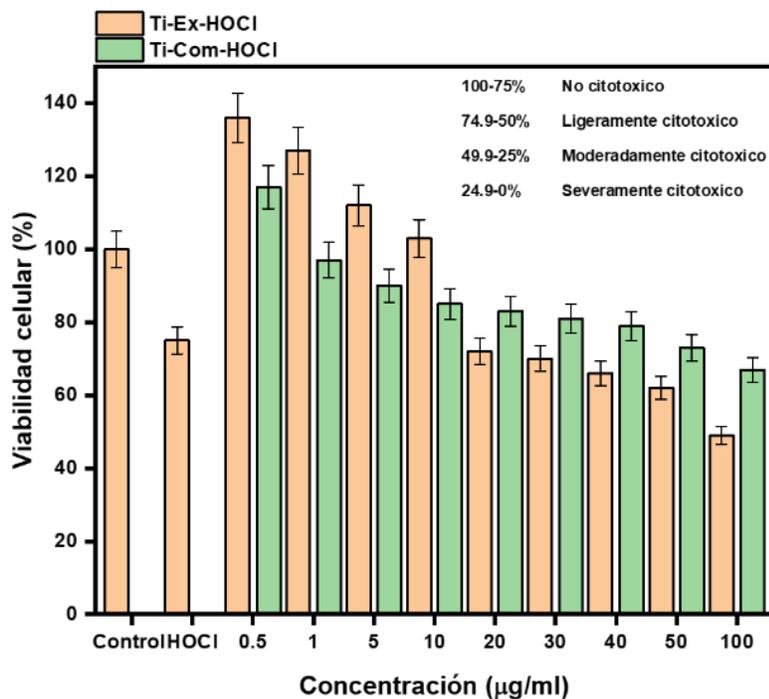


Figura 27. Resultados de la prueba de citotoxicidad de las nanodispersión de HOCl con las NPs de TiO₂ experimental y comercial.

Discusión

En el presente experimento se evaluó el efecto antimicrobiano y antifúngico como el efecto citotóxico de la nanodispersión de HOCl con las nanopartículas de TiO₂ experimentales y comerciales como también se comparó la eficacia de ambas nanodispersiones para demostrar cual tenía mayor efecto antimicrobiano con las cepas evaluadas de *S. mutans*, *S. aureus* y *E. feacalis*, en el ensayo antifúngico con la cepa de *C. albicans* y a su vez demostrar ser menos citotóxica ya que actualmente no existe suficiente evidencia científica sobre una nanodispersión que combine el HOCl con las NPs de TiO₂ de con las características que se manejaron en este estudio.

- Una de las características similares tanto como las NPs TiO₂ y el HOCl es el mecanismo de acción antimicrobiana en donde Leung et al.2016 asocia a la NPs de TiO₂ a especies reactivas de oxígeno (ROS) ya que tienen un alto

potencial oxidativo, las ROS afectan a las células bacterianas por diferentes mecanismos que conducen a su muerte(108). Como lo explica Priyanka et al.2016 que la generación de ROS tiene mayor ventaja al estar en nanoescala debido a que naturaleza a nanométrica implica un aumento importante de la relación área superficial/volumen que proporciona un máximo contacto con el agua y el oxígeno del medio, lo puede penetrar fácilmente a la pared celular que es la primera barrera de defensa ante cualquier daño oxidativo del medio, siendo por lo tanto la primera afectada por la ROS y posteriormente la membrana celular, lo que permite el aumento de la oxidación intracelular lo cual se comprobó en los experimentos ensayos de MTT bacteriano y XTT antifúngico que la nanopartículas de TiO₂ experimentales lograron tener mayor efecto esto debido a su tamaño y menor agregación que le permite penetrar fácilmente en la pared celular y con la ayuda del HOCl que posee la capacidad también de liberar las ROS lograr intensificar a una mayor escala el daño sobre la pared celular, en la membrana celular de la bacterias como la síntesis de proteína, de ATP y ADN a la vez rompiendo los enlaces(109).

- En cambio, Maher M et al 2023 demostró que el HOCl es capaz de penetrar las membranas de las células bacterianas, lo que lleva al daño intracelular y muerte celular, se ha encontrado que es efectivo a bajas concentraciones y tiene un tiempo de contacto corto el HOCl, es eficaz contra una variedad de bacterias, incluidas cepas resistentes como el *Staphylococcus aureus* y el *Enterococcus faecalis*, así como patógenos fúngicos como *Candida albicans* y es considerado como un antibiótico, que no es tóxico, no irritante y no alergénico, por lo que es un alternativa segura y bien tolerada a los antibióticos y agentes antimicrobianos tradicionales esto usado para diversos entornos clínicos, como cuidado de heridas, control de infecciones e higiene bucal todo los rasgos lo pudimos verificar en nuestro experimento ya que con la nanodispersión de HOCl con las NPs de TiO₂ se pudo observar un efecto inhibitorio con la cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y con el *Streptococcus mutans* pero más evidente con el *Candida albicans* ya

que son las bacterias más encontradas en odontología, lo que se observó en bajas concentraciones que había un efecto antibacteriano y antifúngico que a su vez en el ensayo de citotoxicidad se observó no ser citotóxicas y existía una proliferación de células SCAPs dando los resultados similares al autor(110) .

- En la publicación de Argueta-Figueroa et al.2018 se mencionaron que las NPs de TiO₂ en concentraciones bajas e intermedias, no resultaron ser citotóxicas en las dosis mencionadas por varios autores en las líneas celulares derivados o no derivados de la cavidad bucal, son considerados por varios investigadores como una alternativa potencial para estimular la proliferación celular por tal motivo en la actualidad se usan en los recubrimiento de implantes óseos y dentales, entre otros uso por lo cual se busca elaborar materiales que contengan las NPs de TiO₂ para ser utilizados en el área de la odontología por lo mencionado anteriormente, lo comprobado en el ensayo de MTT en un rango de 24 horas se confirma que las NPs de TiO₂ tanto comercial y experimental se observó una proliferación de las SCAPs en bajas concentraciones, e intermedias no era citotóxicas, esto siendo potenciando con el HOCl, en otro estudio de Sismanoglu et al.2022 comparó varios irrigantes endodónticos usados en el área de la odontología como la clorhexidina y el hipoclorito de sodio como para evaluar cual tenía mayor viabilidad en las células madre mesenquimales dentales dando como resultado que el HOCl demostró tener mayor viabilidad en la células mesenquimales esto comprobado de igual manera con el ensayo de citotoxicidad de la nanodispersión dando la pauta para poder dar un uso como un irrigante en el área de endodoncia(111,112).

Conclusiones

La nanodispersión de HOCl con NPs de TiO₂ experimentales tiene efecto antibacteriano entre las tres cepas evaluadas que fueron *S. mutans*, *S. aureus* y *E. faecalis*, mostrando un excelente efecto antifúngico con la cepa de *C.albicans* con

una alta estabilidad en comparación que la nanodispersión de HOCl con NPs de TiO₂ comerciales esto debido a la agregación y tamaño de las nanopartículas que no le permitían tener un efecto antimicrobiano tan alto como su contraparte evaluada, pero en los ensayo de microdilución se demostró ser eficaz con la cepa de *C.albicans* tanto en el ensayo de XTT antifúngico y el MTT antifúngico.

El ensayo de citotoxicidad mostro menor citotoxicidad con las células SCAPs expuestas a la nanodipersión de HOCl con NPs experimental y comercial, en las concentraciones bajas se observó un hallazgo significativo con la proliferación de las células que superaron el control positivo tanto con las NPs de TiO₂ comerciales como con las experimentales, en contra parte, las concentraciones altas mostraron un aumento en la citotoxicidad en un rango de 20-100 µg/mL.

Los experimentos realizados en este estudio sugieren que las NPs de TiO₂ pueden mejorar la actividad antimicrobiana y antifúngica de un agente antimicrobiano no antibiótico como el HOCl por medio de la nanodispersión, para ser utilizado como un prometedor agente antimicrobiano en el tratamiento de diversos patógenos dentales, con baja citotoxicidad. Por lo cual la nanodipersión puede usarse como una alternativa eficaz para los tratamientos de regeneración y cicatrización de los tejidos de las mucosas, en los tratamientos de la pulpa dental, ya que no provoca la resistencia antimicrobiana como otros antibióticos o agentes antimicrobianos de uso odontológicos.

Referencias

1. Dicastillo CL de, Correa MG, Martínez FB, Streitt C, Galotto MJ, Dicastillo CL de, et al. Antimicrobial Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles. Antimicrobial Resistance - A One Health Perspective [Internet]. 2020 Jan 27 [cited 2022 Dec 13]; Available from: <https://www.intechopen.com/state.item.id>
2. Alvarracin-Baculima M, Cuenca-León K, Pacheco-Quito EM. Nanopartículas Antimicrobianas en Odontología: Estado del arte. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapeutica [Internet]. 2021 Dec 19 [cited 2022 Dec 19];40(8):839–47. Available from: <https://zenodo.org/record/5791388>

3. Eslami N, Fasihi F, Jamalinasab A, Ahrari F. Biocompatibility of several colloidal solutions containing nanoparticles on human gingival fibroblasts. *Dent Res J (Isfahan)* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Dec 19];18(1). Available from: [/pmc/articles/PMC8122689/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35218448/)
4. Sheiham A. Oral health, general health and quality of life. *Bull World Health Organ* [Internet]. 2005 Sep [cited 2022 Dec 19];83(9):644. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2626333/>
5. Moaddabi A, Soltani P, Rengo C, Molaei S, Mousavi SJ, Mehdizadeh M, et al. Comparison of antimicrobial and wound-healing effects of silver nanoparticle and chlorhexidine mouthwashes: an in vivo study in rabbits. *Odontology* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2022 Dec 19];110(3):577–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35218448/>
6. Panpaliya NP, Dahake PT, Kale YJ, Dadpe M V., Kendre SB, Siddiqi AG, et al. In vitro evaluation of antimicrobial property of silver nanoparticles and chlorhexidine against five different oral pathogenic bacteria. *Saudi Dent J* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Dec 19];31(1):76–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30723364/>
7. Bianchi S, Fantozzi G, Bernardi S, Antonouli S, Adelaide Continenza M, Macchiarelli G. Commercial oral hygiene products and implant collar surfaces: Scanning electron microscopy observations. *Canadian Journal of Dental Hygiene* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 Dec 20];54(1):26. Available from: [/pmc/articles/PMC7533810/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35218448/)
8. Kaladhar Reddy A, Kambalyal PB, Shanmugasundaram K, Rajesh V, Donthula S, Patil SR. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of silver, titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles against streptococcus mutans. 2018 Aug 27;18(1).
9. Kochan O, Boitsaniuk S, Levkiv M, Przystupa K, Manashchuk N, Pohoretska K, et al. Emergence of Nano-Dentistry as a Reality of Contemporary Dentistry. Vol. 12, *Applied Sciences (Switzerland)*. MDPI; 2022.
10. Visai L, de Nardo L, Punta C, Melone L, Cigada A, Imbriani M, et al. Titanium oxide antibacterial surfaces in biomedical devices. Vol. 34, *International Journal of Artificial Organs*. Wichtig Publishing Srl; 2011. p. 929–46.
11. Min Zheng, Zuoshan Wang, Yalan Zhu. Preparation of silver nanoparticle via active template under ultrasonic [Internet]. Vol. 16, *Trans. Nonferrous Met. SOC. China*. 2006. Available from: www.csu.edu.cn/ysxb/
12. Besinis A, De Peralta T, Handy RD. The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on *Streptococcus mutans* using a suite of bioassays. *Nanotoxicology*. 2014 Feb;8(1):1–16.
13. Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG. An Investigation on the Antibacterial and Antibiofilm Efficacy of Cationic Nanoparticulates for Root Canal Disinfection. *J Endod*. 2008 Dec;34(12):1515–20.
14. Shkodenko L, Kassirov I, Koshel E. Metal oxide nanoparticles against bacterial biofilms: Perspectives and limitations. Vol. 8, *Microorganisms*. MDPI AG; 2020. p. 1–21.
15. Parra R, Góes MS, Castro MS, Longos E, Bueno PR, Varela JA. Reaction pathway to the synthesis of anatase via the chemical modification of titanium isopropoxide with acetic acid. *Chemistry of Materials*. 2008 Jan 8;20(1):143–50.

16. Khan SUM, Al-Shahry M, Ingler WB. Efficient photochemical water splitting by a chemically modified n-TiO₂. *Science* (1979). 2002 Sep 27;297(5590):2243–5.
17. Ghahremani L, Shirkavand S, Akbari F, Sabzikari N. Tensile strength and impact strength of color modified acrylic resin reinforced with titanium dioxide nanoparticles. *J Clin Exp Dent*. 2017 May 1;9(5):e661–5.
18. Venkatesh Anehosur G, D. Kulkarni R. Synthesis and Determination of Antimicrobial Activity of Visible Light Activated TiO₂ Nanoparticles with Polymethyl Methacrylate Denture Base Resin Against *Staphylococcus Aureus*. *J Gerontol Geriatr Res*. 2012;01(01).
19. Giti R, Firouzmandi M, Zare Khafri N, Ansarifard E. Influence of different concentrations of titanium dioxide and copper oxide nanoparticles on water sorption and solubility of heat-cured PMMA denture base resin. *Clin Exp Dent Res*. 2022 Feb 1;8(1):287–93.
20. Shirkavad S, Moslehifard E. Effect of TiO₂ nanoparticles on tensile strength of dental acrylic resins. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2014;8(4):197–203.
21. Lafaurie GI, Zaror C, Díaz-Báez D, Castillo DM, De Ávila J, Trujillo TG, et al. Evaluation of substantivity of hypochlorous acid as an antiplaque agent: A randomized controlled trial. *Int J Dent Hyg*. 2018 Nov 1;16(4):527–34.
22. Castillo DM, Castillo Y, delgadillo NA, Neuta Y, Jola J, Calderón JL, et al. Viability and effects on bacterial proteins by oral rinses with hypochlorous acid as active ingredient. *Braz Dent J*. 2015 Oct 1;26(5):519–24.
23. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). An oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 Aug 1;278(31):28403–9.
24. Choi JY, Chung CJ, Oh KT, Choi YJ, Kim KHK. Photocatalytic antibacterial effect of tio₂ film of tiag on streptococcus mutans. *Angle Orthodontist*. 2009 May;79(3):528–32.
25. Verdier T, Coutand M, Bertron A, Roques C. Antibacterial activity of TiO₂ photocatalyst alone or in coatings on *E. coli*: The influence of methodological aspects. *Coatings*. 2014 Sep 1;4(3):670–86.
26. Huang YY, Choi H, Kushida Y, Bhayana B, Wang Y, Hamblin MR. Broad-spectrum antimicrobial effects of photocatalysis using titanium dioxide nanoparticles are strongly potentiated by addition of potassium iodide. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Sep 1;60(9):5445–53.
27. Vatansever F, de Melo WCMA, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. Vol. 37, *FEMS Microbiology Reviews*. Blackwell Publishing Ltd; 2013. p. 955–89.
28. Singh M, Manikandan S, Kumaraguru A. Nanoparticles: A New Technology with Wide Applications. *Research Journal Nanoscience and Nanotechnology [Internet]*. 2011;1:1–11. Available from: <http://knowledgiascientific.com>
29. Kasimoglu Y, Tabakcilar D, A. Guclu Z, Yamamoto-Nemoto S, B. Tuna E, Ozen B, et al. Nanomaterials and Nanorobotics in Dentistry: A Review. *Journal of Dentistry Indonesia [Internet]*. 2020 Aug 31;27(2). Available from: <https://scholarhub.ui.ac.id/jdi/vol27/iss2/5/>

30. Kavoosi F, Modaresi F, Sanaei M, Rezaei Z. Medical and dental applications of nanomedicines. Vol. 126, APMIS. Blackwell Munksgaard; 2018. p. 795–803.
31. Garnett MC, Kallinteri P. Nanomedicines and nanotoxicology: Some physiological principles. Vol. 56, Occupational Medicine. 2006. p. 307–11.
32. Aeran H, Kumar V, Uniyal S, Tanwer P. Nanodentistry: Is just a fiction or future. Vol. 5, Journal of Oral Biology and Craniofacial Research. Elsevier B.V.; 2015. p. 207–11.
33. Jandt KD, Watts DC. Nanotechnology in dentistry: Present and future perspectives on dental nanomaterials. Vol. 36, Dental Materials. Elsevier Inc.; 2020. p. 1365–78.
34. Patel Rupali Mukesh, Dahane Trupti M, Godbole Surekha, Kambala Seema Sathe, Mangal Kashish. Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences. 2020 [cited 2023 Jan 22]. p. 3566 Applications of Nanocomposite Materials in Dentistry - 1st Edition. Available from: <https://www.elsevier.com/books/applications-of-nanocomposite-materials-in-dentistry/asiri/978-0-12-813742-0>
35. Jana NR. Colloidal Nanoparticles : Functionalization for Biomedical Applications. Colloidal Nanoparticles [Internet]. 2019 Mar 5 [cited 2023 Jan 22]; Available from: <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9780429165603/colloidal-nanoparticles-nikhil-jana>
36. Karasenkov Y, Frolov G, Pogorelsky I, Latuta N, Gusev A, Kuznetsov D, et al. Colloidal metal oxide nanoparticle systems: The new promising way to prevent antibiotic resistance during treatment of local infectious processes. In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. Institute of Physics Publishing; 2015.
37. Foong LK, Foroughi MM, Mirhosseini AF, Safaei M, Jahani S, Mostafavi M, et al. Applications of nano-materials in diverse dentistry regimes. Vol. 10, RSC Advances. Royal Society of Chemistry; 2020. p. 15430–60.
38. Wang W, Gu J, Peng G, Li J, Meichen W, Kai J, et al. Progress in the application of metal and metal oxide nanoparticles in the antibacterial modification of dental materials. 2020;28(8). Available from: <http://www.kjbfz.com>
39. Nizami MZI, Xu VW, Yin IX, Yu OY, Chu CH. Metal and metal oxide nanoparticles in caries prevention: A review. Vol. 11, Nanomaterials. MDPI; 2021.
40. Baig N, Kammakakam I, Falath W, Kammakakam I. Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. Vol. 2, Materials Advances. Royal Society of Chemistry; 2021. p. 1821–71.
41. Marien CBD, Marchal C, Koch A, Robert D, Drogui P. Sol-gel synthesis of TiO₂ nanoparticles: effect of Pluronic P123 on particle's morphology and photocatalytic degradation of paraquat. Environmental Science and Pollution Research. 2017 May 1;24(14):12582–8.
42. Bokov D, Turki Jalil A, Chupradit S, Suksatan W, Javed Ansari M, Shewael IH, et al. Nanomaterial by Sol-Gel Method: Synthesis and Application. Vol. 2021, Advances in Materials Science and Engineering. Hindawi Limited; 2021.
43. Parashar M, Shukla VK, Singh R. Metal oxides nanoparticles via sol–gel method: a review on synthesis, characterization and applications. Vol. 31, Journal of Materials Science: Materials in Electronics. Springer; 2020. p. 3729–49.
44. Ziental D, Czarczynska-Goslinska B, Mlynarczyk DT, Glowacka-Sobotta A, Stanisz B, Goslinski T, et al. Titanium dioxide nanoparticles: Prospects and applications in medicine. Vol. 10, Nanomaterials. MDPI AG; 2020.

45. Ozioma U, Akakuru, Zubair M. Iqbal, Aiguo Wu. TiO₂ Nanoparticles: Properties and Application. Edited by Aiguo Wu and Wenzhi Ren. 2020;41.
46. Patricia Betancur Henao C, Hernández Montes V, Buitrago Sierra R. Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio Nanoparticles for antibacterial materials and titanium dioxide applications [Internet]. Vol. 35, Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2016. Available from: <http://scielo.sld.cu>
47. Liang Y, Sun S, Deng T, Ding H, Chen W, Chen Y. The preparation of TiO₂ film by the sol-gel method and evaluation of its self-cleaning property. *Materials*. 2018 Mar 19;11(3).
48. Ahmad MM, Mushtaq S, Al Qahtani HS, Sedky A, Alam MW. Investigation of tio₂ nanoparticles synthesized by sol-gel method for effectual photodegradation, oxidation and reduction reaction. *Crystals (Basel)*. 2021 Dec 1;11(12).
49. Yahaya MZ, Azam MA, Teridi MAM, Singh PK, Mohamad AA. Recent Characterisation of Sol-Gel Synthesised TiO₂ Nanoparticles. In: *Recent Applications in Sol-Gel Synthesis*. InTech; 2017.
50. Wang J, Wang Z, Wang W, Wang Y, Hu X, Liu J, et al. Synthesis, modification and application of titanium dioxide nanoparticles: a review. *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry; 2022.
51. Wu X, Wu X. Applications of Titanium Dioxide Materials. *Titanium Dioxide - Advances and Applications* [Internet]. 2021 Aug 9 [cited 2023 Jan 29]; Available from: <https://www.intechopen.com/state.item.id>
52. Das R, Ambardekar V, Bandyopadhyay PP, Das R, Ambardekar V, Bandyopadhyay PP. Titanium Dioxide and Its Applications in Mechanical, Electrical, Optical, and Biomedical Fields. *Titanium Dioxide - Advances and Applications* [Internet]. 2021 Aug 16 [cited 2023 Jan 29]; Available from: <https://www.intechopen.com/state.item.id>
53. Musial J, Krakowiak R, Mlynarczyk DT, Goslinski T, Stanisz BJ. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products—what do we know about their safety? Vol. 10, *Nanomaterials*. MDPI AG; 2020. p. 1–23.
54. Jafari S, Mahyad B, Hashemzadeh H, Janfaza S, Gholikhani T, Tayebi L. Biomedical applications of TiO₂ nanostructures: Recent advances. Vol. 15, *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press Ltd.; 2020. p. 3447–70.
55. Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data [Internet]. 2013. Available from: <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/10/1/15>
56. Mansoor A, Khurshid Z, Khan MT, Mansoor E, Butt FA, Jamal A, et al. Medical and Dental Applications of Titania Nanoparticles: An Overview. Vol. 12, *Nanomaterials*. MDPI; 2022.
57. Liu S, Chen X, Yu M, Li J, Liu J, Xie Z, et al. Applications of Titanium Dioxide Nanostructure in Stomatology. Vol. 27, *Molecules*. MDPI; 2022.
58. Bapat RA, Joshi CP, Bapat P, Chaubal T V., Pandurangappa R, Jnanendrappa N, et al. The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. Vol. 24, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2019. p. 85–98.
59. Mamidi N, Flores Otero JF. Metallic and carbonaceous nanoparticles for dentistry applications. Vol. 25, *Current Opinion in Biomedical Engineering*. Elsevier B.V.; 2023.

60. Nikolova MP, Chavali MS. Metal oxide nanoparticles as biomedical materials. Vol. 5, Biomimetics. MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020.
61. Subhashree Priyadarsini, Sumit Mukherjee, Bolso Janmejaya, Nibedita Nayak, Monalisa Mishra. Nanoparticles in Medicine [Internet]. Shukla AK, editor. Singapore: Springer Singapore; 2020. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-8954-2>
62. Schmalz G, Hickel R, van Landuyt KL, Reichl FX. Nanoparticles in dentistry. Vol. 33, Dental Materials. Elsevier Inc.; 2017. p. 1298–314.
63. Samiei M, Janani M, Asl-Aminabadi N, Ghasemi N, Divband B, Shirazi S, et al. Effect of the TiO₂ nanoparticles on the selected physical properties of mineral trioxide aggregate. *J Clin Exp Dent*. 2017;9(2):e191–5.
64. Kiomarsi N, Zamani P, Bahador A, Hashemikamangar SS, Pourhajibagher M, Kharazifard MJ. Effect of Addition of Nano-TiO₂, Nano-SiO₂, and a Combination of Both, on Antimicrobial Activity of an Orthodontic Composite. *Journal of Contemporary Dental Practice*. 2020;21(8):857–62.
65. Jowkar Z, Hamidi SA, Shafiei F, Ghahramani Y. The Effect of Silver, Zinc Oxide, and Titanium Dioxide Nanoparticles Used as Final Irrigation Solutions on the Fracture Resistance of Root-Filled Teeth. 2020 [cited 2023 Feb 9]; Available from: <http://doi.org/10.2147/CCIDE.S253251>
66. Gad MM, Abualsaud R. Behavior of PMMA denture base materials containing titanium dioxide nanoparticles: A literature review. Vol. 2019, *International Journal of Biomaterials*. Hindawi Limited; 2019.
67. Javed R, Ain N ul, Gul A, Arslan Ahmad M, Guo W, Ao Q, et al. Diverse biotechnological applications of multifunctional titanium dioxide nanoparticles: An up-to-date review. Vol. 16, *IET Nanobiotechnology*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 171–89.
68. Ibrahim MA, Meera Priyadarshini B, Neo J, Fawzy AS. Characterization of Chitosan/TiO₂ Nano-Powder Modified Glass-Ionomer Cement for Restorative Dental Applications. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*. 2017 Mar 1;29(2):146–56.
69. Ahrari F, Eslami N, Rajabi O, Ghazvini K, Barati S. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* to colloidal solutions of different nanoparticles applied as mouthwashes. Vol. 12, *Dental Research Journal 44 Dental Research Journal*. 2015.
70. Ragheb N, Borg H. Antimicrobial Effect of Titanium Oxide (TiO₂) Nano Particles in Completely Edentulous Patients. A Randomized Clinical Trial. *Advanced Dental Journal*. 2021 Oct 1;3(4):173–84.
71. Rimjhim, Anitha Mary Thomas. Analysis of Antimicrobial Activity of Titaniumdioxide Nanoparticles on Aerobic and Anaerobic Dental Isolates Rimjhim, Anitha Thomas. *Int J Sci Res Sci Eng Technol*. 2016 Aug 30;2:815–22.
72. Inés Lafaurie G, Leonardo Calderón J, Zaror C, Viviana Millán L, Marcela Castillo D, en Microbiología M, et al. Ácido Hipocloroso: una Nueva Alternativa como Agente Antimicrobiano y para la Proliferación Celular para Uso en Odontología Hypochlorous Acid: A New Alternative as Antimicrobial Agent and For Cell Proliferation for Use in Dentistry. Vol. 9, *Int. J. Odontostomat*. 2015.
73. Block MS, Rowan BG. Hypochlorous Acid: A Review. Vol. 78, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. W.B. Saunders; 2020. p. 1461–6.

74. MA JZ, SM A. The Effect of Hypochlorous Acid Disinfectant on the Reproduction of Details and Surface Hardness of Type III Dental Stone. *Cureus*. 2022 Nov 30;
75. Tazawa K, Jadhav R, Azuma MM, Fenno JC, McDonald NJ, Sasaki H. Hypochlorous acid inactivates oral pathogens and a SARS-CoV-2-surrogate. *BMC Oral Health* [Internet]. 2023 Feb 18;23(1):111. Available from: <https://bmcoralhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12903-023-02820-7>
76. Kiamco MM, Zmuda HM, Mohamed A, Call DR, Raval YS, Patel R, et al. Hypochlorous-Acid-Generating Electrochemical Scaffold for Treatment of Wound Biofilms. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
77. Aherne O, Ortiz R, Fazli MM, Davies JR. Effects of stabilized hypochlorous acid on oral biofilm bacteria. *BMC Oral Health*. 2022 Dec 1;22(1).
78. Thanatvarakorn O, Prasansuttiporn T, Thittaweerat S, Foxton RM, Ichinose S, Tagami J, et al. Smear layer-deproteinizing improves bonding of one-step self-etch adhesives to dentin. *Dental Materials*. 2018 Mar 1;34(3):434–41.
79. Chen CJ, Chen CC, Ding SJ. Effectiveness of hypochlorous acid to reduce the biofilms on titanium alloy surfaces in vitro. *Int J Mol Sci*. 2016 Jul 19;17(7).
80. Anwar S, Sivalingam B, Vijayakumar N, Vivek K, K. Perumal L, Prabha E. An In Vitro comparison of the effect of wound irrigating solution (0.01% hypochlorous acid) and 2.5% sodium hypochlorite against enterococcus faecalis. *J Pharm Bioallied Sci*. 2022;14(5):796.
81. Feng KC, Ghai A, Liu H, Salerno A, Miller C, Liu J, et al. Efficacy of hypochlorous acid (HOCl) fog in sanitizing surfaces against *Enterococcus faecalis*. *Am J Infect Control*. 2022 Dec 1;50(12):1311–5.
82. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in Endodontics. Vol. 54, *Dental Clinics of North America*. 2010. p. 291–312.
83. Hsieh YL, Yao JC, Hsieh SC, Teng NC, Chu YT, Yu WX, et al. The in vivo toxicity and antimicrobial properties for electrolyzed oxidizing (Eo) water-based mouthwashes. *Materials*. 2020 Oct 1;13(19):1–11.
84. Shajahan IF, Kandaswamy D, Srikanth P, Narayana L, Selvarajan R. Dental unit waterlines disinfection using hypochlorous acid-based disinfectant. *J Conserv Dent* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2023 Mar 9];19(4):347. Available from: </pmc/articles/PMC4979282/>
85. Zhai Q, Dong Z, Wang W, Li B, Jin Y. Dental stem cell and dental tissue regeneration. Vol. 13, *Frontiers of Medicine*. Higher Education Press; 2019. p. 152–9.
86. Nagata M, Ono N, Ono W. Unveiling diversity of stem cells in dental pulp and apical papilla using mouse genetic models: a literature review. *Res Cell and Tissue Research* [Internet]. 2021 Feb 17;383:603–16. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03271-0>
87. Driesen RB, Gervois P, Vangansewinkel T, Lambrichts I. Unraveling the Role of the Apical Papilla During Dental Root Maturation. Vol. 9, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
88. Palma PJ, Martins J, Diogo P, Sequeira D, Ramos JC, Diogenes A, et al. Does apical papilla survive and develop in apical periodontitis presence after regenerative endodontic procedures? *Applied Sciences (Switzerland)*. 2019 Oct 1;9(19).

89. Smeda M, Galler KM, Woelflick M, Rosendahl A, Moehle C, Lenhardt B, et al. Molecular Biological Comparison of Dental Pulp-and Apical Papilla-Derived Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 1;23(5).
90. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *Journal of Immunological Methods.* 1990.
91. Johan van Meerloo, Gertjan J. L. Kaspers, Jacqueline Cloos. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: *Cancer Cell Culture* [Internet]. 2011. p. 237–45. Available from: www.springer.com/series/7651
92. Acosta-Torres L, Pilar M Del, Torres R. Manual para la enseñanza práctica del ENSAYO MTT PARA EVALUAR LA CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS [Internet]. 2019. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/336348823>
93. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 1;22(23).
94. Benov L. Effect of growth media on the MTT colorimetric assay in bacteria. *PLoS One.* 2019 Aug 1;14(8).
95. Oh YJ, Hong J. Application of the MTT-based colorimetric method for evaluating bacterial growth using different solvent systems. *LWT.* 2022 Jan 1;153.
96. Batool S, Javaid S, Javed H, Laiba Asim, Shahid I, Khan M, et al. Addressing artifacts of colorimetric anticancer assays for plant-based drug development. Vol. 39, *Medical Oncology.* Springer; 2022.
97. Scudiere DA, Shoemaker RH, Paul KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines1 [Internet]. Vol. 48, *CANCER RESEARCH.* 1988. Available from: <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/48/17/4827/2958485/cr0480174827.pdf>
98. Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. Vol. 120, *Acta Histochemica.* Elsevier GmbH; 2018. p. 303–11.
99. Koban I, Matthes R, Hübner NO, Welk A, Sietmann R, Lademann J, et al. XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences. *GMS Krankenhhyg Interdiszip* [Internet]. 2012 [cited 2023 Mar 14];7(1):Doc06. Available from: [/pmc/articles/PMC3334957/](http://pmc/articles/PMC3334957/)
100. Dra Altair Del Bel Cury PA, José da SILVA W, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Antonio Ribeiro ROSA E, Perera SAMARANAYAKE L, et al. Improvement of XTT Assay Performance for Studies Involving *Candida albicans* Biofilms. *Braz Dent J.* 2008;19(4):364–9.
101. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. Vol. 142, *Journal of Immunological Methods.* 1991.
102. BÜYÜKÜNAL SK, MURATOĞLU K, KOLUMAN A. The in vitro effect of hypochlorous acid-metal nanoparticles combination on *Salmonella* under different temperature conditions. *Turk J Vet Anim Sci.* 2022 Jan 1;46(3):439–44.
103. Kuwabara M, Sato Y, Ishihara M, Takayama T, Nakamura S, Fukuda K, et al. Healing of *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds in diabetic db/db mice by weakly acidic hypochlorous acid cleansing and silver nanoparticle/chitin-nanofiber sheet covering. *Wound Medicine.* 2020 Mar 1;28.

104. Younis AB, Haddad Y, Kosaristanova L, Smerkova K. Titanium dioxide nanoparticles: Recent progress in antimicrobial applications. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* [Internet]. 2022 [cited 2023 May 6];e1860. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/wnan.1860>
105. Palau M, Muñoz E, Lujan E, Larrosa N, Gomis X, Márquez E, et al. In Vitro and In Vivo Antimicrobial Activity of Hypochlorous Acid against Drug-Resistant and Biofilm-Producing Strains . *Microbiol Spectr*. 2022 Oct 26;10(5).
106. Zhu Y, Zhang LI, Gao C, Cao L. The synthesis of nanosized TiO₂ powder using a sol-gel method with TiCl₄ as a precursor. 2000.
107. Gutiérrez Jiménez Yareth Idalia Ayerim, René García Contreras, Paloma Serrano Díaz, Juan Carlos Flores Arriaga. Bioactividad de Hidrogel-Cúrcuma en cultivo con células orales para uso postquirúrgico [Internet]. 2021 [cited 2023 Jun 8]. Available from: https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/DGB_UNAM/TES01000814764/3/0814764.pdf
108. Leung YH, Xu X, Ma APY, Liu F, Ng AMC, Shen Z, et al. Toxicity of ZnO and TiO₂ to Escherichia coli cells. *Sci Rep*. 2016 Oct 12;6.
109. Priyanka KP, Sukirtha TH, Balakrishna KM, Varghese T. Microbicidal activity of TiO₂ nanoparticles synthesised by sol-gel method. *IET Nanobiotechnol*. 2016 Apr 1;10(2):81–6.
110. Maher M A. Hypochlorous acid has emerged as a potential alternative to conventional antibiotics due to its broad-spectrum antimicrobial activity. *International Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology* [Internet]. 2023 Mar 30;6(1):001–4. Available from: <https://www.microbiochemjournal.com/articles/ijcmbt-aid1026.pdf>
111. Argueta-Figueroa L, Torres-Gómez N, Scougall-Vilchis RJ, García-Contreras R. Biocompatibility and nanotoxicology of titanium dioxide in the oral cavity: Systematic review. *Investigacion Clinica (Venezuela)*. 2018;59(4):352–68.
112. Sismanoglu S, Ercal P. The cytotoxic effects of various endodontic irrigants on the viability of dental mesenchymal stem cells. *Aust Endod J* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2023 May 7];48(2):305–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34590392/>

Anexos



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

Otorga el presente

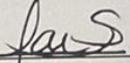
RECONOCIMIENTO

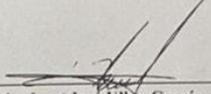
a

Juan Rafael Morales Noriega, Ravichandran Manisekaran, René García
Contreras, Christian Andrea López Ayuso

Por su participación académica con el trabajo
“COMPARAR EL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LAS NANOPARTÍCULAS
DE TIO 2 CON ÁCIDO HIPOCLOROSO FRENTE A PATÓGENOS DENTALES”
llevada a cabo el
30 de septiembre de 2022
en el marco del
Greater Expo ARIC Dental 2022

“Por mi Raza Hablará el Espíritu”
León, Guanajuato, a 30 de septiembre de 2022


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


Lic. Juan José Ullúa García
Presidente
Greater ARIC Dental 2022


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



ENES-UNAM-DECI-ARC22-0009



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a

Juan Rafael Morales Noriega, Christian Andrea López Ayuso, René García Contreras
& Ravichandran Manisekaran

Por haber obtenido el

Segundo Lugar

en el Concurso de Carteles de Investigación Básica a Nivel Licenciatura
con el trabajo

**“COMPARAR EL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE
TiO₂ CON ÁCIDO HIPOCLOROSO FRENTE A PATÓGENOS DENTALES”**

llevado a cabo el

1 de octubre de 2022

en el marco del

Greater Expo ARIC Dental 2022

“Por mi Raza Hablará el Espíritu”

León, Guanajuato, a 3 de octubre de 2022

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

Lic. Juan José Ulloa García
Presidente
Greater ARIC Dental 2022

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



ENESL-UNAM-DECI-ARC22-0107



UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO

Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud
Universidad de Guanajuato, Campus León

XXII Reunión Internacional de Ciencias Médicas

24-26 Agosto 2022

OTORGA LA PRESENTE
CONSTANCIA

A:

JUAN RAFAEL MORALES NORIEGA

POR SU PARTICIPACIÓN CON EL TRABAJO LIBRE:

**COMPARAR EL EFECTO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS DE TIO2
CON ÁCIDO HIPOCLOROSO FRENTE A PATÓGENOS DENTALES**

EN COAUTORÍA CON:

**RAVICHANDRAN MANISEKARAN SHANTHI . RENÉ GARCÍA CONTRERAS .
CHRISTIAN ANDREA LÓPEZ AYUSO . JUAN RAFAEL NORIEGA .**

24, 25 y 26 de Agosto del 2022 en León, Gto.

"LA VERDAD OS HARÁ LIBRES"

Dr. Tonatiuh García Campos
Director de División de
Ciencias de la Salud

Dra. Claudia Luévano Contreras
Directora del Departamento de
Ciencias Médicas

Dra. Lorena del Rocio Ibarra Reynoso
Coordinadora de la Maestría
en Ciencias Médicas

Dra. María Luisa Lazo de la Vega Monroy
Coordinadora del Doctorado
en Ciencias Médicas



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

Juan Rafael Morales Noriega, Christian Andrea López Ayuso
& Ravichandran Manisekaran

Por su participación en el
Concurso de Presentaciones de Cartel
con el trabajo

*“Comparación Del Efecto Antimicrobiano Y Citotóxico De Las Nanopartículas
De Tio2 Con Ácido Hipocloroso Frente A Patógenos Dentales”*

llevada a cabo el
19 de octubre de 2022
en el marco del

**1º Congreso Internacional de
BioNano Materiales**

“Por mi Raza Hablará el Espíritu”
León, Guanajuato, a 25 de octubre de 2022


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




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



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Odontología
Sociedad Nacional de Investigadores en Odontología, A. C.



Otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

A **JUAN RAFAEL MORALES NORIEGA**, *Christian Andrea López Ayuso, Ravichandran Manisekaran*

Categoría: BÁSICA, Nivel: LICENCIATURA

Por su participación académica con la presentación en cartel

COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS TiO₂ CON ÁCIDO HIPOCLOROSO FRENTE A PATÓGENOS DENTALES. CIÓN IÓN

en el marco del

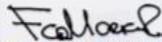
XXX Encuentro Nacional y XXI Iberoamericano
de Investigación en Odontología

efectuado los días 9 • 10 y 11 de noviembre de 2022.

Folio 42109112237

"Por mi raza hablará el espíritu"

Ciudad Universitaria, 11 de noviembre de 2022.


Dr. Francisco Javier Marichi Rodríguez
Director
Facultad de Odontología, UNAM


Dr. Amaury de Jesús Pozos Guillén
Presidente de la Sociedad Nacional
de Investigadores en Odontología, A.C.