

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD



---

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y CAPACIDAD  
QUELANTE DE LAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO COMO IRRIGANTE PARA  
EL TRATAMIENTO DE CONDUCTOS RADICULARES.

---

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA

**LUIS HERNÁN CARRILLO VÁRGUEZ**

DR. JOSÉ MANUEL CORNEJO BRAVO  
DIRECTOR DE TESIS

DR. EDUARDO ALBERTO LÓPEZ MALDONADO  
CO-DIRECTOR DE TESIS

DRA. ARACELY SERRANO MEDINA  
SINODAL

DRA. EUSTOLIA RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ  
SINODAL

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA

ENERO DEL 2020.

**Universidad Autónoma de Baja California**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**

FOLIO No. 288

Tijuana, B. C., a 3 de Diciembre del 2019

**C. Luis Hernán Carrillo Vázquez**  
**Pasante de: Maestro en Ciencias de la Salud**  
**Presente**

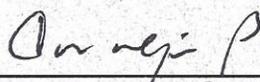
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la  
Opción TESIS

Es propuesto, por los C.C. Dr. José Manuel Cornejo Bravo y Dr. Eduardo  
Alberto López Maldonado

Quienes serán los responsables de la calidad de trabajo que usted presente,  
referido al tema “Evaluación In Vitro de la Actividad Antibacteriana y  
Capacidad Quelante de las Nanopartículas de Quitosano como  
Irrigante para el Tratamiento de Conductos  
Radiculares”

El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS
- III.- ANTECEDENTES
- IV.- DISEÑO EXPERIMENTAL
- V.- RESULTADOS
- VI.- DISCUSIÓN
- VII.- CONCLUSIONES
- VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
- IX.- APÉNDICE

  
Dr. José Manuel Cornejo Bravo  
Director de Tesis

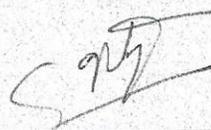
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS  
QUÍMICAS E INGENIERÍA  
COORDINACIÓN DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

  
Dr. Eduardo Alberto López Maldonado  
Co-Director de Tesis

  
Dr. José Luis González Vázquez  
Director

  
Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy  
Sub-Directora

## **DEDICATORIA**

*Al Luis Hernán de 8 años.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis fue apoyada por la 20va Convocatoria de Apoyo a Proyecto de Investigación UABC 2018 “Complejos de Biopolímeros como Sistemas de Liberación Sostenida de Antimicrobianos en la Cavidad Bucal” (3900) y el Programa de Fortalecimientos de Cuerpos Académicos 2018 (Biofarmacia UABC-CA-287) SEP-PRODES.

Aprovecho este medio para agradecer al Dr. José Manuel Cornejo Bravo, por haber confiado y aceptado a este odontólogo a ser su alumno, por su paciencia y buena disposición para enseñar. También agradezco a mi co-director, el Dr. Eduardo Alberto López Maldonado, que su aportación fue de gran ayuda para llevar a cabo este proyecto. A la Dra. Aracely Serrano Medina, por sus enseñanzas para mejorar la presentación de esta tesis. A la Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez, por ser tan detallada al evaluar, por su tiempo y compromiso con el proyecto. Mi eterna admiración y gratitud con todos. Fue un honor trabajar con ustedes.

También agradezco a los maestros o responsables de área que me apoyaron con algunas de las pruebas: Dra. Nydia Castillo, Dra Lili Hurtado, Mtro Román Chávez, así como los alumnos de servicio social del laboratorio de microbiología: Carlos, Bennely y Victoria, que estuvieron apoyándome para los ensayos antimicrobianos. A la Dra Gissela Pineda por sus enseñanzas en bioestadística y alimentar mi amor por la materia. Al Dr. Villarreal por ser tan paciente en su clase y explicarme todo con lujo de detalle, sin usted no habría entendido muchas cosas de mi proyecto.

Agradezco a mis asistentes en el consultorio: Enrique, Alberto y Martín; ya que ellos me ayudan bastante a facilitarme la vida, llevando mi agenda, escuchándome en momentos de crisis,

estrés y desesperación, y aconsejándome para estar más calmado. Más que mis asistentes, los considero mis amigos y mi mano derecha. No sé qué haría sin ustedes.

Un especial agradecimiento a mis compañeros de posgrado y amigos: Paola Cervantes, Iván Rodríguez, Yury Vargas, Alondra Ríos, Hector Magaña, Kenia Palomino, Daniela Becerra, Adán Magallón, Giovanni Uriarte y Efraín Armenta. Todos ustedes me ayudaron y resolvieron mis dudas, de manera desinteresada y siempre con una sonrisa. El mundo necesita más personas como ustedes.

Agradezco profundamente a mi tía, Gaby Carrillo, que siempre ha estado ahí para animarme a seguir preparándome y mejorando cada día, y que siempre ha confiado en mis habilidades. Sin duda tus ánimos me ayudaron a aplicar en la maestría.

Una persona que vino a complementar mi vida, mi mejor amigo y mi novio, Luis Cota, que se merece un premio por ser la persona más paciente y comprensiva del mundo. Haz estado en mis buenos y malos momentos, contigo he compartido mis sombras y aún así te haz quedado a mi lado. Hemos aprendido mucho uno del otro, y de todo corazón agradezco que sigas amándome a pesar de no poder estar contigo el tiempo suficiente por tener que hacer mis compromisos de la maestría. Te amo.

Por último, quiero agradecer a mi mamá, Patty Carrillo, que ha sido también muy paciente al no poderle dedicarle tanto tiempo, y por creer en que puedo hacer lo que me proponga. También por ayudarme a solventar algunos gastos, que sin ese apoyo, me volvería loco. Eres el ejemplo de lo que el amor puro de una mamá puede hacer por su hijo, siempre te preocupas en exceso por mi bienestar, dejándote de lado. Ya viene el momento de regresarte todo lo que haz hecho por mi.

## ÍNDICE

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	8
RESUMEN.....	10
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	11
I.I Antecedentes.....	11
I.II Justificación.....	18
I.III Objetivos.....	19
I.III.I Objetivo general.....	19
I.III.II Objetivos específicos.....	19
I.IV Hipótesis.....	21
CAPÍTULO II: TEORÍA GENERAL.....	22
II El tratamiento de conductos.....	22
II.I Biopelícula en el sistema de conductos.....	23
II.II Composición de la biopelícula.....	23
II.III Hipótesis de formación de biopelícula en el conducto radicular.....	24
II.IV Papel del E. faecalis en la biopelícula.....	26
II.V Eliminación de la biopelícula en los conductos radiculares.....	28
II.VI Dentina: Estructura y composición.....	29
II.VII Agentes irrigantes para el tratamiento de conductos.....	31
II.VII.I Hipoclorito de Sodio.....	32

II.VII.I.I Mecanismo de acción del NaOCl. ....	32
II.VII.I.II Efecto del NaOCl sobre dentina. ....	34
II.VII.I.III Efecto del NaOCl sobre la biopelícula. ....	35
II.VII.II EDTA: Agente quelante .....	35
II.VII.II.I Mecanismo de acción del EDTA. ....	36
II.VII.II.II Efecto del EDTA sobre dentina. ....	38
II.VII.II.III Efecto del EDTA sobre la biopelícula. ....	39
II.VII.III Nanopartículas como agentes irrigantes en Endodoncia. ....	39
II.VII.III.I Nanopartículas de quitosano. ....	41
II.VII.III.I.1 Mecanismo de acción de las nanopartículas de quitosano. ....	42
I.IX Técnicas in vitro para evaluar la capacidad quelante de soluciones irrigantes para el tratamiento de conductos. ....	44
□ Técnicas cuantitativas. ....	45
□ Técnicas cualitativas. ....	47
CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA. ....	52
IV. I. Síntesis de las nanopartículas de quitosano. ....	52
IV. II. Caracterización con dispersión de luz dinámica (DLS). ....	53
IV. III. Caracterización con microscopía electrónica de barrido y transmisión (STEM). ....	53
IV. IV. Análisis por espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR). ....	53
IV. V. Análisis por calorimetría diferencial de barrido. ....	54
IV. VI. Evaluación de la actividad antibacteriana de las nanopartículas de quitosano. ....	54
IV. VII. Comparación de la capacidad quelante de las nanopartículas de quitosano y EDTA. ....	57
CAPÍTULO V. RESULTADOS. ....	59

V. I. Síntesis de las nanopartículas de quitosano.....	59
V. II. Caracterización con dispersión de luz dinámica (DLS).....	60
V. III. Caracterización con microscopía electrónica de barrido y transmisión (STEM). ....	61
V. IV. Análisis por espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR). ....	62
V. V. Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	65
V. VI. Evaluación de la actividad antibacteriana de las nanopartículas de quitosano. ....	66
V. VII. Evaluación de la capacidad quelante de las nanopartículas de quitosano. ....	68
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.....	71
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES .....	77
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

### A

ADN

Ácido desoxirribonucleico · 4

ARNm

Ácido ribonucleico mensajero · 20

### C

Ca

Calcio · 9

### E

E. faecalis

Enterococcus faecalis · 7

EDTA

Ácido etilendiaminotetracético · 10

### F

Fe

Hierro · 14

### G

g

gramo, gramos · 35

g/cm

gramos por centímetro · 36

### H

HClO

Ácido hipocloroso · 12

**I**

ICP

Inductively Coupled Plasma, Plasma de acoplamiento inductivo · 39

**K**

KDa

Kilo Dalton · 20

**L**

L

Litro, litros · 35

**M**

M

Molar, molaridad · 9

MEB

Microscopio electrónico de barrido · 25

mg/mL

miligramos por mililitros · 25

mL

mililitros · 25

mm

milímetros · 9

MTAD

Mezcla de doxiciclina, ácido cítrico y detergente Tween 80 · 13

mV

miliVoltios · 27

**N**

## N

normal · 26

## NaOCl

Hipoclorito de sodio · 10

## NH

Grupo amino · 11

## nm

nanómetro, nanómetros · 17

## NP

nanopartícula · 25

**P**

## P

Fósforo · 9

## pH

Potencial de hidrógeno · 12

## PSI

pounds-force per square inch, Libra de fuerza por pulgada cuadrada · 40

## PUI

Passive Ultrasonic Irrigation, Irrigación ultrasónica pasiva · 30

**R**

## rpm

Revoluciones por minuto · 25

**S**

## STEM

Scanning transmission electron microscopy, microscopía electrónica de transmisión de barrido · 23

**T**

## TPP

Trifosfato sódico polianiónico, Tripolifosfato de sodio aniónico, Trifosfato pentabásico de sodio polianiónico · 32

**U**

## UFC

Unidades formadoras de colonias · 28

 $\mu$  $\mu\text{m}$ 

micrómetro, micrómetros · 9

## °

## °C

Grados Celsius · 19

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. TABLA COMPARATIVA DONDE SE RESUMEN LAS TÉCNICAS CUANTITATIVAS Y CUALITATIVAS PARA EVALUAR LA CAPACIDAD QUELANTE DE DIFERENTES AGENTES IRRIGANTES.....	49
TABLA 2. POTENCIAL ZETA DE LAS NPQ A DIFERENTES PH (25 °C).....	60
TABLA 3. GRUPOS FUNCIONALES CARACTERÍSTICOS DEL QUITOSANO.....	64
TABLA 4. GRUPOS FUNCIONALES CARACTERÍSTICOS DEL TPP. ....	64
TABLA 5. GRUPOS FUNCIONALES CARACTERÍSTICOS DE LAS NPQ.....	65
TABLA 6. TABLA QUE MUESTRAS LAS ABSORBANCIAS DE CADA UNA DE LAS CONCENTRACIONES DE NPQ.....	66
TABLA 7. TABLA QUE MUESTRA EL % DE BACTERIAS VIABLES DE CADA UNA DE LAS CONCENTRACIONES. ....	67
TABLA 8. TABLA QUE MUESTRA EL % DE INHIBICIÓN BACTERIANA DE CADA UNA DE LAS CONCENTRACIONES.....	67
TABLA 9. CONCENTRACIONES NORMALIZADAS DE LOS DIFERENTES ELEMENTOS DE MUESTRAS TRATADAS CON EDTA AL 17% A DIFERENTES TIEMPOS.....	69
TABLA 10. CONCENTRACIONES NORMALIZADAS DE LOS DIFERENTES ELEMENTOS DE MUESTRAS TRATADAS CON NPQ AL 0.1% A DIFERENTES TIEMPOS.....	69

**ÍNDICE DE FIGURAS.**

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL EDTA. ....	36
FIGURA 2. SITIOS DE UNIÓN DEL EDTA A IONES Ca. ....	37
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DEL QUITOSANO. ....	42
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO. ....	44
FIGURA 5. DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO. ....	59
FIGURA 6. GRÁFICO LINEAL DEL POTENCIAL ZETA RESPECTO AL pH DEL MEDIO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO. ....	61
FIGURA 7. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO POR STEM. .....	62
FIGURA 8. ESPECTRO FTIR QUE CONTRASTA LAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO CON SUS COMPONENTES MADRE (QUITOSANO DE BAJO PESO MOLECULAR Y TPP). ....	63
FIGURA 9. ESPECTRO FTIR DONDE SE COMPARAN EL QUITOSANO CON LAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO. ....	64
FIGURA 10. TERMOGRAMA DEL QUITOSANO DE BAJO PESO MOLECULAR Y NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO. ....	66

FIGURA 11. GRÁFICO DE BARRAS QUE COMPARA EL PORCENTAJE DE BACTERIAS SOBREVIVIENTES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NANOPARTÍCULAS.....	68
FIGURA 12. GRÁFICO LINEAL QUE MUESTRA LA EVOLUCIÓN EN LA CONCENTRACIONES DE DIFERENTES ELEMENTOS AL UTILIZAR EDTA AL 17%.....	70

**ÍNDICE DE ECUACIONES.**

ECUACIÓN 1.- REACCIÓN DE FORMACIÓN DE COMPLEJO EDTACa .....	37
ECUACIÓN 2.- REACCIÓN DE PROTONACIÓN DEL EDTA .....	37
ECUACIÓN 3. ECUACIÓN PARA OBTENER EL % DE BACTERIAS VIVAS.....	56
ECUACIÓN 4. FÓRMULA PARA CALCULAR EL % DE INHIBICIÓN BACTERIANA. 56	
ECUACIÓN 5.- % DE RENDIMIENTO.....	60

**VITA**

25 de agosto, 1990	Nacido en Tijuana, Baja California, México
2013	Cirujano Dentista (UABC)
2015	Especialista en Endodoncia (UABC)
2015-	Trabajo en Facultad de Odontología (UABC)
2017	Inicio de estudios de Maestría en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (UABC).

## RESUMEN

**Objetivo:** El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana y capacidad quelante de las nanopartículas de quitosano al 0.1% para uso como agente irrigante durante el tratamiento de conductos.

**Metodología:** Se realizó la síntesis de las nanopartículas de quitosano mediante el método de gelación iónica y se caracterizaron mediante DLS, STEM, FTIR y DSC. Se utilizó el método de macrodilución para evaluar su actividad antibacteriana contra el *E. faecalis*, iniciando con una concentración del 0.1%. Por último, se evaluó y comparó su capacidad quelante contra el EDTA al 17%. Se utilizaron 6 premolares uniradiculares, de los cuales se cortaron discos a 7 mm del ápice, que a su vez se cortaron en 4 partes. Cada uno de los fragmentos estuvo en contacto con un irrigante (Grupo 1: Nanopartículas de quitosano; Grupo 2: EDTA) a diferentes tiempos (0, 3, 5 y 10 minutos). Posteriormente se disolvieron los fragmentos en HNO<sub>3</sub> para ser analizados mediante ICP.

**Resultados:** Las nanopartículas de quitosano al 0.1% inhibieron el 93.74±1.23% de las bacterias, además de que redujeron el % en peso de los iones Ca de los órganos dentarios a los 3 minutos de la misma manera que el EDTA.

**Conclusiones:** Las nanopartículas de quitosano al 0.1% pueden ser una alternativa al EDTA como agente antibacteriano y quelante para el tratamiento de conductos.

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es una ciencia que está emergiendo como campo interdisciplinario con un desarrollo rápido y se ha convertido en una herramienta poderosa para varias aplicaciones biomédicas, tales como la regeneración tisular, transporte de fármacos, biosensores, transferencia de genes e imagenología. La nanotecnología puede usarse para sintetizar y fabricar biomateriales avanzados con propiedades físicas, químicas y biológicas únicas (1). Se ha propuesto el uso de nanopartículas de quitosano durante la terapia endodóntica debido a su actividad antibacteriana y a su potencial efecto quelante. El presente proyecto pretende evaluar las nanopartículas de quitosano para su uso como agente irrigante durante el tratamiento de conductos, mediante ensayos *in vitro*.

### I.1 Antecedentes

Un estudio donde se evaluaron las propiedades quelantes y de inhibición de la recolonización bacteriana de las nanopartículas de quitosano (NPQ) fue el de Del Carpio-Perochena *et al.* (2). Se utilizaron bloques rectangulares de dentina radicular bovina, que fue sometida a esterilización con autoclave por 30 minutos a 121 °C. Posteriormente sintetizaron las NPQ con el método de gelación iónica: El polvo de quitosano se disolvió en ácido acético al 1% a temperatura ambiente. En seguida, se añadió una solución de 1 mg/mL de tripolifosfato de sodio polianiónico (TPP) a la solución de quitosano. Se mezcló en un homogenizador a 5,000 rpm para obtener una concentración final de nanopartículas de 1.29 mg/mL. El tamaño de las nanopartículas fue de 85 a 221 nm. Las soluciones irrigantes que evaluaron fueron: Hipoclorito

de sodio (NaOCl) al 2.5% por 20 minutos, Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) al 17% por 3 minutos y NPQ al 1.29 mg/mL por 3 minutos, creando así 5 grupos (n= 20 por grupo): dentina tratada con agua destilada (grupo 1, control), con NaOCl (grupo 2), NaOCl-EDTA (grupo 3), NaOCl-EDTA-NPQ (grupo 4), y NaOCl-NPQ (grupo 5). Se estandarizó el volumen a 3 mL para todas las soluciones. Se colocaron las muestras de dentina en placas de cultivo con las soluciones. Para el grupo de NaOCl se realizaron cambios cada 5 minutos para simular las condiciones clínicas. Después de este procedimiento, la mitad de las muestras (n=50) se utilizaron para analizar el efecto quelante de las soluciones usando microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), mientras que la otra mitad (n=50) se infectó con biopelícula oral y se analizó con microscopía confocal láser. Como resultados obtuvieron que el smear layer se redujo significativamente en los grupos tratados con NaOCl-EDTA, NaOCl-EDTA-NPQ y NaOCl-NPQ a comparación con los del grupo control y NaOCl ( $p<0.05$ ). Por otro lado, el biovolumen y la viabilidad bacteriana fueron significativamente menores en las muestras que recibieron irrigación final con nanopartículas que los del grupo control ( $p<0.05$ ). Los grupos NaOCl-EDTA-NPQ y NaOCl-NPQ no tuvieron diferencia estadística ( $p>0.05$ ). La colonización bacteriana y viabilidad celular en los grupos NaOCl y NaOCl-EDTA no fueron estadísticamente diferentes que los del grupo control ( $p>0.05$ ).

En otro estudio, en donde se evaluaron las propiedades físicas y antibacterianas de diferentes nanopartículas y de un cemento sellador mezclado con nanopartículas, Kishen *et al.* (3) evaluaron nanopartículas de óxido de Zinc (ZnO-NPs), NPQ, nanopartículas de una mezcla de óxido de zinc y quitosano (Q/ZnO-NPs), y nanopartículas de óxido de zinc cubiertos por multicapas de quitosano (Q-capas-ZnO-NPs). Las NPQ fueron sintetizadas disolviendo

quitosano en una solución de ácido clorhídrico (HCl) a una concentración de 0.5% p/v, y el pH se elevó de 4.6 a 5 con 10 N de hidróxido de sodio (NaOH). Posteriormente se añadieron 5 mL de TPP al 0.25% en agua a 15 mL de una solución de quitosano a una velocidad de 1,000 rpm. Las nanopartículas se separaron por centrifugación a 20,000 rpm por 30 minutos. El sobrenadante se descartó, y las NPQ se lavaron con agua para remover cualquier residuo de NaOH. Las Q-capas-ZnO-NPs se prepararon por técnica electrostática de capas. La deposición en capas de los polielectrolitos se realizó dispersando ZnO-NPs en una solución de ácido hialurónico aniónico (1 mg/mL en 0.14 mol/L NaCl) seguido de la solución catiónica de quitosano (1.5 mg/mL en 0.1 mol/L ácido acético conteniendo 0.14 mol/L NaCl). Después el contenido fue centrifugado y lavado con 0.14 mol/L NaCl por 3 minutos a 10,000 rpm y lavado. Un total de 3 bicapas de quitosano y ácido hialurónico se dispersaron en el aspecto externo de las nanopartículas de ZnO. El potencial Zeta de las nanopartículas se midió con un analizador ZetaSizer nano, a través de electrodos de paladio a temperatura ambiente, y se calculó la media de 6 lecturas. El tamaño de las NPQ y ZnO-NP fue determinada por SEM. La eficacia antibacteriana de nanopartículas se evaluó con *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*). Se utilizaron 100 dientes uniradiculares; la corona y la porción apical se removieron para obtener una raíz de longitud de 8 mm. Después se seccionaron verticalmente a través del plano mediosagital en dos porciones. Estas porciones de dentina se dividieron aleatoriamente en 5 grupos iguales y se expusieron a diferentes tratamientos químicos. El grupo 1 fue tratado con NaOCl al 5.2% por 30 minutos. Los del grupo 2 se trataron con NaOCl al 5.2% por 30 minutos y EDTA al 17% por 5 minutos. El grupo 3 se trataron con EDTA al 17% por 5 minutos y NaOCl al 5.2% por 30 minutos. El grupo 4 fue tratado con clorhexidina por 30 minutos, y los del grupo 5 se

mantuvieron sin tratamiento. Después del tratamiento con irrigantes, se dividieron en 5 subgrupos y fueron tratados con 30 mg de nanopartículas mezcladas con 1 mL de agua desionizada. Los especímenes del subgrupo 1 fueron tratados con ZnO-NP, los del subgrupo 2 fueron tratados con NPQ, los del subgrupo 3 fueron tratados con Q/ZnO-NP, y los del subgrupo 4 fueron tratados con Q-capas-ZnO-NP por 24 horas. El grupo control sin tratamiento se mantuvieron en todos los grupos. Posteriormente se utilizó un cultivo de *E. faecalis* para inocularlo en los fragmentos de dentina tratados con los distintos irrigantes y nanopartículas, en una placa de pocillos a 37 °C por 1 hora. El análisis SEM mostró NPQ con un diámetro promedio de 70 nm, mientras que el diámetro de las ZnO-NP fue de 60 a 100 nm. Los potenciales Zeta de las NPQ y las ZnO-NP fue de 49 mV y 22 mV, respectivamente, y la potencial zeta de la mezcla de Q/ZnO fue de 40 mV. Al analizar los resultados, las nanopartículas mostraron eliminación bacteriana, y la tasa de muerte depende del tiempo y la concentración. NPQ mostraron completa aniquilación de bacterias después de 8 horas. Las otras nanopartículas mostraron una reducción de 3 a 4 log en Unidades formadoras de colonias (UFC). La microscopía con fluorescencia mostró imágenes de la adherencia bacteriana antes y después del tratamiento con nanopartículas. El número de bacterias adheridas a la dentina sin tratar se tomó como el 100% de adherencia. Entre los irrigantes utilizados, la clorhexidina produjo la mayor reducción de adherencia bacteriana a la dentina (72%), mientras que el EDTA como irrigante final (NaOCl-EDTA) produjo la menor reducción de adherencia bacteriana a la dentina (33% reducción). El tratamiento de dentina con EDTA antes de NaOCl produjo una reducción del 51%. Para los tres irrigantes, el tratamiento subsecuente con nanopartículas produjo una reducción significativa de adherencia de *E. faecalis* a la dentina ( $p < 0.05$ ). De igual manera, cuando la dentina sin tratar

entra en contacto con ZnO-NP, Q/Zn-NP, o Q-capas-ZnO-NP produjo un 95% de reducción en adherencia bacteriana, mientras que NPQ produjo un 83% de reducción en adherencia bacteriana. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados con nanopartículas.

Por último, un estudio evaluó el efecto de la activación ultrasónica de los irrigantes sobre la remoción del smear layer. Schmidt *et al.* (4) diseñaron una prueba cuantitativa que evaluaba de forma longitudinal la eficacia de los agentes irrigantes. 32 premolares uniradiculares fueron extraídos de pacientes con edades entre 13 y 17 años por razones ortodónticas. Se realizó acceso endodóntico y se tomó la longitud de trabajo de cada uno introduciendo una lima tipo K #10 hasta que la punta se apreciara en el foramen y se restó 1 mm. La región apical de cada raíz fue cubierta con una capa de material de impresión de silicona de cuerpo pesado para evitar la extravasación de las soluciones irrigantes y simular las condiciones clínicas de la presencia de tejidos periapicales. La instrumentación se realizó por el mismo operador con limas rotatorias ProTaper Universal hasta F4 (40/06). Entre cada lima, los conductos fueron irrigados con 2 mL de NaOCl al 1% con una jeringa de 5 mL y aguja NaviTip 30 calibrada a 2 mm menos de la longitud de trabajo, con movimientos de avance y retroceso de 2-3 mm. Simultáneamente, la succión fue realizada con una cánula de metal. La permeabilidad apical se verificó con una lima tipo K #10 entre cada instrumento hasta el foramen apical. Al final del procedimiento, los conductos fueron irrigados con 3 mL de agua destilada y secados con puntas de papel. Posteriormente un cono de gutapercha se introdujo al conducto, y se realizaron surcos longitudinales en las superficies lingual y bucal de cada diente utilizando un disco de diamante de 0.1 mm de grosor, operado a baja velocidad hasta que se apreciara el color rosa de la

gutapercha, y así evitar contaminación accidental e invasión al conducto del debris formado por el corte. Una torunda de algodón se colocó en la cavidad de acceso para prevenir que entre debris. Posteriormente los dientes fueron separados en dos con la ayuda de un cincel, y una de las mitades fue seleccionada para la evaluación pre-irrigación por microscopía electrónica de barrido: se realizaron tres marcas con una pluma en la porción externa de la raíz, perpendiculares al eje longitudinal, para dividirla en tercio cervical, medio y apical, con la misma longitud. Las marcas servirán de referencia para trazar tres surcos en la pared del conducto, delimitándolo de igual manera en tercios. Los surcos se realizaron con un disco de diamante de 7 mm de diámetro y 0.1 mm de grosor, lo suficientemente profundo para poder ser visto a través del MEB. Una hoja de bisturí no. 11 se utilizó para crear una nueva marca, aproximadamente de 5 mm de largo paralelo al eje largo del diente. Así, una imagen similar a una cruz se puede visualizar en la pared del conducto de cada uno de los tercios. Las muestras de los dientes fracturados se mantuvieron en una incubadora a 37 °C por 48 horas. Después se pasaron a una aspiradora desecadora para remover cualquier resto de humedad. Por último, las muestras fueron evaluadas en el SEM. Después de ubicar las marcas en forma de cruz dentro del conducto, el área con mayor cantidad de smear layer en cada uno de los tercios se eligió para el estudio, tomando imágenes a una magnificación de 100x, 500x y 1000x sin cambiar la posición, coincidiendo con los bordes de los límites de la marca; así, se obtuvieron 9 imágenes para cada muestra antes de la irrigación, 3 imágenes para cada tercio. Estas imágenes fueron utilizadas para evaluar las condiciones de las paredes del conducto antes de la irrigación final. Se procedió a unir las mitades con resina y después se insertó la raíz reensamblada en material de impresión de silicón de cuerpo pesado para aumentar la estabilidad y prevenir la filtración de las soluciones utilizadas

en el protocolo final. Para el estudio de los irrigantes, se dividieron los 32 dientes en 4 grupos ( $n=8$ ): 1, irrigación convencional; 2, irrigación ultrasónica pasiva (PUI) con EDTA; 3, PUI con NaOCl; 4, PUI con EDTA + PUI con NaOCl. Para la técnica de PUI, se realizó con una punta de ultrasonido sin filo, con un diámetro apical #20, conicidad 0.01 (Irrisonic E1) calibrada a 1 mm corto de la longitud de trabajo y activada con ultrasonido JetSonic a un poder del 20% indicado por el fabricante, sin tocar las paredes del conducto. Todos los conductos recibieron una irrigación de 3mL de EDTA por 3 minutos y 3 mL de NaOCl por 3 minutos. Al finalizar el procedimiento, los conductos fueron irrigados con 3 mL de agua destilada para remover los posibles residuos de sal de las soluciones irrigantes, y posteriormente secados con puntas de papel. Por último, los dientes fueron separados de nuevo en dos mitades y secados, cubiertos con oro y analizados por SEM. Se obtuvieron nuevas imágenes de la misma área preseleccionada y pre-fotografiada. Las imágenes tomadas a 1000x fueron evaluadas con el software ImageJ versión 1.47 para identificar y calcular el porcentaje de área de tubulillos dentinarios abiertos en relación con el área total de la imagen analizada. Como resultado obtuvieron que, para todos los grupos, el porcentaje con mayor cantidad de tubulillos dentinarios expuestos se encontró en el tercio cervical, seguido por el tercio medio y el tercio apical. Al comparar los tercios, los resultados de diferentes grupos fueron similares ( $p>0.05$ ) a excepción del tercio cervical ( $p<0.001$ ), donde el mayor porcentaje de tubulillos dentinarios abiertos se observó en las muestras del grupo 2 a comparación del grupo 4 ( $p=0.02$ ). Cuando la media del porcentaje de tubulillos dentinarios abiertos de todos los tercios de todos los grupos se comparó, una diferencia significativa se observó en los grupos 2 y 4 ( $p=0.018$ ).

## **I.II Justificación**

El NaOCl es el irrigante de elección para el tratamiento de conductos debido a su alta capacidad bactericida y de disolución de tejido orgánico; sin embargo, causa desnaturalización del colágeno dentinario, además de ser altamente tóxico para los tejidos periapicales. Por otro lado, el EDTA puede llegar a comprometer la integridad mecánica de la dentina, lo cual puede favorecer la adhesión bacteriana.

Las nanopartículas de quitosano han sido estudiadas para comprobar su efecto antibacteriano e inhibidor de adhesión bacteriana a superficies dentinarias, con resultados favorables y convenientes para el tratamiento de conductos; sin embargo, aun no se ha comprobado su efecto quelante para uso en endodoncia.

El presente trabajo de investigación ayudará a comprender mejor la interacción de las nanopartículas de quitosano con la biopelícula bacteriana, así como su efecto quelante para el tratamiento de conductos después de la instrumentación, en una situación *in vitro*.

### **I.III Objetivos**

#### **I.III.I Objetivo general**

Evaluar la actividad antibacteriana y capacidad quelante de las nanopartículas de quitosano de bajo peso molecular y alto grado de desacetilación mediante ensayos *in vitro*.

#### **I.III.II Objetivos específicos**

1. Sintetizar nanopartículas de quitosano de bajo peso molecular, mediante método de gelación iónica.
2. Caracterizar las nanopartículas de quitosano de bajo peso molecular mediante dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) para verificar su tamaño, dispersión de tamaño y potencial Zeta.
3. Caracterizar las nanopartículas de quitosano de bajo peso molecular mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido (STEM, por sus siglas en inglés), para verificar su tamaño y forma.
4. Caracterizar las nanopartículas de quitosano de bajo peso molecular mediante espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés).
5. Caracterizar las nanopartículas de quitosano de bajo peso molecular mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés).
6. Evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de las nanopartículas de quitosano al 0.1% contra el *E. faecalis*, mediante un ensayo por método de macrodilución.

7. Evaluar *in vitro* la capacidad quelante de las nanopartículas de quitosano al 0.1% mediante espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP, por sus siglas en inglés).

#### **I.IV Hipótesis**

**Hipótesis de trabajo:** Las nanopartículas de quitosano al 0.1% como irrigante disminuyen la cantidad de Ca y Mg después de la preparación químico-mecánica en dientes de humano extraídos.

**Hipótesis nula:** Las nanopartículas de quitosano al 0.1% como irrigante final no disminuyen la cantidad de Ca y Mg después de la preparación químico-mecánica en dientes de humano extraídos.

## **CAPÍTULO II: TEORÍA GENERAL**

### **II El tratamiento de conductos**

El principal objetivo del tratamiento endodóntico es la prevención o tratamiento de la periodontitis apical, mediante la prevención o eliminación de la infección microbiana del sistema de conductos radiculares (5). La remoción de remanentes de tejido pulpar, microorganismos, así como toxinas bacterianas del sistema de conductos, es esencial para el éxito de la terapia endodóntica y es ampliamente aceptable que la forma para lograrlo se basa en la limpieza y conformación del sistema de conductos radiculares, ya que, los microorganismos que permanecen en el conducto radicular después del tratamiento o que por alguna razón lo vuelven a colonizar después de la obturación, son la principal causa del fracaso endodóntico, por lo tanto, la desinfección debe optimizarse (6).

Es imposible limpiar y conformar los conductos radiculares en su totalidad por la complejidad anatómica que estos presentan (7). Aún con el uso actual de la instrumentación rotatoria, los instrumentos actúan sólo a nivel central del conducto radicular dejando aletas e istmos sin tocar después de la completa preparación de los mismos (8).

Se ha demostrado que el pronóstico de éxito de un tratamiento endodóntico aumenta entre el 10 y 26% cuando se obtiene un cultivo negativo antes de la obturación (9). En caso de necrosis pulpar o de periodontitis perirradicular, la desinfección deberá considerarse como un paso crucial durante el tratamiento endodóntico, ya que se ha demostrado que durante la obturación nunca se logra un sellado total de la compleja anatomía interna del conducto radicular, la cual, en caso de contener tejido infectado, aún con la presencia del material de obturación, no evitará el fracaso endodóntico (10).

Los agentes irrigantes intraconducto aumentan la eliminación bacteriana y facilitan la remoción de tejido necrótico y partículas de dentina del conducto radicular, además, previenen el empaquetamiento de tejidos duros y blandos infectados, tanto en el área apical radicular como en tejidos periapicales (11).

### **II.I Biopelícula en el sistema de conductos.**

La biopelícula bacteriana se define como comunidades estructuradas de células adheridas a una superficie orgánica y establecidas en una matriz extracelular (12). La capacidad de formar biopelícula no parece restringirse a ningún tipo específico de microorganismos y en la actualidad, se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas la inmensa mayoría de las bacterias, independientemente de la especie, pueden existir dentro de biopelículas adheridas a la superficie en una interfase sólido/líquida, incluyendo organismos importantes en muchas enfermedades. Esta adhesión a una superficie húmeda ya sea inerte o viviente, es de carácter irreversible, esto es, la biopelícula no se logra remover mediante un lavado suave (5).

### **II.II Composición de la biopelícula.**

Aunque la composición de la biopelícula es variable, en general, el componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz de la biopelícula se encuentra principalmente formada por exopolisacáridos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ADN y productos diversos, procedentes de la lisis de origen bacteriano (5).

La unidad estructural básica de la biopelícula, las microcolonias, se forma por las células bacterianas que se adhieren a la superficie. La matriz que los rodea se compone por proteínas,

polisacáridos, ácidos nucleicos y sal, lo cual corresponde al 85% del volumen, y el otro 15% corresponde a las células (13).

Conforme la biopelícula madura, su composición y estructura se modifica dependiendo de las condiciones ambientales (condiciones de crecimiento, movimientos de los fluidos, propiedades fisicoquímicas del sustrato, nutrientes disponibles, etc.). Los canales de agua representan un sistema circulatorio primitivo de la biopelícula (13).

Estas microcolonias tienden a desalojarse de la comunidad de la biopelícula y tienen un gran impacto en infecciones bacterianas crónicas (13).

### **II.III Hipótesis de formación de biopelícula en el conducto radicular.**

Es razonable asumir que las precondiciones para la formación de la biopelícula en el conducto radicular varían dependiendo de la causa de la degeneración pulpar. Un daño isquémico por trauma, provocando la necrosis pulpar, comúnmente provee totalmente los prerrequisitos para la fase de colonización por medio de una lesión cariosa hacia el espacio de la pulpa dental. Después, la lesión inflamatoria quizá retroceda sucesivamente hacia el ápice, posiblemente en licuefacción, y provea el vehículo fluido por el cual los organismos planctónicos invaden, pueden multiplicarse y establecer su unión a las paredes del conducto radicular. Posiblemente después de la primera formación de biopelícula que produce el proceso infeccioso, gane suficiente poder para causar la subsecuente destrucción del tejido pulpar (5).

En algún punto en el proceso de destrucción hay una etapa donde la masa bacteriana es atacada por los mecanismos de defensa del huésped. La zona de demarcación quizá se encuentre cerca de la salida del conducto radicular, en el foramen apical, o como se ha demostrado con el

microscopio electrónico de barrido, en la superficie externa de la raíz cerca del foramen apical (5).

Los conductos radiculares no siempre se encuentran llenos de fluido, ya que los conductos de dientes con pulpas necróticas con frecuencia se encuentran secos. Por lo tanto, la cuestión es si las condensaciones bacterianas en la estructura de la biopelícula pueden desarrollarse o ser retenidas en sitios del sistema de conductos radiculares, cerca o en la zona de interfase inflamatoria, donde las proteínas derivadas del huésped y bacterianas produzcan sustancias adhesivas que provean de los prerequisites adecuados (12).

La infección microbiana del conducto radicular ha sido documentada como la etiología de la patosis perirradicular. La biopelícula crece sobre las superficies radiculares como se ha demostrado en dientes con periodontitis apical crónica y dientes con periodontitis apical resistente al tratamiento de endodoncia. La organización de bacterias en biopelículas se ha encontrado en áreas inaccesibles o en espacios con pulpa necrótica y lagunas de resorción en el cemento. El crecimiento de ésta siempre se encuentra en un ambiente competitivo, los organismos de la biopelícula generalmente tienen una tasa metabólica baja y tienden a ser muy resistentes a las sustancias antimicrobianas. Los polímeros cargados negativamente en la matriz pueden neutralizar agentes oxidantes fuertes, haciendo difícil para ellos la penetración y el ataque a los microorganismos. Por la proximidad entre las células bacterianas en la biopelícula, el intercambio de ADN realmente toma lugar y puede transferir rápidamente la resistencia antibiótica. Sin embargo, las sustancias antimicrobianas que fácilmente matan a los organismos flotantes no han mostrado la misma efectividad en los organismos dentro de la biopelícula. Estas

propiedades de la biopelícula ayudan a explicar la naturaleza crónica y la resistencia de algunas infecciones endodónticas (5).

Por otro lado, la matriz extracelular tiene el potencial de proteger a las bacterias residentes de dos maneras: Primero, actuando como barrera física contra los agentes antimicrobianos; y segundo, neutralizando los efectos químicos de los agentes antimicrobianos. Las células bacterianas que crezcan en una biopelícula y que sean expuestas a cierto grado de estrés o a antimicrobianos débiles, formarán un tipo de células sobrevivientes llamadas “bacterias persistentes”. Cuando el estrés disminuye, las bacterias persistentes crecen rápidamente en presencia de nutrientes. Las biopelículas son ricas en bacterias persistentes; estas bacterias pueden sobrevivir al tratamiento de conductos y proliferar en la fase de post-tratamiento (14).

#### **II.IV Papel del *E. faecalis* en la biopelícula.**

Una propiedad clínica importante de los microorganismos endodónticos es su habilidad para formar biopelículas. Diferentes especies bacterianas se han aislado de infecciones endodónticas, sin embargo, el *E. faecalis* es la única especie que ha sido ampliamente estudiada por su capacidad para formar biofilms y estar presente en las infecciones secundarias/persistentes (13).

El *E. faecalis* es un coco Gram-positivo, que puede encontrarse solo, en pares, o en cadenas cortas. Son anaerobios facultativos, lo que significa que tienen la habilidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno. Puede crecer en pH extremadamente alcalino, ambientes con alta concentración de sal, a temperaturas de 10 a 45 °C, e incluso sobrevivir a una

temperatura de 60 °C por 30 minutos. Su prevalencia en infecciones endodónticas persistentes va de un 24 a un 77%. El *E. faecalis* tiene la habilidad de suprimir la acción de los linfocitos, contribuyendo potencialmente al fracaso endodóntico. La causa más común de fracaso del tratamiento de conductos es la sobrevivencia de microorganismos en la porción apical del conducto (13,15).

El *E. faecalis* dentro de los tubulillos dentinarios puede resistir la medicación intraconductos con hidróxido de calcio por más de 10 días al formar una biopelícula que ayuda a resistir la destrucción por fagocitosis, anticuerpos y antimicrobianos. El hidróxido de calcio, el medicamento intraconducto más utilizado, puede ser inefectivo para eliminar el *E. faecalis* por su cuenta, si el pH alcalino no se mantiene (13,15,16).

La facilidad del *E. faecalis* para formar biopelículas en las paredes de los conductos radiculares se ha demostrado *in vitro*. La presencia de *E. faecalis* después del tratamiento de conductos puede ser asociada a su capacidad de inducir la reprecipitación de la apatita en biopelículas maduras (13).

El desarrollo de la biopelícula por *E. faecalis* dentro del sistema de conductos consta de 3 fases:

Fase 1: Microcolonias de *E. faecalis* se adhieren a las paredes de la dentina radicular.

Fase 2: La disolución de la porción mineral del sustrato de la dentina lleva al aumento local de los iones calcio y fosfato, causando mineralización (o calcificación) de la biopelícula de *E. faecalis*.

Fase 3: Debido a esta interacción de la bacteria y sus productos metabólicos sobre la dentina, la biopelícula de *E. faecalis* se mineraliza (13).

Se han identificado más de 1000 especies bacterianas en la cavidad oral por métodos de cultivo y microbiología molecular. Específicamente, la diversidad de la microbiota endodóntica se ha revelado por múltiples estudios moleculares. En el caso de lesiones periapicales, se han encontrado más de 400 especies (17).

Los mecanismos por los cuales las biopelículas bacterianas son degradadas en el sistema de conductos radiculares no han sido aún aclarados y están sujetos a estudios. Se ha especulado que la remoción de la biopelícula podría encontrarse influenciada por un número de factores y sus interacciones, incluyendo las dimensiones del conducto, propiedades del irrigante, régimen de irrigación y las propiedades de la biopelícula. En el enfoque clínico, la remoción de la biopelícula de las áreas instrumentadas puede ser facilitada por el contacto mecánico de los instrumentos; por el contrario, en las áreas no instrumentadas, la biopelícula pudiera ser removida con la función de disolución química progresiva con una limitada cantidad de fluido (5).

#### **II.V Eliminación de la biopelícula en los conductos radiculares.**

La remoción de la biopelícula bacteriana adherente a la superficie del conducto radicular puede ser facilitada por una suficiente preparación del conducto, movimientos de la aguja durante la irrigación, el diseño de la aguja con salidas múltiples, reemplazo frecuente del irrigante y agitación del mismo con una punta de gutapercha bien ajustada o mediante algún otro método de activación sónica o ultrasónica (13).

La limpieza químico-mecánica y la obturación, efectivamente, reducen la carga bacteriana en el sistema de conductos y permite la reparación periapical en más del 80% de los

casos; sin embargo, la biopelícula apical sobrevive en un 88%. Dado que los instrumentos mecánicos sólo tocan el 61% de la superficie del conducto, el papel de la preparación del conducto ha experimentado un cambio al satisfacer no sólo la función primaria de limpieza, sino también crear un acceso para los irrigantes y los materiales de obturación para el complejo sistema de conductos radiculares (5).

La presencia de matriz extracelular y de alta densidad bacteriana (Biomasa) en la biopelícula son dos retos que se deben considerar durante el tratamiento endodóntico. En términos generales, la estrategia contra la biopelícula se centra en dos puntos: El primero, eliminar las bacterias residentes dentro de la biopelícula; el segundo, romper la biopelícula eliminando simultáneamente las bacterias residentes. Usar agentes antimicrobianos tópicos en diferentes momentos del tratamiento endodóntico, con diferentes métodos de administración (Irrigación), ayuda a reducir la biomasa bacteriana (14).

## **II.VI Dentina: Estructura y composición.**

La dentina se considera tejido conectivo mineralizado. Dentro de su composición, así como su formación, la dentina presenta varias similitudes con el tejido óseo (18). Aproximadamente, el 45% de su volumen se compone de material inorgánico (calcio (Ca) y fósforo (P) presentes en los cristales de hidroxiapatita (19)), 33% de material orgánico (colágeno tipo I) y 22% agua. Su pH varía entre 6.4 y 7, tal como se considera normal en los tejidos (20). El espesor de la dentina (desde la pulpa hasta la unión dentina-esmalte) depende del tipo de diente, pero su rango varía generalmente entre los 2 mm para incisivos mandibulares hasta 3 mm en caninos y molares, tendiendo a aumentar como resultado de la aposición a lo largo de la

vida (21). La relación Ca/P de la hidroxiapatita es de  $\sim 1.67$  M, dependiendo el tipo de cristal, disposición de Ca, localización anatómica y técnica de determinación. Se sabe que algunos agentes químicos causan alteraciones en la estructura química de la dentina humana y cambian la relación Ca/P de la superficie dentinaria. Estas alteraciones en la relación Ca/P pueden cambiar la relación original entre los componentes orgánicos e inorgánicos, alterando así las propiedades de permeabilidad y solubilidad de la dentina, así como la adhesión de materiales dentales a los tejidos duros (19). Por otro lado, la interacción de los agentes químicos con las fases orgánica e inorgánica de la matriz dentinaria producen un efecto buffer, por lo que la acción de los agentes antimicrobianos es dependiente de tiempo y de profundidad (14).

La microestructura de la dentina está dominada por sus tubulillos, que son los responsables de alojar los procesos odontoblásticos. Los tubulillos se extienden desde la pulpa hasta la unión dentina-esmalte. Un collar altamente mineralizado de dentina peritubular rodea el lumen de cada tubulillo y contiene mayormente cristales de apatita y una pequeña proporción de proteínas. El tejido que se encuentra entre los tubulillos dentinarios se le denomina dentina intertubular y contiene una matriz de fibras de colágeno tipo I reforzadas con apatita (21,22).

Los tubulillos dentinarios poseen un diámetro cuyo rango aproximado varía entre 1 a 3  $\mu\text{m}$ , dependiendo la edad del paciente. Algunos estudios han demostrado que después de la tercera década de vida hay una transición en la microestructura de la dentina, en donde los tubulillos se llenan gradualmente con material inorgánico. Después de que un número considerable de tubulillos se llenan, el tejido se aprecia transparente y es considerado como “esclerótico”. Este proceso favorece al aumento del contenido mineral de la dentina, opuesto a

lo que sucede en el hueso donde hay una disminución de contenido mineral mientras la edad aumenta (21).

La naturaleza tubular de la dentina le da cierta porosidad y la hace susceptible a invasión bacteriana. El grado de penetración bacteriana varía en diferentes regiones de la dentina y en número de tubulillos permeables. La inhabilidad de los agentes antimicrobianos de penetrar tubulillos dentinarios infectados favorece la sobrevivencia de poblaciones bacterianas dentro de la dentina (14).

## **II.VII Agentes irrigantes para el tratamiento de conductos.**

La irrigación se define como “lavar una cavidad corporal o herida con agua o con solución medicada”. Los objetivos de la irrigación en endodoncia son: mecánicos, químicos y biológicos. Los objetivos mecánicos y químicos son:

- Remover debris dentinario.
- Lubricar el conducto
- Disolver tejido orgánico e inorgánico
- Prevenir la formación de smear layer durante la instrumentación o disolverlo una vez que se ha formado.

Mientras que los objetivos biológicos son:

- Tener alta eficacia contra microorganismos anaerobios y facultativos en su estado planctónico y en biopelícula.
- Tener la habilidad de inactivar endotoxinas.
- No ser tóxicos en contacto con tejidos vivos.

- Tener poco potencial de causar reacción anafiláctica (11).

Los agentes irrigantes antimicrobianos se pueden clasificar en dos: Agentes químicos y agentes no-químicos. Dentro de los agentes químicos más utilizados durante el tratamiento de conductos debido a sus propiedades son el NaOCl y el (EDTA).

### ***II.VII.I Hipoclorito de Sodio***

El NaOCl es un compuesto químico, conocido comúnmente como cloro, es un agente desinfectante frecuentemente utilizado. Es el irrigante de elección durante el tratamiento de conductos debido a su amplio espectro bacteriano en combinación con su capacidad de disolver tejido necrótico/pulpar. Entre las características del NaOCl, se encuentran:

- Efectivo agente antimicrobiano.
- Excelente solvente de tejido orgánico.
- Lubricante.
- Es de acción rápida.

Entre las limitaciones del NaOCl, se encuentran:

- Altamente tóxico.
- Corrosivo, con olor desagradable.
- Sólo remueve la parte orgánica del smear layer (11).

### ***II.VII.II Mecanismo de acción del NaOCl.***

El efecto del NaOCl sobre bacterias y tejidos remanentes se puede resumir en tres diferentes reacciones:

1. Reacción de cloraminación: El NaOCl degrada e hidroliza proteínas de los tejidos. Cuando el ácido hipocloroso (HOCl) entra en contacto con tejido orgánico, libera iones clorina, que se combina con las proteínas moleculares para formar cloramina (el hidrógeno en los grupos amino (-NH-) es reemplazado por clorina (-N.Cl-)) (14). La cloramina interfiere con el metabolismo de la pared celular bacteriana. Además, la clorina oxida irreversiblemente el grupo sulfhidrilo de las enzimas bacterianas. Después, el tejido necrótico y pus se disuelven y el agente antimicrobiano puede alcanzar y limpiar las áreas desinfectadas. Además de sus aplicaciones como agente irrigante en endodoncia, el NaOCl es comúnmente utilizado para desproteinizar tejidos duros para aplicaciones biomédicas (9).
2. Reacción de neutralización: El NaOCl siendo una base fuerte de  $\text{pH} > 11$ , tiene un efecto de neutralización. El alto pH le permite al NaOCl tener efectos antibacterianos debido a diferentes mecanismos. Los iones hidroxilo desnaturalizan y alteran la permeabilidad de la membrana bacteriana, inhibe la actividad enzimática, altera el metabolismo celular, y degrada fosfolípidos, lo cual lleva a la muerte celular. Con la salida de iones hidroxilo, hay una reducción del pH, lo cual reduce la eficacia del antimicrobiano básico (14). Cuando la clorina se disuelve en agua y entra en contacto con materia orgánica, forma ácido hipocloroso. Es un ácido débil con fórmula química HClO. El HClO es un oxidante. Este ácido actúa como solvente, liberando clorina que se combina con las cloraminas (reacción de cloraminación). El ácido hipocloroso y los iones de hipoclorito llevan a la degradación de aminoácidos e hidrólisis (11).

3. Reacción de saponificación: El NaOCl altera la permeabilidad de la membrana celular al degradar los ácidos grasos de la pared celular bacteriana (14).

Actualmente no existe un consenso en la concentración óptima requerida del NaOCl para la desinfección del sistema de conductos. Las investigaciones demuestran que la irrigación con NaOCl con bajas y altas concentraciones son igual de efectivas. Sin embargo, hay estudios que promueven aumentar la temperatura del agente hasta 45 °C o realizar algún tipo de agitación o movimiento del mismo dentro del sistema de conductos (por ejemplo, el uso de ultrasonido) para mejorar su efecto antibacteriano (5,14)

#### ***II.VII.I.II Efecto del NaOCl sobre dentina.***

La dentina está compuesta por aproximadamente 22% de materia orgánica. La mayoría consiste en colágeno tipo I, que contribuye considerablemente a las propiedades mecánicas de la dentina (11). Se sabe que el NaOCl puede separar largas cadenas peptídicas, así como pasar por un proceso de cloraminación a los grupos terminales de las proteínas. Por consiguiente, el NaOCl puede afectar las propiedades de la dentina debido a la degradación de sus componentes orgánicos (23).

Existen varios reportes de los efectos adversos del NaOCl sobre las propiedades físicas de la dentina, como la fuerza flexural, el módulo de elasticidad y microdureza. Estos cambios en las propiedades físicas vienen no sólo por los cambios en la fase inorgánica, sino también en la fase orgánica (24). Una exposición de 2 horas del NaOCl a la dentina, en concentraciones mayores al 3% disminuye significativamente el módulo de elasticidad y fuerza flexural de la dentina, a comparación de la solución salina (25).

### ***II.VII.I.III Efecto del NaOCl sobre la biopelícula.***

En el estudio de Clegg *et al.* (26), se reportó que el NaOCl al 6% era el único agente capaz de remover biopelícula artificial y eliminar bacterias. Encontraron que el NaOCl posee un efecto dosis-dependiente: a mayores concentraciones, el agente presentaba mayor efecto antibacterial; por el contrario, a menor concentración del NaOCl, existía mayor sobrevivencia bacteriana. Los efectos antibiopelícula del NaOCl pueden ser resultado de la remoción del tejido orgánico, además de eliminar la adhesión bacteriana hacia la dentina y otros organismos.

Giardino *et al.* (27) evaluaron la eficacia del NaOCl al 5.25% y el MTAD (mezcla de doxiciclina, ácido cítrico y detergente Tween 80) contra biopelícula de *E. faecalis* y encontraron que sólo el NaOCl al 5.25% puede desintegrar y remover la biopelícula. En términos generales, el NaOCl es el único agente irrigante que puede desestabilizar y remover la biopelícula del sistema de conductos.

Aunque el NaOCl aparente ser el agente irrigante endodóntico ideal, no puede disolver partículas de dentina y por consiguiente prevenir la formación del smear layer durante la instrumentación. Por lo tanto, se recomienda utilizar un agente desmineralizante o quelante como coadyuvante de la terapia endodóntica (6).

### ***II.VII.II EDTA: Agente quelante***

La quelación se define como un proceso donde interactúan agentes químicos formando complejos solubles con ciertos iones metálicos, uniendo los iones para que no reaccionen con otras moléculas o iones. Durante la terapia endodóntica, agentes quelantes de calcio como el EDTA al 17% (580 mM) se utiliza para disolver los componentes inorgánicos del smear layer

que el NaOCl no puede disolver (28). Las siglas EDTA corresponden al acrónimo del compuesto ácido etilendiaminotetracético; es un ácido poliamino carboxílico cuya fórmula es  $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]_2$  (Figura 1). Se le considera como un agente quelante debido a su habilidad para “secuestrar” iones metálicos di- y tri-catiónicos como el  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ . Después de ser ligados por el EDTA, los iones metálicos permanecen en la solución, pero con reactividad disminuida (11). La sal disódica de EDTA a una concentración del 17% y pH neutro es la forma más recomendada para ser utilizada en el tratamiento de conductos (29).

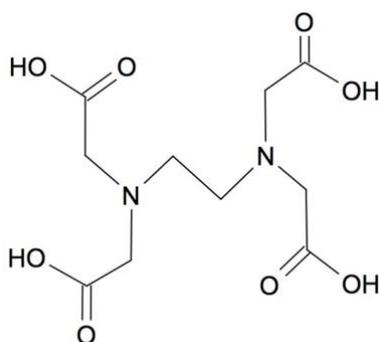


Figura 1. Estructura química del EDTA.

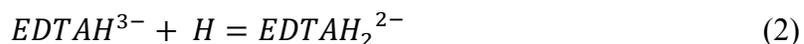
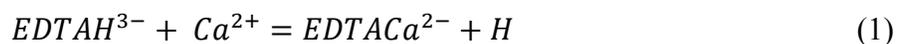
### ***II.VII.III.1 Mecanismo de acción del EDTA.***

Los agentes quelantes pueden separar biopelículas adheridas a las paredes del conducto debido a que extraen proteínas de la superficie bacteriana al combinarse con iones metálicos de la membrana celular, lo cual puede llevar eventualmente a la muerte bacteriana (6,30,31). Adicionalmente, los agentes quelantes como el EDTA forman un complejo estable con el calcio. Cuando todos los iones se encuentran acoplados, se forma un equilibrio y no pueden disolverse posteriormente; por lo tanto, se considera al EDTA como agente autolimitante. Esta limitación se cree se debe a los cambios en el pH durante la desmineralización de la dentina. Bajo

condiciones neutrales, la mayoría de los quelantes tienen un pH cerca de la neutralidad (7.3 a 7.4 (32)) y el 99% del EDTA se encuentra presente como EDTAHNa<sub>3</sub>. El intercambio de calcio dentinario por hidrógeno resulta en una disminución del pH. Debido a la liberación de ácido, la eficiencia del EDTA disminuye con el tiempo; por otro lado, la reacción del ácido con hidroxiapatita afecta la solubilidad de la dentina.

Químicamente, dos reacciones se pueden distinguir: formación de complejo (

(1) y protonación ( (2) (33):



Conforme la reacción procede, se acumula ácido y la protonación del EDTA prevalece ( (2), disminuyendo la tasa de desmineralización. El EDTA tiene cuatro grupos carboxilos y dos amino, teniendo un total de 6 sitios de unión para la formación de complejos con iones metálicos y así denominándolo ligando hexadentado (Figura 2)(31).

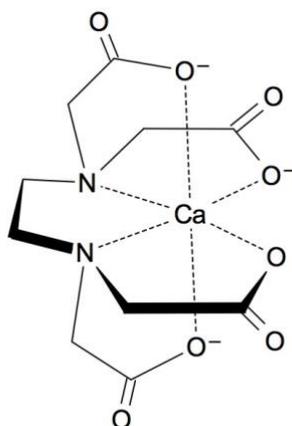


Figura 2. Sitios de unión del EDTA a iones Ca.

El smear layer se produce por la instrumentación de los conductos. Esta estructura amorfa está compuesta tanto por componentes orgánicos como inorgánicos, y puede ocluir la entrada de los tubulillos dentinarios. Debido a que el smear layer evita la penetración de agentes irrigantes, medicación y materiales de obturación dentro de los tubulillos, incluso impide su contacto con las paredes del conducto, muchas investigaciones proponen su remoción (34). El EDTA por sí sólo no puede remover el smear layer de forma efectiva; se necesita utilizar un componente proteolítico (NaOCl) previo para remover los componentes orgánicos del smear layer. Se puede remover el smear layer en menos de 1 minuto si la solución tiene contacto con la superficie de las paredes del conducto. Para la preparación mecánica, el EDTA tiene poco valor como agente irrigante. Puede abrir un conducto estrecho si se le da el tiempo de reblandecer los 50  $\mu\text{m}$  que es capaz de descalcificar (11).

### ***II.VII.II.II Efecto del EDTA sobre dentina.***

Idealmente, después de la irrigación el sistema de conductos debe quedar libre de debris orgánico, microorganismos y de smear layer. Además, las bacterias que penetraron a los tubulillos dentinarios deben haber sido eliminadas, mientras que las características de la dentina (fuerza, composición, etc.) no deben haberse visto afectadas de manera negativa. Algunos estudios indican que la utilización de NaOCl y EDTA juegan un papel importante en determinar el nivel de erosión de las paredes de los conductos. A pesar de que la erosión comienza después de 1 minuto de exposición al NaOCl, no se sabe con precisión si esta erosión es perjudicial para la dentina radicular y el diente (35). Es bien conocido que el componente mineral en tejido conectivo duro contribuye al módulo de elasticidad y fuerza, mientras que el colágeno es

responsable de la resistencia (36). En teoría, la erosión puede ser un factor de contribución a fracturas radiculares verticales dependiendo de la profundidad de la erosión, espesor de la raíz y la cantidad de dentina esclerótica en la raíz. Sin embargo, la erosión puede también ayudar en obtener una pared del conducto limpia, libre de debris y bacterias (11).

Basrani & Haapasalo (11) proponen la siguiente secuencia de irrigación durante el tratamiento de conductos: Utilizar NaOCl al 5.25% - 6% durante la instrumentación; después de terminar la instrumentación, realizar una irrigación final con EDTA al 17% por 2 minutos.

### ***II.VII.II.III Efecto del EDTA sobre la biopelícula.***

La naturaleza aniónica y negativamente cargada de los polisacáridos extracelulares de la biopelícula favorece la interacción con iones polivalentes y cargados positivamente, tales como el  $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{Mg}^{+2}$  (28). La unión con Ca favorece al endurecimiento de la biopelícula, por lo que los agentes quelantes, como el EDTA pueden favorecer a la desorganización de la matriz y al rompimiento de los enlaces catiónicos, incluso hay autores que aseguran que el tratamiento de EDTA durante 24 horas puede erradicar la biopelícula (37). Sin embargo, es importante aclarar que este tiempo de acción no es viable durante el tratamiento de conductos, por lo que el efecto del EDTA sobre la biopelícula puede ser limitado o nulo (28).

### ***II.VII.III Nanopartículas como agentes irrigantes en Endodoncia.***

La nanotecnología es una ciencia que está emergiendo como campo interdisciplinario con un desarrollo rápido y se ha convertido en una herramienta poderosa para varias aplicaciones biomédicas, tales como la regeneración tisular, transporte de fármacos, biosensores,

transferencia de genes e imagenología. La nanotecnología puede usarse para sintetizar y fabricar biomateriales avanzados con propiedades físicas, químicas y biológicas únicas (1).

El término “nanomateriales” hace alusión a un material natural, incidental o sintético que contiene partículas ya sean sin ligar, como agregado o aglomerado, en donde el 50% o más de las partículas en número, tamaño, distribución, o 1 o más dimensiones externas se encuentran en el rango de 1-100 nm (38). Los nanomateriales ofrecen propiedades fisicoquímicas únicas, tales como partículas ultrapequeñas, radio grande de área de contacto/masa, y alta actividad de reacción química, a comparación de sus contrapartes a granel (39,40).

El uso de nanopartículas como agentes antimicrobianos ha traído bastante atención en el área de la salud debido a sus propiedades antibacterianas comparadas con otros agentes antimicrobianos con poco potencial de producir resistencia microbiana, además de poseer un amplio espectro de acción antimicrobiana (40). La actividad antimicrobiana de las nanopartículas contra distintos organismos es diferente a la que presentan en su forma a granel (40), y puede variar dependiendo los diferentes tipos de nanopartículas.

La eficacia de las nanopartículas para eliminar células bacterianas se le atribuye al efecto de concurrencia entre dos mecanismos distintos. Uno de ellos se relaciona con la unión de las nanopartículas a las membranas celulares de las bacterias diana a través de fuerzas electroestáticas: La interacción de nanopartículas cargadas positivamente y la pared bacteriana cargada negativamente permite que un gran número de nanopartículas se acumulen en la membrana bacteriana. Esta interacción causa una alteración en el potencial de membrana, despolarización y eventual pérdida de la integridad de la membrana (40). El resultado conlleva a una alteración de las funciones celulares como respiración, transportación de nutrientes y

alteraciones en la transducción de energía, llevando subsecuentemente a la muerte de la célula bacteriana (41). El segundo mecanismo involucra la producción de radicales libres de oxígeno que influye en la sobrevivencia de la célula bacteriana al bloquear la función proteica, destruyendo su ADN y terminando en un exceso de producción de radicales (42). Nanomateriales de distintas composiciones químicas, como fulerenos, nanotubos de carbón y nanopartículas metálicas han demostrado inducir estrés oxidativo (43).

### ***II.VII.III.I Nanopartículas de quitosano.***

Las nanopartículas poliméricas han ganado el interés de muchos investigadores debido a su biocompatibilidad y propiedades antimicrobianas (44), siendo las NPQ una de las más comúnmente investigadas en endodoncia. El quitosano ha sido propuesto para eliminar las bacterias remanentes después de la irrigación, promover la remineralización de la dentina, así como aumentar la resistencia a la degradación de colágeno (44). El quitosano es un biopolímero que se obtiene a partir de la N-desacetilación de la quitina en medio alcalino y se considera uno de los polímeros más abundantes, después de la celulosa (41,45). La composición química de la quitina es poli ( $\beta$ -(1-4)-N-acetyl-D-glucosamina), y se puede encontrar en la naturaleza en forma de microfibras cristalinas que a su vez conforman el componente estructural del exoesqueleto de artrópodos, crustáceos (como cangrejos y camarones) o en las paredes celulares de hongos, donde apoya en funciones donde la dureza y el reforzamiento se necesitan (45,46). Para obtener la quitina, los caparzones de los crustáceos pasan primero un proceso de desmineralización (con ácido clorhídrico), donde se obtiene carbonato de calcio y fosfato de calcio; seguido de un proceso de desproteinización (con hidróxido de sodio) y decoloración (con

acetona e NaOCl). Por último, la quitina pasa por un proceso de deacetilación con soluciones de hidróxido de sodio de alta concentración (40-50%) y a altas temperaturas (100-150 °C), por una hora. La deacetilación de la quitina también se puede realizar con enzimas, como la N-deacetilasa o con microorganismos que la secreten (47). El producto de la deacetilación de la quitina produce una nueva fórmula que consiste en un copolímero (1-4)-2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucano y (1-4)-2-acetamida-2-deoxy- $\beta$ -D-glucano, conocido como quitosano (41) (Figura 3).

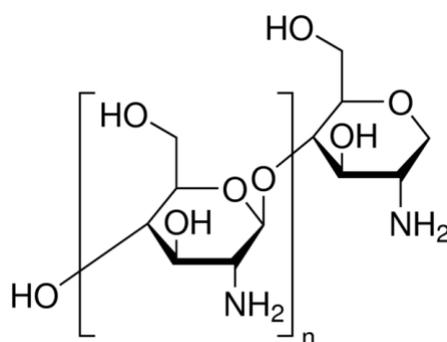


Figura 3. Representación esquemática de la estructura primaria del quitosano.

*Disolventes del quitosano:* Se disuelve fácilmente en soluciones diluidas de la mayoría de los ácidos orgánicos tales como: ácido fórmico, acético, cítrico y tartárico, y también en ácidos minerales diluidos a excepción del ácido sulfúrico (47,48).

*Grado de deacetilación:* Varía desde un 60% hasta un 90% (48).

*Peso molecular:* Varía desde 50 hasta 2000 kDa (48).

#### **II.VII.III.1.1 Mecanismo de acción de las nanopartículas de quitosano.**

A pesar de que la eficacia antimicrobiana del quitosano ha sido evaluada por muchos investigadores, el mecanismo antibacteriano del quitosano no ha sido bien establecido. Se han postulado algunas hipótesis, basado en su naturaleza catiónica (49). El quitosano de bajo peso

molecular tiene la habilidad de penetrar la membrana celular bacteriana y unirse al ADN, inhibiendo su transcripción y síntesis de ARNm, mientras que el quitosano con alto peso molecular se cree que se une a los componentes cargados negativamente de la pared celular bacteriana, formando una capa impermeable y bloqueando la transportación hacia la célula (50). Otra hipótesis sobre los mecanismos antibacterianos del quitosano considera que se debe al resultado de su habilidad para ligarse a la membrana de la pared celular bacteriana cargada negativamente, aumentando su permeabilidad, lo que conlleva a la salida de contenido citoplasmático y muerte bacteriana (51). Otros postulan que el quitosano tiene la habilidad de inhibir la actividad enzimática por quelación metálica (52).

El peso molecular, el pH del medio y el grado de desacetilación juegan un papel importante en la eficacia antibacteriana del quitosano. Cuando el peso molecular del quitosano disminuye, su actividad antibacteriana aumenta. Un  $\text{pH} < 6.3$  aumenta la actividad antibacteriana y cuando el grado de desacetilación es más alto también aumenta la actividad antibacteriana (53,54).

En endodoncia, el uso de NPQ como agente antimicrobiano ha sido investigado contra algunos patógenos endodónticos. Kishen (3) y Shertha (55) mostraron que las NPQ pueden eliminar completamente el *E. faecalis* en estado planctónico, y puede causar una reducción significativa de las bacterias en estado de biopelícula (56).

Las NPQ (Figura 4) pueden ser utilizadas como transportadoras de fármacos (49). Esta propiedad fue investigada por Shertha y Kishen al conjugar un material fotosensible (rosa de bengala) a la estructura del quitosano y después evaluaron sus propiedades antimicrobianas

contra biopelículas de *E. faecalis*, *Streptococcus oralis*, *Prevotella intermedia*, y *Actinomyces naeslundii* (56). Ellos demostraron que tal conjugación puede destruir la membrana celular bacteriana de las especies investigadas y pueden penetrar profundo a la estructura de la biopelícula de las especies investigadas reduciendo el espesor de la biopelícula y el número de células microbianas (57).

Las propiedades quelantes del quitosano han sido reportadas durante el tratamiento de aguas negras. Dos

teorías tratan de explicar el mecanismo por el cual el quitosano funge como quelante. El primero, el modelo del

puente sugiere que dos o más grupos amino del quitosano se ligan al mismo ion metálico. El segundo, el modelo del pendiente, que sugiere que un grupo amino es el responsable de ligar como si fuese un arete o pendiente. Cualquiera de los dos mecanismos puede ser responsable por la quelación de los iones calcio en la dentina, así como la porción inorgánica del smear layer (2).

### **I.IX Técnicas *in vitro* para evaluar la capacidad quelante de soluciones irrigantes para el tratamiento de conductos.**

Existen en la literatura varias técnicas *in vitro* para evaluar la capacidad quelante de las soluciones irrigantes, las cuales enlistaremos y describiremos brevemente clasificándolas por técnicas cuantitativas y técnicas cualitativas.

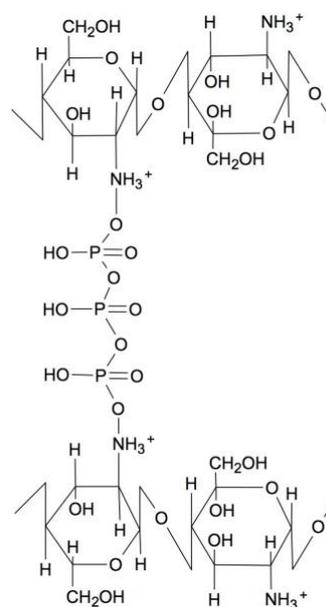


Figura 4. Representación esquemática de la estructura primaria de las NPQ.

- **Técnicas cuantitativas.**

Las técnicas cuantitativas le permiten al investigador adquirir datos con mayor sensibilidad, especificidad y precisión, con el objetivo de construir modelos estadísticos para explicar lo que se observa.

- *Espectrómetro de energía dispersiva de rayos X.*

Esta técnica provee un análisis químico rápido y no-destructivo con una resolución a escala micrométrica. La información que genera este análisis consiste en un espectro donde muestra picos correspondientes a los elementos que componen la muestra. Esta técnica puede ser cualitativa, semi-cuantitativa y cuantitativa, dando información de la distribución espacial de los elementos a través de un mapeo. Además, es una técnica no-destructiva y las muestras requieren poca o nula preparación para su análisis. Diferentes autores (58–61) han utilizado esta técnica para evaluar el efecto descalcificante sobre dentina de diferentes agentes irrigantes, como EDTA, ácido maléico, ácido cítrico o solventes de gutapercha, buscando principalmente cambios en los niveles de Ca, P y Mg. Una desventaja de esta técnica es que las mediciones no son exactamente las mismas de manera repetida en el mismo punto, debiéndose hacer un promedio de las mediciones, además de que la porosidad de la dentina puede producir difracción secundaria, por lo que se tiene que pulir la superficie dentinaria. Otra desventaja es que para obtener las mediciones de varios elementos se deberán realizar mediciones nuevas (19).

- *Espectrometría de absorción atómica de llama.*

Esta técnica permite determinar la concentración de un elemento metálico determinado en una muestra líquida. La información que genera este análisis consiste en un espectro donde muestra picos correspondientes a los elementos que componen la muestra. Esta técnica se ha

utilizada para medir la concentración de iones Ca en agentes irrigantes (EDTA 15%, ácido cítrico 10%, citrato de sodio 10%, vinagre de manzana, ácido acético 5%, ácido maléico 5% y NaOCl 1%) después de haber estado en contacto con muestras dentales (62).

- ***Espectrometría fluorescente de rayos X dispersivos.***

Esta técnica nos permite cuantificar e identificar los elementos presentes en la muestra a una escala de ppm (mg/L). Para el análisis de las muestras dentales, es necesario pulverizarlas, lo cual no permite recuperarlas y regresarlas a su estado original. Esta técnica ha sido utilizada para evaluar los cambios en el contenido mineral (Ca, P, Mg y K) de la dentina radicular después de usar irradiación láser y 5 diferentes agentes irrigantes (Solución salina, NaOCl 5.25%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, EDTA 17%, Clorhexidina 2%) (63).

- ***Espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo.***

Esta técnica nos permite cuantificar e identificar los elementos metálicos presentes en una solución, a una escala de ppb (µg/L). Esta técnica ha sido utilizada para evaluar el contenido mineral de la dentina radicular antes y después del tratamiento con cloroformo y halotano (solventes de gutapercha) (64), así como para evaluar el efecto de diferentes soluciones irrigantes (Clorhexidina al 0.2%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, EDTA al 17%, NaOCl al 5.25%, NaOCl al 2.5%) sobre el contenido mineral de la dentina radicular (19). Una de las desventajas de esta técnica se puede observar durante la toma de muestras, ya que ambos autores proponen obtener virutas de dentina con el uso de fresas Gates-Glidden, lo cual no permite estandarizar el peso ni la profundidad del desgaste, pudiendo llevar a falsos positivos. Por último, para el análisis de las muestras dentales, es necesario digerirlas en una solución de HNO<sub>3</sub>, por lo que no se pueden recuperar.

- **Técnicas cualitativas.**

El objetivo de estas técnicas es evaluar la presencia o ausencia de ciertos elementos, cuando no es necesario cuantificarlos.

- *Microscopía electrónica de barrido.*

Probablemente, la técnica más utilizada es la microscopía electrónica de barrido. Esta técnica permite analizar a detalle la morfología de la superficie de la muestra, dándonos una apariencia tridimensional bajo un efecto de iluminación. Facilita el análisis de los materiales odontológicos, estudio de la forma y características de la dentina, calcoesferitas, cuantificaciones de túbulos dentinarios, superficie del esmalte o cemento radicular. Asimismo, permite evaluar y comparar la calidad del conducto después de la utilización de instrumentos manuales o rotatorios, los efectos de diferentes soluciones irrigantes sobre la dentina, o la microestructura del biofilm, entre otros. La resolución de un microscopio electrónico de barrido es de 25 nm (aproximadamente) y depende de la penetración del haz de electrones. Las muestras de los materiales odontológicos para ser observadas en el microscopio electrónico de barrido exigen poca preparación. Las mejores imágenes se obtienen de superficies limpias, secas, exentas de contaminantes orgánicos, con poca cantidad de humedad en la superficie, resistentes al alto vacío y con buena conductividad eléctrica. Las muestras que no tienen esas características necesitan de un recubrimiento de material conductos, que de preferencia es oro con 10 nm de espesor (65).

El método para evaluar la capacidad quelante de los agentes irrigantes por medio de microscopía electrónica de barrido ha sido reportado por varios autores (58–63), el cual consiste en adquirir micrografías de la pared del conducto en la parte central de cada tercio a una

magnificación de 1000x. Estas micrografías son evaluadas por examinadores ajenos al estudio mediante la nomenclatura: 1) Ausencia de smear layer; 2) Pocas áreas con smear layer (<33.3%); 3) Muchas áreas con smear layer (33.3-66.6%); 4) Superficie cubierta totalmente con smear layer (100%).

Con esta técnica no es posible comparar la misma superficie radicular antes y después del contacto con agentes quelantes, por lo que los grupos experimentales deberán compararse con un grupo control. Otra desventaja de esta técnica es que las muestras no se pueden recuperar debido a la deshidratación y recubrimiento previos al análisis.

- ***Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier.***

Esta técnica se utiliza ampliamente para caracterizar biomateriales ya que permite identificar la presencia o ausencia de los grupos funcionales de la muestra. Una ventaja es la facilidad y poco tiempo para realizar las mediciones. Se ha propuesto para caracterizar la degradación química de los principales componentes de dentina humana después de la exposición a agentes irrigantes como NaOCl al 2.5% y el EDTA al 17% , mediante el cambio en la intensidad de las bandas características del colágeno y fosfato (66). Una desventaja de esta técnica es que la dentina deberá ser molida y tamizada para ser analizada, además de que la intensidad de las bandas depende en cierta medida de la masa de las muestras, así que deberán analizarse muestras con la misma masa.

La Tabla 1 resume y compara los estudios antes mencionados.

Tabla 1. Tabla comparativa donde se resumen las técnicas cuantitativas y cualitativas para evaluar la capacidad quelante de diferentes agentes irrigantes.

	<b>Técnica</b>	<b>Autor/es</b>	<b>Irrigantes evaluados</b>	<b>Elementos analizados</b>	<b>Resultados</b>
<b>Técnicas cuantitativas</b>	Espectrómetro de energía dispersiva de rayos X.	Dogan <i>et al.</i> (58)	EDTA 17% RC-Prep NaOCl 2.5%	Ca P Mg	El ratio Ca/P aumentó usando quelante + NaOCl. Utilizar únicamente el quelante no cambia el ratio Ca/P. Los niveles de Mg disminuyeron utilizando el quelante. Los niveles de Mg aumentará usando quelante + NaOCl.
		Vasudev Ballal <i>et al.</i> (59)	EDTA 17% Ácido maleico 7% NaCl 0.9%	Ca PO Mg Na S O	Ácido maléico disminuyó los niveles de Ca y PO, solo a los 5 minutos fue significativa estadísticamente. Solución salina también disminuyó los niveles de Ca y PO pero no fue significativo. Niveles de O, S y Mg también disminuyeron significativa más en solución salina que en MA y EDTA en todos los tiempos.
		Kaufman <i>et al.</i> (60)	Cloroformo Xylol Endosolv-E NaCl 0.9%	Ca P	Cloroformo aumentó los niveles de P después de 15 min, y los niveles de Ca y P después de 15 min. Xileno aumentó los niveles de Ca después de 30 min y los de P después de 15 y 30 min. Endosolv-E aumentó los niveles de C y P a los 15 y 30 min. Ninguno de estos cambios fueron estadísticamente significativos.

		Douillard <i>et al.</i> (61)	Ácido cítrico 10%	Ca P Mg	El ratio Ca/P no aumentó usando ácido cítrico. Los niveles de Ca y P disminuyeron después del tratamiento, con diferencia estadísticamente significativa..
	Espectrometría de absorción atómica de llama.	Emboava Spanó <i>et al.</i> (62)	EDTA 15% Ácido cítrico 10% Citrato de sodio 10% Vinagre de manzana Ácido acético 5% Ácido maleico 5%	Ca	El EDTA al 15% después del contacto con dientes uniradiculares presentó mayor concentración de iones Ca, seguido de ácido cítrico 10%, vinagre de manzana, ácido acético 5% y ácido maléico 5%.
	Espectrometría fluorescente de rayos X dispersivos.	Gurbuz <i>et al.</i> (63)	NaCl 0.9% NaOCl 5.25% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% EDTA 17% Clorhexidina 2% Irradiación con Nd:YAG	Mg P K Ca	Los niveles de Ca disminuyeron en todos los grupos, menos con el uso del láser. El ratio Ca/P no se modificó en ningún grupo. El grupo EDTA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y láser removieron la mayor cantidad de smear layer.
	Espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo.	Erdemir <i>et al.</i> (19)	Cloroformo Halotano	Ca P Mg K S	Disminuyeron las concentraciones de Ca después del tratamiento con halotano. Las concentraciones de Ca después de Cloroformo aumentaron significativamente. Los niveles de P disminuyeron con Halotano, y aumentaron con Cloroformo, pero no fueron estadísticamente significativo.
<b>Técnicas cualitativas</b>	Microscopia electrónica de barrido.	Emboava Spanó <i>et al.</i> (62)	EDTA 15% Ácido cítrico 10%	Remoción de smear layer.	El EDTA 15% y el ácido acético 5% fueron los más eficientes para

			Citrato de sodio 10% Vinagre de manzana Ácido acético 5% Ácido maleico 5%		remover el smear layer de los tubulillos dentinarios.
		Gurbuz <i>et          al.</i> (63)	NaCl 0.9% NaOCl 5.25% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% EDTA 17% Clorhexidina 2% Irradiación con Nd:YAG	Remoción de smear layer.	El EDTA 17%, el laser Nd:YAG y el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% fueron los más eficientes para remover el smear layer de los tubulillos dentinarios.
	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier	Ramírez- Bommer <i>et          al.</i> (66)	NaOCl 2.5% EDTA 17% Combinación NaOCl 2.5% seguido de EDTA 17% a diferentes tiempos (2, 4, 6, 8,10 min).	Intensidad en las bandas características del colágeno y fosfato.	El NaOCl 2.5% redujo el contenido de colágeno de la dentina en los primeros 4 minutos de la reacción. El EDTA 17% redujo el contenido de fosfato durante 24 horas, exponiendo el colágeno durante el proceso.

## **CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA**

### **IV. I. Síntesis de las nanopartículas de quitosano.**

Para la síntesis de las NPQ se utilizó el método de gelación iónica descrita por Sawtarie, Cai y Lapitsky (67) con quitosano y trifosfato sódico polianiónico (TPP). El quitosano utilizado fue de muy bajo peso molecular (50 KDa) y un grado de deacetilación de 75% - 85%. Para preparar las soluciones madre, se disolvieron 10 mg de quitosano en una solución de ácido acético al 0.05% (p/v), dando como resultado una concentración final de 0.1% (p/v). Por otro lado, se disolvió TPP en agua MiliQ a una concentración del 0.1% (p/v). En seguida, se agregó 1 mL de solución de NaCl (150 mM) a cada una de las soluciones madre. Después, se vaciaron 10 mL de la solución de quitosano a un vial de cristal de 20 mL, y se agregaron por goteo (a una velocidad aproximada de 1 gota x segundo) 3.95 mL de la solución de TPP con agitación constante (con barra magnética de 4 mm x 12 mm, a una velocidad de 800 rpm) hasta 1 minuto después de completar la adición. Por último, se dejó equilibrar la emulsión durante 24 horas para después analizar la distribución del tamaño, índice de polidispersidad y el potencial Zeta por medio de dispersión de luz dinámica (ZetaSizer Nano ZS).

Después de dejar en equilibrio las nanopartículas, se realizó diálisis con tubos de membrana de diálisis Spectra/Por con corte de peso molecular (MWCO, por sus siglas en inglés) de 12 a 14 kDa contra agua destilada durante 4 horas para remover los restos de NaCl. Una vez pasadas las 4 horas, se tomó una muestra para evaluar cambios en el diámetro hidrodinámico, la distribución del tamaño e índice de polidispersidad. Por último, las nanopartículas se pasaron por un proceso de liofilización durante 48 horas para su almacenamiento y posterior análisis.

#### **IV. II. Caracterización con dispersión de luz dinámica (DLS).**

El diámetro hidrodinámico, la distribución del tamaño y potencial zeta de las NPQ se midieron por DLS con Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instrument Co., UK). La distribución del tamaño se reporta como índice de polidispersidad (PDI). Todas las mediciones se realizaron por triplicado, utilizando 1 mL de la muestra en una celda desechable y analizadas a 25 °C con un ángulo de dispersión de 90° e índice de refracción de 1.480. Para medir el potencial Zeta de las nanopartículas, se realizó un barrido de pH en buffer fosfato salino (BFS) iniciando con pH 3.5 hasta pH 7. El potencial Zeta se midió con el mismo ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instrument Co., UK) utilizando 0.1 mL de solución de nanopartículas purificadas y 0.9 mL de BFS al pH deseado, en celdas desechables DTS 1070, a 25 °C, con método de aproximación de Smoluchowski, 200 lecturas, con un voltaje de 150 V y modelo de análisis Automático.

#### **IV. III. Caracterización con microscopía electrónica de barrido y transmisión (STEM).**

Para medir la forma y tamaño de las NPQ, se utilizó un microscopio electrónico de transmisión y barrido. Para preparar la muestra, se realizó una diálisis contra agua durante 4 horas para prevenir la formación de cristales de sal en la rejilla. Se utilizó acetato de uranilo como indicador, agregando primero 10 µm de solución de nanopartículas al 0.04% sobre una rejilla de carbón, y posteriormente 20 µm de la tinción. Se dejó secar la muestra durante 10 minutos y posteriormente se analizó bajo STEM con un voltaje de 200 kV

#### **IV. IV. Análisis por espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR).**

Se realizó un registro del espectro infrarrojo de las NPQ, así como de quitosano y TPP para identificar los grupos funcionales utilizando un espectrómetro FTIR. Las muestras fueron

evaluadas en estado sólido. Se realizaron 16 escaneos dentro de un rango de 4000-700  $\text{cm}^{-1}$  a una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **IV. V. Análisis por calorimetría diferencial de barrido.**

La calorimetría diferencial de barrido registra los efectos de la temperatura asociados a las fases de transición y reacciones químicas. Se registró la diferencia en el flujo de calor de la muestra contra una referencia. Se realizó un análisis termogravimétrico de quitosano de bajo peso molecular y de las NPQ para caracterizar el comportamiento térmico mediante el SDT-Q600. El instrumento se calibró utilizando una charola de aluminio como control y las muestras a analizar pesaron de 3 a 5 mg. Se realizó una rampa de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  en un rango de 25-400  $^{\circ}\text{C}$  bajo una atmósfera de nitrógeno (flujo de 100  $\text{mL}/\text{min}$ ).

#### **IV. VI. Evaluación de la actividad antibacteriana de las nanopartículas de quitosano.**

Para evaluar la capacidad antibacteriana de las NPQ, se siguieron las indicaciones del protocolo M26-A del Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS)(68). Para uso en este estudio como agente irrigante, las nanopartículas fueron dializadas contra buffer fosfato salino con pH 3.5 durante 24 horas y refrigeradas para su almacenamiento. Previo a su aplicación se sacaron de refrigeración y se dejaron hasta que alcanzaran temperatura ambiente.

##### *- Preparación del medio:*

El medio recomendado es el Mueller-Hinton (MH). Se suspendieron 21 g del polvo en 1 L de agua purificada y se colocó en agitación magnética con calor. Además, se preparó Agar Soya Trypticaseína para el cultivo y aislamiento de las cepas bacterianas. Se suspendieron 40 g del medio en 1 L de agua purificada, se calentó con agitación magnética hasta que se completara la disolución del polvo y se dejó hervir durante 1 minuto. El caldo y el agar se metieron a

esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos a 15 lb de presión. El agar se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que alcanzó una temperatura entre 45-50 °C y se vació en placas de Petri estériles.

*- Preparación del inóculo:*

Se utilizó *E. faecalis* (ATCC 29212) como modelo para evaluar la actividad antibacteriana de las NPQ. Se inocularon en agar y se incubaron durante 24 h a 37 °C.

De las cepas aisladas se tomaron de 2 a 3 colonias con la misma apariencia morfológica con un asa estéril y se transfirieron a un tubo que contenía 5 mL de medio MH, se mezcló con agitador vortex y se incubó a 37 °C. Posteriormente se ajustó la turbidez de la suspensión a una densidad óptica igual a la del Standard de McFarland 0.5 añadiendo más caldo, esto con el fin de tener  $5 \times 10^5$  CFU/mL.

*- Evaluación de la actividad antibacteriana por método de macrodilución:*

Se realizó una doble dilución seriada con tubos de borosilicato de vidrio de 13 x 100 mm estériles. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de la solución de NPQ, iniciando con una concentración al 0.1% contra *E. faecalis*.

1. Se añadió 1 mL de caldo MH inoculado en tubos 1 al 6.
2. Se añadió 1 mL de solución de nanopartículas (0.1%) al tubo 1.
3. Se realizó una doble dilución seriada iniciando por el tubo 2 y continuando hasta el tubo 6, dejando un volumen intermedio de 1 mL en cada tubo y utilizando micropuntas separadas para cada tubo. La dilución se realizó tomando 1 mL del tubo con 2 mL y transfiriendo ese volumen al siguiente tubo, el cual es después

mezclado con agitador vortex. Al final, se descarta 1 mL del último tubo (tubo 6).

4. Después de realizar las diluciones, se añadió 1 ml de caldo MH a cada tubo, con el fin de obtener un volumen final de 2 mL en cada tubo.
5. El tubo 6 sirvió como control negativo.
6. Se añadió 0.1 mL del caldo inoculado a cada tubo, excepto al tubo 6.
7. Se agitaron suavemente los tubos manualmente, sin crear burbujas.

Se utilizaron tubos con concentraciones bacterianas ajustadas a  $5 \times 10^5$  CFU/mL como control positivo, y tubos con caldo MH sin inocular como control negativo. La prueba se realizó por triplicado y se dejaron incubando los tubos a 37 °C por 20 h, después se agitaron con vórtex y se reincubaron por 20 horas, por último se volvieron a agitar con vórtex para reincubarse de nuevo y leer las absorbancias 24 h después. El tubo con la menor concentración que visualmente inhibía el crecimiento bacteriano (sin turbidez) se considera como la MIC.

Después de la incubación, se registraron las absorbancias calibradas a una densidad óptica de 600 nm con espectrofotómetro Genesys 10S UV/vis (Thermo Scientific), utilizando como blanco el control negativo y se calculó el % de células (bacterias) viables mediante la Ecuación 3:

$$\frac{ABS_{experimental}}{ABS_{control\ positivo}} \times 100 = \% \text{ bacterias vivas} \quad (3).$$

Para calcular el % de inhibición, se utilizó la siguiente fórmula reportada por Madureira *et al.* (69):

$$\frac{ABS_{control\ positivo} - ABS_{experimental}}{ABS_{control\ positivo}} \times 100 = \% \text{ de inhibición.} \quad (4)$$

Los resultados fueron arrojados en hojas de recolección de datos para su interpretación.

#### **IV. VII. Comparación de la capacidad quelante de las nanopartículas de quitosano y EDTA.**

Para evaluar y comparar el contenido mineral de la dentina del conducto radicular después del tratamiento con distintos agentes irrigantes, se usó una técnica por espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP, por sus siglas en inglés), modificada de la reportada por Ari & Erdemir (19):

Se utilizaron 6 primeros premolares mandibulares de reciente extracción, de pacientes jóvenes, sin lesiones cariosas ni restauraciones. Se removió el cálculo y cemento de las raíces y se almacenaron en una solución de cloramina T hasta su posterior uso. Se cortaron discos de las raíces a 7 mm del ápice, con un espesor aproximado de 1 mm. Con una lima tipo K #15 se removieron los restos de tejido pulpar. Cada disco fue cortado en 4 partes iguales y almacenados en microtubos con 1.5 mL de agua destilada. Posteriormente se ultrasonificaron por 60 segundos para remover los residuos de dentina causados por el tallado. Cada fragmento se utilizó para 4 tiempos distintos de exposición a agentes quelantes: 0, 3, 5 y 10 minutos. Los agentes quelantes utilizados fueron EDTA 17% y NPQ al 0.1%. El EDTA que se utilizó para esta experimentación fue el MD-Cleanser (Meta Biomed). Para uso en este estudio como agente irrigante, las nanopartículas después de su síntesis y equilibrio, fueron dializadas contra buffer fosfato salino con pH 3.5 durante 24 horas y refrigeradas para su almacenamiento. Previo a su aplicación se sacaron de refrigeración y se dejaron hasta que alcanzaran temperatura ambiente. Los especímenes se colocaron dentro de microtubos con 1.5 mL de la solución irrigante por el tiempo previamente determinado y ultrasonificados por 15 segundos cada minuto en contacto con el

irrigante. Las soluciones fueron intercambiadas a los 3, 5 y 8 minutos para prevenir la depleción del agente. Después de transcurrido el tiempo, los especímenes se sumergieron en 1.5 mL de agua destilada durante 1 minuto, donde 15 segundos fueron ultrasonificados. Cada espécimen se secó con papel absorbente y se dejaron en horno a 70 °C hasta obtener un peso constante. Se registraron los pesos y posteriormente se disolvieron en una solución de 10 mL de HNO<sub>3</sub> y 15 mL de agua desionizada. Se quemaron a 170 PSI y 200 °C en microondas. Después de calibrar el vehículo, se tomaron 2 mL de cada espécimen y se realizó la lectura por ICP.

Los niveles de dos elementos (Ca y Mg) de cada espécimen se analizaron y se midió su porcentaje en peso y se registraron los cambios en los niveles de los elementos a través del tiempo en una tabla. Posteriormente, los valores fueron normalizados para su fácil interpretación y comparación.

## CAPÍTULO V. RESULTADOS.

### V. I. Síntesis de las nanopartículas de quitosano.

Para evaluar el diámetro hidrodinámico, la distribución del tamaño, PDI y el potencial Zeta de las NPQ, se midieron a través de dispersión de luz dinámica (ZetaSizer Nano ZS) después de 24 horas de equilibrio. El diámetro de las nanopartículas fue de  $113.44 \pm 11.05$  nm, con un PDI de  $0.243 \pm 0.042$  (Figura 5).

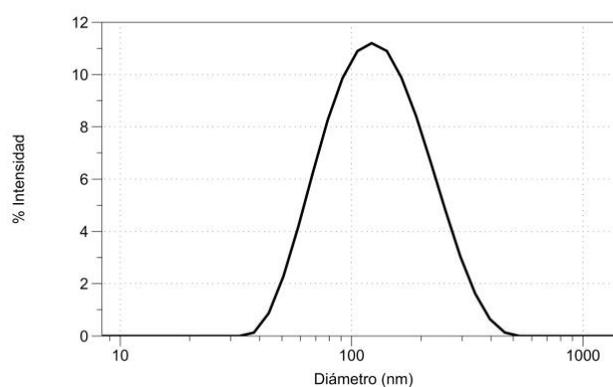


Figura 5. Distribución del tamaño de las NPQ.

Después de dejar en equilibrio las nanopartículas, se realizó diálisis con tubos de membrana de diálisis Spectrum Spectra/Por™ con MWCO de 12 a 14 kDa contra agua destilada durante 4 horas para eliminar los restos de NaCl. Una vez pasadas las 4 horas, se tomó una muestra para evaluar cambios en el diámetro hidrodinámico, la distribución del tamaño y PDI. Las nanopartículas tuvieron una reducción de tamaño de 1.59% ( $119.25 \pm 6.16$  nm antes de la diálisis y  $117.35 \pm 1.57$  nm después de la diálisis), así como una reducción en el PDI de 4.32% ( $0.249 \pm 0.052$  antes de la diálisis y  $0.236 \pm 0.025$  después de la diálisis).

Una vez dializadas las nanopartículas, se pasaron por un proceso de liofilización durante 48 horas y posteriormente se pesaron para calcular el % de rendimiento con la fórmula propuesta por Abdelwahed (70) (Ecuación 5):

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{peso analizado} \times 100}{\text{peso teórico}} \quad (5)$$

Se tomó un lote de nanopartículas para calcular el % de rendimiento, donde:

*peso analizado: 9 mg*

*peso teórico: 13.95 mg*

$$\text{Por lo tanto: } \% \text{ rendimiento} = \frac{9 \text{ mg} \times 100}{13.95 \text{ mg}} = \mathbf{64.52\%}$$

## V. II. Caracterización con dispersión de luz dinámica (DLS).

Para medir el potencial Zeta de las nanopartículas se utilizó buffer fosfato salino a diferentes pH para evaluar la evolución del potencial Zeta. La Tabla 2 muestra los registros del potencial Zeta a diferentes pH y la Figura 6 representa al gráfico lineal de los mismos registros.

Tabla 2. Potencial Zeta de las NPQ a diferentes pH (25 °C).

<b>pH del medio</b>	<b>Potencial Zeta</b>
3.5	25.84 ± 4.94 mV
4	15.9 ± 3.38 mV
5	8.49 ± 3.24 mV
6	4.35 ± 3.89 mV
7.5	2.32 ± 3.47 mV

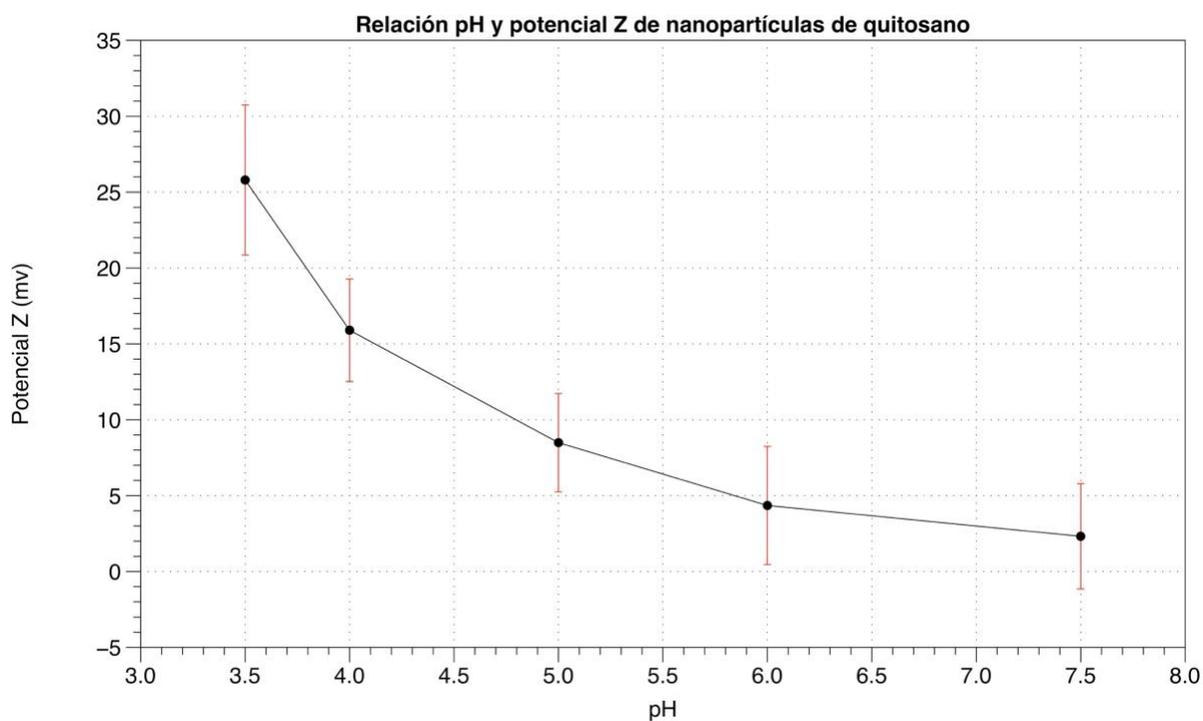


Figura 6. Gráfico lineal del Potencial Zeta respecto al pH del medio de las NPQ.

Se puede apreciar en la Figura 6 cómo disminuye el potencial Zeta de las nanopartículas cuando el pH del medio aumenta, iniciando con un potencial Zeta de  $25.84 \pm 5.94$  mV a un pH=3.5, bajando a un potencial Zeta de  $2.32 \pm 4.47$  mV a un pH=7.5.

### V. III. Caracterización con microscopía electrónica de barrido y transmisión (STEM).

La micrografía STEM de las NPQ se pueden observar en la Figura 7. Se aprecian nanopartículas en forma de mora con cierta aglomeración, de un tamaño mayor a 100 nm, tal como se midió por DLS.

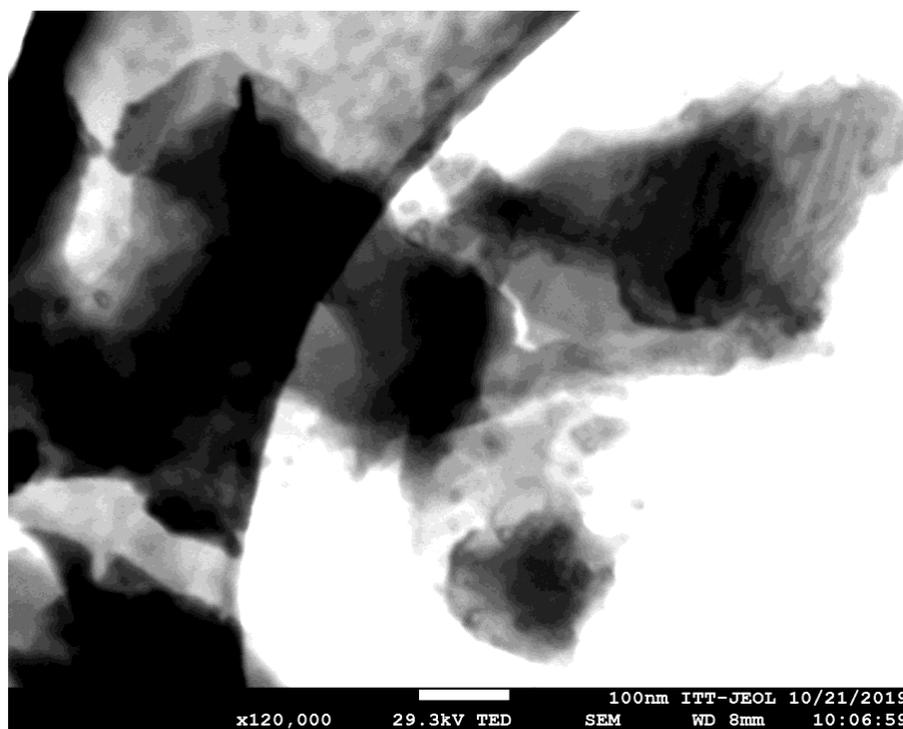


Figura 7. Caracterización de NPQ por STEM.

#### V. IV. Análisis por espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR).

El espectro infrarrojo de las NPQ, quitosano y TPP se muestra en la Figura 8. Analizando las bandas en el espectro del quitosano, se pueden apreciar las siguientes características que se muestran en la Tabla 3, lo que es consistente con su estructura (Figura 3): Banda del O-H a 3354  $\text{cm}^{-1}$ , N-H alrededor de 3290  $\text{cm}^{-1}$ , C-H a 2873  $\text{cm}^{-1}$ , banda de la amida I a 1651  $\text{cm}^{-1}$ , un banda del grupo  $\text{NH}_2$  a 1587  $\text{cm}^{-1}$ , C-O-C a 1150  $\text{cm}^{-1}$  y a 894  $\text{cm}^{-1}$  la banda de la tensión de los grupos anoméricos. El espectro del TPP presenta las siguientes bandas características que se muestran en la Tabla 4: Banda de la tensión P=O a 1208  $\text{cm}^{-1}$ , banda de la tensión simétrica y antisimétrica del grupo  $\text{PO}_2$  a 1135  $\text{cm}^{-1}$ , banda de la tensión simétrica y antisimétrica del grupo  $\text{PO}_3$  a 1093  $\text{cm}^{-1}$  y a 886  $\text{cm}^{-1}$  la tensión antisimétrica del P-O-P. El espectro de las NPQ se muestra diferente a la de quitosano y presenta las siguientes bandas características que se muestran en la Tabla 5,

y que también es consistente con su estructura (Figura 4): Banda de la tensión O-H a 3228  $\text{cm}^{-1}$ , banda de la tensión asimétrica del grupo C-H a 2877  $\text{cm}^{-1}$ , la banda que se aprecia en 1633  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al doblaje del grupo N-H en las NPQ después de la adición de TPP. Las bandas que se encuentran a 1532  $\text{cm}^{-1}$  y 1378  $\text{cm}^{-1}$  se pueden asignar a la tensión del nitroderivado alifático N-O, las bandas en 1060  $\text{cm}^{-1}$  y 1026  $\text{cm}^{-1}$  del quitosano se movieron a 1065  $\text{cm}^{-1}$  y 1023  $\text{cm}^{-1}$  en las NPQ, y la banda a 893  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la tensión de los grupos anoméricos.

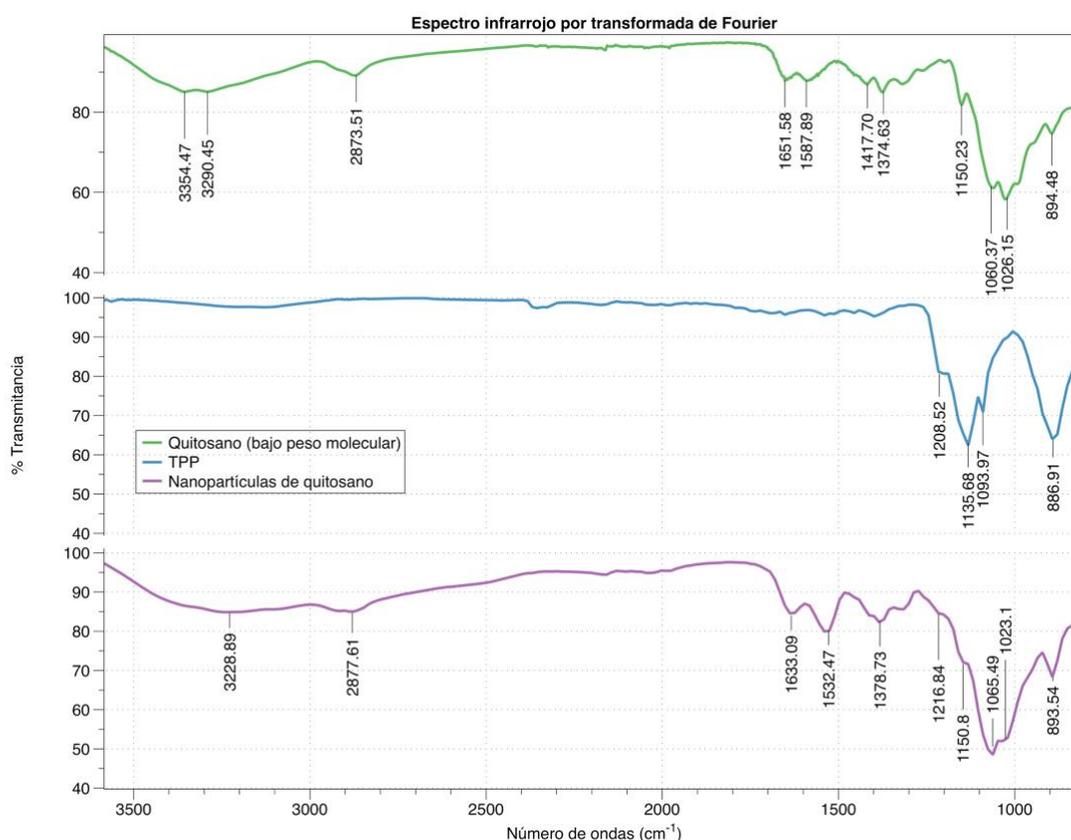


Figura 8. Espectro FTIR que contrasta las NPQ con sus componentes madre (quitosano de bajo peso molecular y TPP).

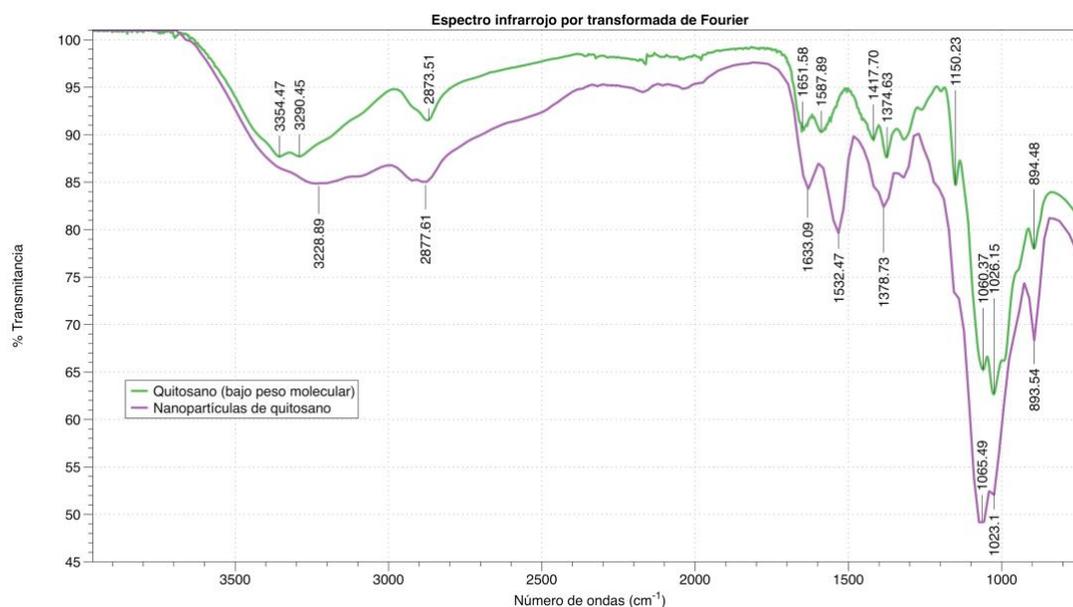


Figura 9. Espectro FTIR donde se comparan el qitosano con las NPQ.

Tabla 3. Grupos funcionales característicos del qitosano.

Grupo funcional	V referencia (cm-1) (71)	V experimental (cm-1)	Intensidad
Grupo -OH	3550	3354	M
Grupo N-H	3292	3290	M
Grupo C-H	2919 y 2862	2873	S
Amida I	1655	1651	M
Doblaje del grupo -NH <sub>2</sub>	1580	1587	S
Amida III	1313	1374	S
Tensión asimétrica del C-O-C	1154	1150	S
Vibraciones de su estructura piranósica.	1082 y 1032	1060 y 1026	M
Tensión C-H de grupos anoméricos.	896	894	M

Tabla 4. Grupos funcionales característicos del TPP.

Grupo funcional	V referencia (cm-1) (72)	V experimental (cm-1)	Intensidad
Tensión P=O	1211	1208	S
Grupo PO <sub>2</sub>	1127	1135	M
Grupo PO <sub>3</sub>	1093	1093	M
Tensión antisimétrica del P-O-P	800	886	M

Tabla 5. Grupos funcionales característicos de las NPQ.

<b>Grupo funcional</b>	<b>V referencia (cm-1) (73)</b>	<b>V experimental (cm-1)</b>	<b>Intensidad</b>
<b>Grupo -OH</b>	3550 y 3200	3228	M
<b>Grupo CH<sub>2</sub></b>	2930	2877	S
<b>Doblaje del grupo -N-H</b>	1644	1633	S
<b>Tensión del grupo N-O</b>	1541 y 1379	1532 y 1378	S
<b>Tensión P=O</b>	1211	1216	S
<b>Tensión asimétrica del C-O-C</b>	1154	1150	S
<b>Vibraciones de su estructura piranósica.</b>	1082 y 1032	1065 y 1023	M
<b>Tensión C-H de grupos anoméricos.</b>	896	893	M

#### V. V. Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

El análisis por DSC se utiliza como herramienta para confirmar la transformación vítrea de las nanopartículas. El termograma de las NPQ, así como del quitosano de bajo peso molecular se muestra en la Figura 10. El quitosano presenta un pico exotérmico a 300 °C correspondiente al punto de fusión de la región cristalina, mientras que las NPQ presentan dos picos exotérmicos a ~50 °C y a ~250 °C, el primero corresponde a la pérdida de restos del solvente (ácido acético) y el segundo a la temperatura de cristalización.

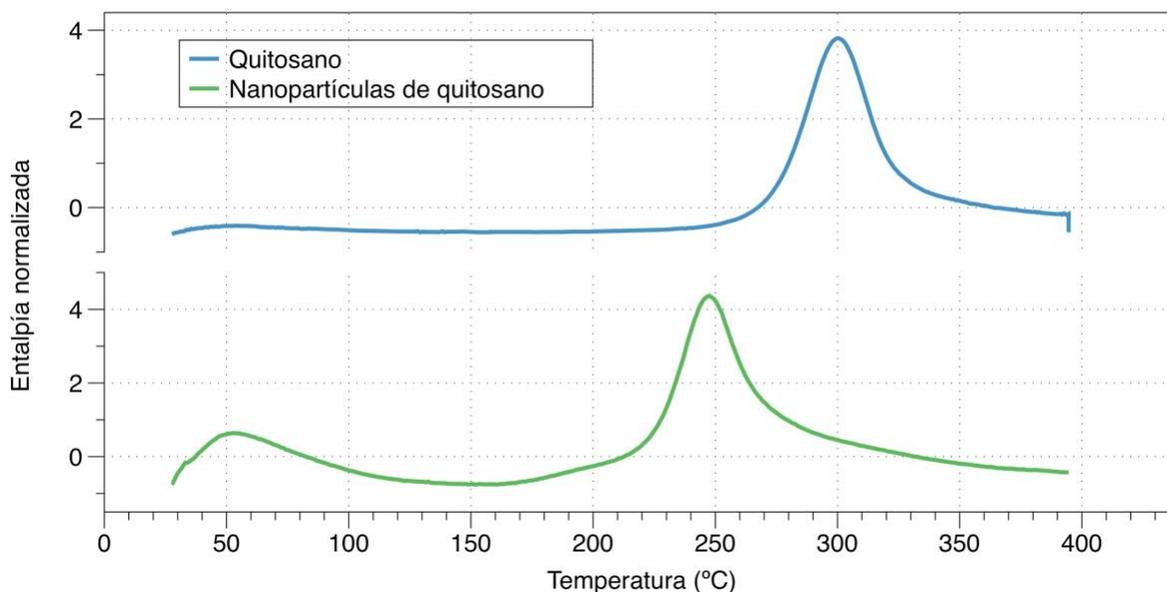


Figura 10. Termograma del quitosano de bajo peso molecular y NPQ.

## V. VI. Evaluación de la actividad antibacteriana de las nanopartículas de quitosano.

Se evaluó la capacidad antibacteriana de las NPQ por método de macrodilución, iniciando a una concentración del 0.1% (1 mg/mL) y realizando una doble dilución seriada. La Tabla 6 muestra las absorbancias a una OD 600 nm, usando como blanco el grupo Control Negativo.

Tabla 6. Tabla que muestra las absorbancias de cada una de las concentraciones de NPQ

Tubo	1 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.125 mg/ml	0.0625 mg/ml	Cont. Pos.
1	0.032	0.388	0.543	0.775	1.08	0.59
2	0.056	0.396	0.488	0.738	1.242	0.73
3	0.042	0.421	0.519	0.754	0.109	0.74
Prom	0.043± 0.012	0.401± 0.017	0.516± 0.027	0.755± 0.018	1.143± 0.086	0.686± 0.083

Para calcular el % de sobrevivencia de bacterias para cada concentración, se utilizó la Ecuación 3, y los datos se arrojaron en la Tabla 7, que se muestra a continuación:

Tabla 7. Tabla que muestra el % de bacterias viables de cada una de las concentraciones.

Tubo	1 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.125 mg/ml	0.0625 mg/ml	Cont. Pos.
%VIA BILID AD	6.31±	58.49±	75.24±	110.04±	166.55±	100±
	1.23	6.03	13.69	17.24	16.72	16.56

Podemos observar en la Tabla 7, que la concentración que tuvo mayor reducción bacteriana fue 1 mg/mL, con una viabilidad del  $6.31 \pm 1.23\%$ . Las dos primeras diluciones permitieron cierto crecimiento bacteriano, mientras que las dos últimas diluciones.

Para calcular el % de inhibición bacteriana de cada concentración, se utilizó la Ecuación 4, y los datos se arrojaron en la Tabla 8, que se muestra a continuación:

Tabla 8. Tabla que muestra el % de inhibición bacteriana de cada una de las concentraciones.

Tubo	1 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.125 mg/ml	0.0625 mg/ml
%INHIBICIÓN	93.74±	41.03	23.66±	-11.44±	-67.68±
	1.23	±6.03	13.69	17.24	16.72

El 90% de las bacterias ( $MIC_{90}$ ) fueron inhibidas con la mayor concentración que se evaluó en este experimento (1 mg/mL), mientras que las concentraciones del 0.5 y 0.25 mg/mL sólo lograron inhibir menos 40%. Por otro lado, las concentraciones de 0.125 y 0.0625 mg/mL permitieron un crecimiento bacteriano mayor al control positivo.

En la Figura 11 podemos apreciar el gráfico de barras que compara el % de viabilidad celular para cada una de las diluciones.

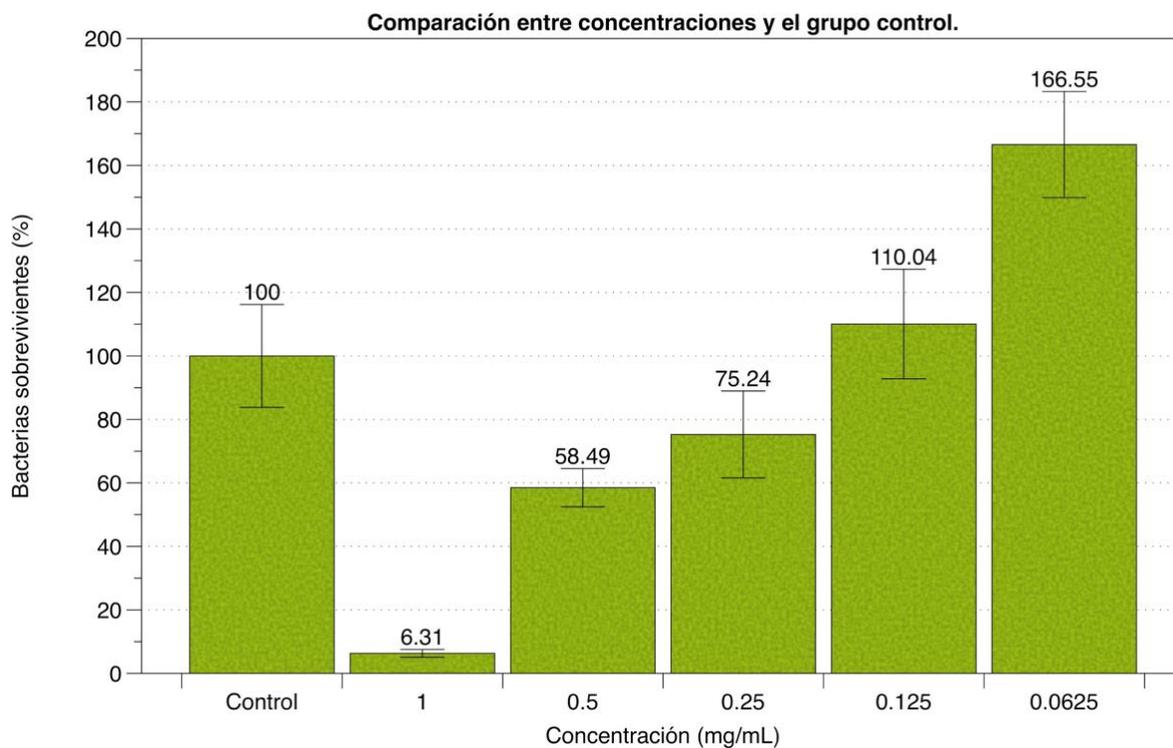


Figura 11. Gráfico de barras que compara el porcentaje de bacterias sobrevivientes a diferentes concentraciones de nanopartículas.

## V. VII. Evaluación de la capacidad quelante de las nanopartículas de quitosano.

Para evaluar el contenido mineral de la dentina del conducto radicular después del tratamiento con distintos agentes irrigantes y con el paso del tiempo en minutos, se utilizó una técnica por Espectroscopia de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP, por sus siglas en inglés).

En las Tablas Tabla 9 Tabla 10 se presentan los % en peso normalizados de cada uno de los tiempos de exposición a los agentes quelantes y para cada uno de los dos elementos estudiados: Ca y Mg.

Tabla 9. Concentraciones normalizadas de los diferentes elementos de muestras tratadas con EDTA al 17% a diferentes tiempos.

<b>Tiempo de acción (min)</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>
0	0	0
3	-0.0831	-0.2222
5	-0.1931	-0.3629
10	-0.2347	-0.4414

Tabla 10. Concentraciones normalizadas de los diferentes elementos de muestras tratadas con NPQ al 0.1% a diferentes tiempos.

<b>Tiempo de acción (min)</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>
0	0	0
3	-0.1245	0.0005
5	-0.3251	0.000005
10	-0.4291	0.0021

La Figura 12 corresponde al gráfico lineal que representa el % en peso normalizado del Ca a diferentes tiempos de exposición al EDTA al 17% y a las NPQ al 0.1%. Podemos observar que la solución de NPQ disminuyó más iones Ca desde los 3 min hasta los 10 min que la solución de EDTA. Por el contrario, en la Figura 13, las NPQ no disminuyeron el % en peso del Mg durante todo el periodo de exposición, mientras que el EDTA logró disminuir el % en peso del Mg desde los 3 minutos hasta los 10 minutos.

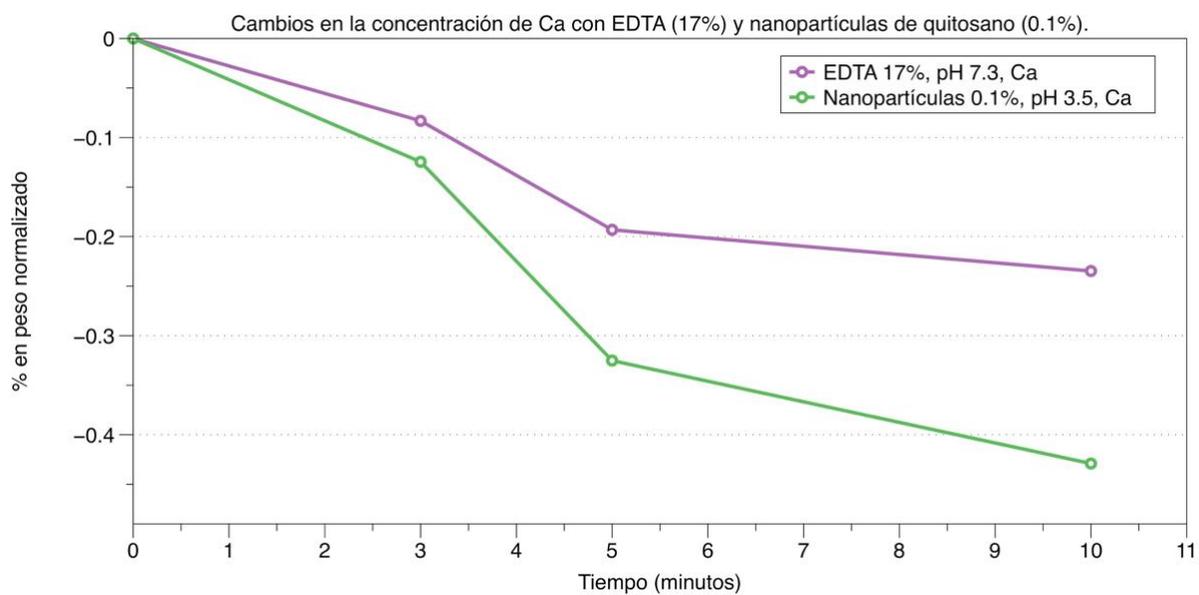


Figura 12. Gráfico lineal que muestra los cambios en el % en peso normalizado de Ca en las muestras expuestas a EDTA al 17% y nanopartículas de quitosano al 0.1% durante 0, 3, 5 y 10 minutos.

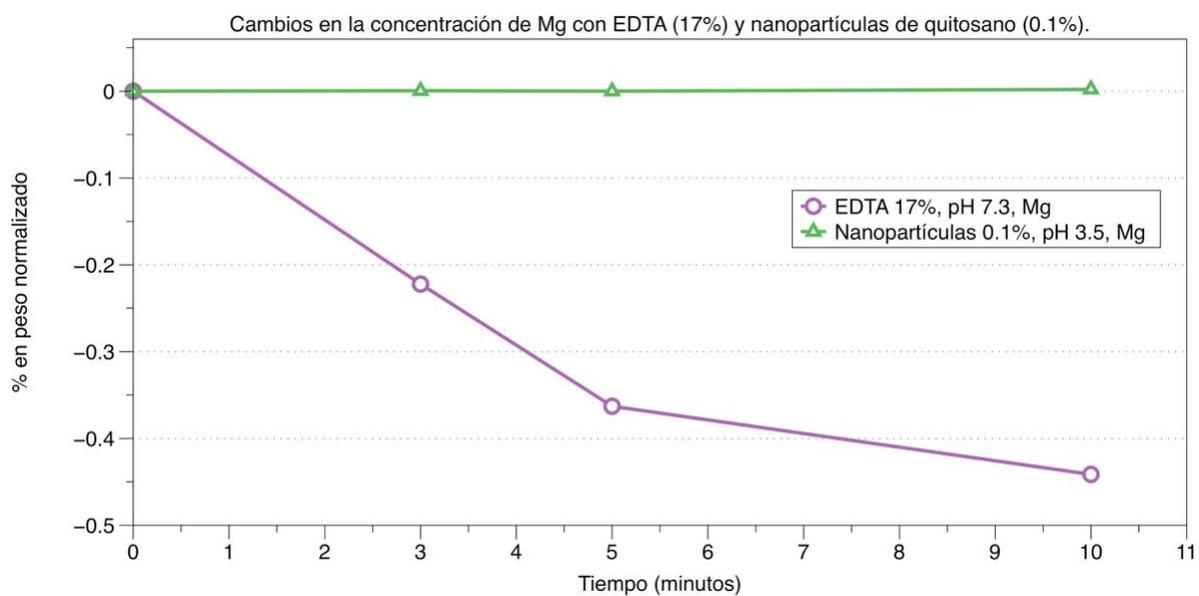


Figura 13. Gráfico lineal que muestra los cambios en el % en peso normalizado de Mg en las muestras expuestas a EDTA al 17% y nanopartículas de quitosano al 0.1% durante 0, 3, 5 y 10 minutos.

## CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN

Diferentes métodos se han propuesto para la síntesis de NPQ, siendo el método de gelación iónica por goteo el más utilizado por su facilidad, bajo costo y reproducibilidad. Este método también permite tener cierto grado de control en el tamaño de las nanopartículas y carga de su superficie (74). Se ha reportado previamente que utilizar quitosano de bajo peso molecular produce nanopartículas más pequeñas, así como una disminución en el PDI (67). El quitosano debe disolverse en un ácido orgánico, y la solubilidad disminuye cuando el peso molecular aumenta (75). Por otro lado, decidimos utilizar las concentraciones de quitosano y TPP propuestas por Sawtarie *et al.* (67), ya que coinciden sus hallazgos con los de W. Fan *et al.*, donde reportan que para evitar la formación de micro-partículas se deben utilizar concentraciones menores a 1.5 mg/mL y 1.0 mg/mL de quitosano y TPP, respectivamente (76).

La dispersión por luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) es una de las técnicas más populares para determinar el diámetro hidrodinámico y distribución del tamaño de las partículas. Esta técnica nos permite identificar la difusividad de las partículas en una suspensión con base a las floculaciones dependientes de tiempo en la intensidad de la luz dispersada resultante de los movimientos Brownianos; posteriormente, el tamaño es calculado con la ecuación de Stokes-Einstein (77). El tamaño de las nanopartículas aquí reportadas ( $113.44 \pm 11.05$  nm) es ligeramente menor al reportado por Sawtarie *et al.* (67), cuya metodología fue tomada como base para la síntesis de las nanopartículas del presente estudio. El índice de polidispersidad (PDI) es un valor que describe la distribución del tamaño de una muestra. Un PDI igual a 1 representa una muestra que tiene una amplia distribución y variación en tamaños. En este estudio

se obtuvo un PDI de  $0.243 \pm 0.042$ , lo que significa que la distribución era pequeña con poca variación en el tamaño de las nanopartículas. Se ha reportado que utilizar quitosano de bajo peso molecular y alto grado de deacetilación reduce el tamaño de la distribución, además de ser altamente monodispersas (67,76). Por otro lado, añadir NaCl al 150 mM a las soluciones madre produce nanopartículas y distribuciones pequeñas de una manera reproducible (67,78). La presencia de NaCl en las soluciones madre ayuda a controlar las fuerzas iónicas y retarda el proceso de gelación ionotrópica, resultando en una distribución de tamaño más reducida. Este proceso de gelación retardada permite que el TPP se mezcle con el quitosano de una forma más uniforme antes de que ocurra la agregación, debido a la competitividad entre el ion  $\text{Cl}^-$  y los aniones de TPP, debilitando la unión entre quitosano y TPP. La presencia de NaCl también llevó a valores bajos de PDI, debido a que las bajas fuerzas iónicas del medio causaron que las partículas se formen en una tasa más uniforme, lo que a su vez produce distribuciones de tamaño más pequeños (67,78), que corroboramos con las lecturas del DLS.

El potencial Zeta es un parámetro importante para determinar la estabilidad de las nanopartículas en una suspensión. En términos generales, se considera que una suspensión moderadamente estable por repulsión electrostática se necesita de nanopartículas con un potencial zeta desde 20 a 30 mV (69,74). En el presente estudio obtuvimos potenciales Zeta desde  $25.84 \pm 4.94$  mV hasta  $2.32 \pm 3.47$  mV; siendo directamente proporcional la disminución del potencial Zeta con el aumento del pH del medio. Esta carga positiva es resultado de los grupos amino  $-\text{NH}_3$  neutralizados por el efecto de los grupos polianiónicos del TPP, así como del pH del medio (69,74).

El espectro FTIR resulta útil para identificar cambios en las bandas características de grupos funcionales entre materiales; en este caso, se realizó la caracterización del quitosano de bajo peso molecular, TPP y NPQ. Si comparamos los espectros del quitosano con el de las NPQ (Figura 9), se aprecia un ensanchamiento en la banda a  $3228\text{ cm}^{-1}$  que indica la formación de enlace hidrógeno entre los oxígenos del tripolifosfato y los hidrógenos de los grupos amino del quitosano. La vibración correspondiente a la flexión  $\text{NH}_2$  a los  $1587\text{ cm}^{-1}$  desaparece; en cambio, aparece una banda a  $1633\text{ cm}^{-1}$  y  $1532\text{ cm}^{-1}$ ; probablemente, debido a la protonación de los grupos  $\text{NH}_2$  que ahora son iones  $\text{NH}_3^+$  y a la formación del enlace hidrógeno entre los O-TPP y los H de los grupos aminos libres.

La DSC es una técnica cuantitativa que mide la capacidad calorífica de un sistema determinado cuando sufre una transición inducida por un cambio térmico. Se registra la diferencia de energía en función de la temperatura que es necesaria suministrar a una muestra con respecto a una referencia o testigo. Podemos apreciar en la Figura 10 que la temperatura de transición vítrea de las NPQ es menor a la del quitosano; esto se debe a que cuando el quitosano es entrecruzado con el TPP se produce un cambio en la estructura molecular, lo que causa una disminución de su cristalinidad. Milligan *et al.* (79) y Yousefpour *et al.* (80) reportaron los mismos resultados y atribuyeron la disminución de la termoestabilidad del quitosano al proceso del entrecruzamiento.

Para evaluar la actividad antibacteriana de las NPQ, se utilizó una prueba de macrodilución que se utiliza comúnmente para determinar la MIC. Este método nos permite determinar la concentración más baja de material que presenta propiedades antibacterianas. Se utilizó una cepa de *E. faecalis*, que es una bacteria anaerobia facultativa Gram-positiva, y que

se asocia con el fracaso del tratamiento de conductos y la periodontitis apical persistente, además de presentar un amplio rango de resistencia a agentes antimicrobianos. También tiene la habilidad de penetrar en los tubulillos dentinarios, lo cual la hace más difícil de eliminar durante la instrumentación e irrigación endodóntica (81). En este estudio, la MIC de las NPQ contra *E. faecalis* se determinó por el método de macrodilución, obteniendo que la concentración de 1 mg/mL era la más efectiva, inhibiendo más del 90%. Este resultado coincide con los de Geethapriya *et al.*, donde determinaron que la MIC del quitosano fue de 0.75 mg/mL (82), así como los de Elshinawy *et al.*, que determinaron que la MIC de las NPQ fue de 0.625 mg/mL (83). La acción antibacteriana de las NPQ se le han atribuido a la carga positiva de su superficie que interactúa con la membrana celular de carga negativa, alterando la permeabilidad celular y finalmente filtrando los componentes intracelulares hacia el espacio extracelular, lo cual lleva a la muerte celular (2,56,84).

Se ha demostrado que las soluciones irrigantes utilizadas durante el tratamiento de conductos para disolver tejido orgánico e inorgánico también afectan a las paredes del conducto (o dentina) (19,85). En el presente estudio, se evaluó el contenido mineral de la dentina radicular tratada con EDTA al 17% y NPQ al 0.1%, utilizando el método por ICP. Cobankara *et al.* (86) evaluaron los efectos de distintos agentes quelantes sobre el contenido mineral de la dentina radicular y encontraron que el EDTA al 17%, comparándolo con un grupo control, disminuye los niveles de Ca y P sin alterar la relación Ca/P, y que los niveles de Mg aumentaron después del uso del mismo. En el presente estudio, se evaluaron los niveles de Ca y Mg sobre la dentina radicular antes y después del uso del EDTA al 17% con diferentes tiempos de contacto, donde se aprecia una disminución en los niveles de Ca y Mg, siendo mayor la disminución del último.

En relación con el Mg y Na, son elementos traza u oligoelementos que son necesarios para la formación de hidroxiapatita; se cree que el Mg hace más susceptible al órgano dentario a los ácidos (87) ya que es uno de los primeros elementos en disolverse durante el proceso de desmineralización (19,64,86,88,89). Además, el Mg en la dentina podría unirse a los fosfatos, carbonatos o a la matriz orgánica, y se cree que el Mg reemplaza al Ca después de la quelación; sin embargo, no se ha descrito este mecanismo (58). Con respecto al K, se desconoce su función en los órganos dentarios, sin embargo, se encuentra presente dentro de las células (19,86,88,89). Dentro de los métodos analíticos utilizados, el ICP cobra mayor atención debido a que permite detectar concentraciones de partes por millón (mg/L) o billón ( $\mu\text{g/L}$ ); por otro lado, también se pueden medir distintos elementos con la misma muestra y también se puede realizar un análisis del contenido mineral pretratamiento y postratamiento (19,86,90).

Algunos estudios han evaluado la capacidad quelante o de remoción de smear layer del quitosano a diferentes concentraciones, como al 0.1% y 0.2%, con resultados prometedores (52,82,91–93); sin embargo, sólo un estudio ha evaluado a las nanopartículas de quitosano (2). En dicho estudio se demuestra que el uso de las nanopartículas de quitosano al 0.129% por 3 minutos remueve efectivamente el smear layer. En términos generales, se espera un mejor desempeño de un biomaterial en su forma nanométrica que en su forma a granel. En el presente estudio, las nanopartículas de quitosano a los 3 minutos de exposición disminuyeron el % en peso de los iones Ca semejante al EDTA, pero a medida que avanzaba el tiempo la disminución fue mayor que el EDTA. La capacidad quelante de las nanopartículas de quitosano y el EDTA pueden causar desmineralización o erosión dentinaria; sin embargo, la actividad antibacteriana de las NPQ es una ventaja importante que hace de ellas una alternativa al EDTA. Por otro lado,

podemos observar que los niveles de Mg de los dientes tratados con NPQ no fueron alterados durante todo el tiempo de exposición al quelante.

El mecanismo de acción del quitosano sobre la dentina no ha sido bien esclarecido; sin embargo, existen dos teorías que explican su capacidad quelante. Primero, el modelo del puente, que sugiere que dos o más grupos amino del quitosano se unen al mismo ion metálico. El segundo, el modelo del pendiente o ancla, que sugiere que un grupo amino se utiliza para la unión del ion metálico, semejando la forma de un pendiente o “arete”. El quitosano se forma por una cadena compuesta de varios dímeros de quitina (52). Similar a la molécula de EDTA, el dímero de quitina tiene dos átomos de nitrógeno que se unen a electrones libres, y son los responsables de la interacción iónica entre el metal y el agente quelante. En un medio ácido, los grupos amino presentes en el polímero están protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ). Esta forma es responsable de la atracción a otras moléculas para que ocurra la adsorción. La formación de complejos entre el quitosano y los iones metálicos puede ser por los mecanismos de adsorción, intercambio de iones y quelación. Este tipo de interacción depende de los iones involucrados, la estructura química del quitosano y el pH de la solución (92).

El uso clínico de nuevas soluciones irrigantes debe ser precedido por varios estudios de laboratorio que evalúen los beneficios y consecuencias al ser humano, por lo que se deberán realizar más estudios sobre las NPQ antes de ser llevadas al área clínica. Basándonos en los resultados de este estudio, las NPQ al 0.1% remueven la misma cantidad de iones Ca que el EDTA al 17% cuando son utilizadas durante 3 minutos, además de tener actividad antibacteriana contra el *E. faecalis*.

## CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES

1. El método de gelación iónica para sintetizar nanopartículas de quitosano es un método sencillo, reproducible y que requiere poco tiempo de trabajo.
2. El diámetro de las nanopartículas de quitosano fue de  $113.44 \pm 11.05$  nm, con un PDI de  $0.243 \pm 0.042$  y un potencial zeta de  $25.84 \pm 4.94$  mV a un pH de 3.5.
3. La morfología de las nanopartículas fue evaluada por STEM, logrando observarse la forma de “mora” característica de las nanopartículas de quitosano.
4. Se caracterizaron las nanopartículas de quitosano con espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, en donde se apreciaron cambios en las bandas características del grupo -OH y -NH<sub>2</sub> en el espectro respecto al quitosano de bajo peso molecular.
5. Se caracterizaron las nanopartículas de quitosano mediante calorimetría diferencial de barrido, en donde se identificó una disminución en la temperatura de transición vítrea con respecto al quitosano de bajo peso molecular debido al cambio del arreglo molecular posterior al entrecruzamiento.
6. La concentración de 0.1% presentó una disminución del 93.69% en el crecimiento bacteriano del *E. faecalis* bajo el método de macrodilución.
7. El % en peso de los iones Ca de muestras de órganos dentarios disminuyó a partir de los 3 min tanto con el uso de NPQ como de EDTA, siendo mayor la disminución a los 5 y 10 min con el uso de NPQ.

## CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aparacio E. Evaluación de la inducción de la xilazina en el efecto anestésico de la ketamina en rata de laboratorio de la cepa Wistar vía intraperitoneal. 2013;69. Disponible en: [https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis\\_aparicio\\_lozano.pdf](https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_aparicio_lozano.pdf)
2. del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Duarte MAH, de Moura MR, Aouada FA, Kishen A, et al. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. *Restor Dent Endod* [Internet]. 2015;40(3):195–201. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5395/rde.2015.40.3.195>
3. 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;34(12):1515–20.
4. Schmidt TF, Teixeira CS, Felipe MCS, Felipe WT, Pashley DH, Bortoluzzi EA. Effect of Ultrasonic Activation of Irrigants on Smear Layer Removal. *J Endod*. 2015;41(8):1359–63.
5. Cruz González Á, Vera Rojas J, Lara Rosano A. *Endodoncia: Fundamentos científicos para la práctica clínica*. 1era Edici. México: Ámate Editorial; 2012.
6. Zehnder M. Root Canal Irrigants. *J Endod*. 2006;32(5):389–98.
7. Ferreira RB, Alfredo E, Porto de Arrauda M, Silva Sousa YT, Sousa-Neto MD. Histological analysis of the cleaning capacity of nickel-titanium rotary instrumentation with ultrasonic irrigation in root canals. *Aust Endod J*. 2004;30(2):56–8.

8. Peters OA. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: A review. *J Endod.* 2004;30(8):559–67.
9. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006;32(2):93–8.
10. Ricucci D, Siqueira JF. Fate of the Tissue in Lateral Canals and Apical Ramifications in Response to Pathologic Conditions and Treatment Procedures. *J Endod* [Internet]. 2010;36(1):1–15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.038>
11. Basrani B, Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions. *Endod Top.* 2012;27:74–102.
12. Sabrah AHA, Yassen GH, Gregory RL. Effectiveness of antibiotic medicaments against biofilm formation of *enterococcus faecalis* and *porphyromonas gingivalis*. *J Endod* [Internet]. 2013;39(11):1385–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2013.05.003>
13. Kapil J, Abhishek P, K Vikram S, Lata K. Biofilm in endodontics: A review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015;5(1):1–12.
14. Fouad A. *Endodontic Microbiology*. 2nd Editio. *Textbook of Endodontics*. Wiley; 2017. 452 p.
15. Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at Multiple Oral Sites in Endodontic Patients Using Culture and PCR. *J Endod.* 2006;32(2):104–9.
16. Rodríguez-niklitschek C, V GHO. Clinical implications of *Enterococcus faecalis* microbial contamination in root canals of devitalized teeth: Literature review  
Implicancias clínicas de la contaminación microbiana por *Enterococcus faecalis*. *Rev*

- Odontológica Mex. 2015;19(3):177–82.
17. Siqueira JF, Guimarães-Pinto T, Rôças IN. Effects of Chemomechanical Preparation With 2.5% Sodium Hypochlorite and Intracanal Medication With Calcium Hydroxide on Cultivable Bacteria in Infected Root Canals. *J Endod.* 2007;33(7):800–5.
  18. Linde A. Dentin matrix proteins: Composition and possible functions in calcification. *Anat Rec.* 1989;224(2):154–66.
  19. Ari H, Erdemir A. Effects of endodontic irrigation solutions on mineral content of root canal dentin using ICP-AES technique. *J Endod.* 2005;31(3):187–9.
  20. Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod.* 1981;7(1):17–21.
  21. Montoya C, Arango-Santander S, Peláez-Vargas A, Arola D, Ossa EA. Effect of aging on the microstructure, hardness and chemical composition of dentin. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2015;60(12):1811–20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.10.002>
  22. Goldberg M. Dentin structure composition and mineralization. *Front Biosci* [Internet]. 2011;E3(2):281. Disponible en: <https://www.bioscience.org/2011/v3e/af/281/list.htm>
  23. Ghisi AC, Kopper PMP, Baldasso FER, Stürmer CP, Rossi-Fedele G, Steier L, et al. Effect of superoxidized water and sodium hypochlorite, associated or not with EDTA, on organic and inorganic components of bovine root dentin. *J Endod.* 2015;41(6):925–30.
  24. Marending M, Luder HU, Brunner TJ, Knecht S, Stark WJ, Zehnder M. Effect of sodium hypochlorite on human root dentine - Mechanical, chemical and structural evaluation. *Int Endod J.* 2007;40(10):786–93.

25. Zou L, Shen Y, Li W, Haapasalo M. Penetration of Sodium Hypochlorite into Dentin. *J Endod* [Internet]. 2010;36(5):793–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2010.02.005>
26. Clegg M, Vertucci F, Walker C, Belanger M, Britoo L. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod*. 2006;1(32):434–7.
27. Giardino L, Ambu E, Savoldi E. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod*. 2007;1(33):852–5.
28. Chávez de Paz L, Segdley C, Kishen A. The root canal biofilm. 1st Editio. Springer; 2015.
29. Serper A, Çalt S. The demineralizing effects of EDTA at different concentrations and pH. *J Endod*. 2002;28(7):501–2.
30. Basrani B. Endodontic Irrigation: Chemical disinfection of the root canal system [Internet]. 1st ed. Springer; 2015. 1–316 p. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-16456-4>
31. Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A, Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon Á. Chelating agents in root canal treatment: Mode of action and indications for their use. *Int Endod J* [Internet]. 2003;36(12):810–30. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14641420>
32. Segura J, Jiménez A, Llamas R, Jiménez A. El ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) y su uso en endodoncia. *Endodoncia (Mex)*. 1997;15(2):90–7.
33. Pérez VC, Cárdenas MEM, Planells US. The possible role of pH changes during EDTA

- demineralization of teeth. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1989;68(2):220–2.
34. Niu W, Yoshioka T, Kobayashi C, Suda H. A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *Int Endod J.* 2002;35(11):934–9.
  35. Qian W, Shen Y, Haapasalo M. Quantitative analysis of the effect of irrigant solution sequences on dentin erosion. *J Endod.* 2011;(37):1437–41.
  36. Miguez P, Pereire P, Atsawasuan P, Yamauchi M. Collagen cross-linking and ultimate tensile strength in dentin. *J Dent Res.* 2004;(83):807–10.
  37. Kite P, Eastwood K, Sugden S, Percival SL, Kite P, Eastwood K, et al. Use of In Vivo-Generated biofilms from hemodialysis catheters to test the efficacy of a novel antimicrobial catheter lock for biofilm eradication in vitro. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):3073–6.
  38. Ravishankar Rai V, Jamuna Bai a. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. *Formatex.* 2011;197–209.
  39. Cohen M. Nanotubes, nanoscience, and nanotechnology. *Matter Sci Energy.* 2001;(15):1–11.
  40. Powers KW, Brown SC, Krishna VB, Wasdo SC, Moudgil BM, Roberts SM, et al. Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. *Toxicol Sci.* 2006;90(1):23–32.
  41. Goy RC, Britto D de, Assis OBG. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros* [Internet]. 2009;19(3):241–7. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-)

14282009000300013&lng=en&tlng=en

42. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;(39):44–84.
43. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int.* 2013;2013.
44. Jothimani B, Sureshkumar S, Venkatachalapathy B. Hydrophobic structural modification of chitosan and its impact on nanoparticle synthesis – A physicochemical study. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2017;173:714–20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.041>
45. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006;31(7):603–32.
46. Rampino A., Borgogna M., Blasi P., Bellich B., Cesàro A. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *Int J Pharm* [Internet]. 2013;455(1–2):219–28. Disponible en: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84884130625&partnerID=40&md5=ee3ed2d05fcac578075a2f50f0bc2a37>
47. Pillai C.K.S, Paul Willi SCP. CHITOSAN-Manufactura, propiedades y usos.pdf. In: *Chitosan: Manufacture, Properties, and Usage.* Nova Science Publishers, Inc.; 2011. p. 84.
48. Mármol Z, Páez G, Rincón M, Araujo K, Aiello C. Quitina y Quitosano polímeros amigables . Una revisión de sus aplicaciones. *Rev Tecnocientífica URU.* 2011;1(August 2016):53–8.

49. Mohammed MA, Syeda JTM, Wasan KM, Wasan EK. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics*. 2017;9(4).
50. Husain S, Al-Samadani KH, Najeeb S, Zafar MS, Khurshid Z, Zohaib S, et al. Chitosan biomaterials for current and potential dental applications. *Materials (Basel)*. 2017;10(6):1–20.
51. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci [Internet]*. 2011;36(8):981–1014. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>
52. Pimenta JA, Zaparolli D, Pécora JD, Cruz-Filho AM. Chitosan: Effect of a new chelating agent on the microhardness of root dentin. *Braz Dent J*. 2012;23(3):212–7.
53. Liu XF, Guan YL, Yang DZ, Li Z, Yao KD. Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan. *J Appl Polym Sci*. 2000;79(March):1324–35.
54. Kyoon No H, Young Park N, Ho Lee S, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol*. 2002;74(74):65–72.
55. Shrestha A, Kishen A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. *J Endod [Internet]*. 2016;42(10):1417–26. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2016.05.021>
56. Del Carpio-Perochena A, Kishen A, Shrestha A, Bramante CM. Antibacterial Properties Associated with Chitosan Nanoparticle Treatment on Root Dentin and 2 Types of Endodontic Sealers. *J Endod*. 2015;41(8):1353–8.

57. Chavez de Paz LE, Resin A, Howard KA, Sutherland DS, Wejse PL. Antimicrobial Effect of Chitosan Nanoparticles on Streptococcus mutans Biofilms. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2011;77(11):3892–5. Disponible en: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02941-10>
58. Doğan H. Effects of chelating agents and sodium hypochlorite on mineral content of root dentin. *J Endod*. 2001;27(9):578–80.
59. Vasudev Ballal N, Mala K, Seetharama Bhat K. Evaluation of decalcifying affect of maleic acid and EDTA on root canal dentin using energy dispersive spectrometer. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* [Internet]. 2011;112(2):e78–84. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.01.034>
60. Kaufman D, Mor C, Stabholz A, Rotstein I. Effect of gutta-percha solvents on calcium and phosphorus levels of cut human dentin. *J Endod*. 1997;23(10):614–5.
61. Hennequin M, Douillard Y. Effects of citric acid treatment on the Ca, P and Mg contents of human dental roots. *J Clin Periodontol*. 1995;22(7):550–7.
62. Spanó JCE, Silva RG, Guedes DFC, Sousa-Neto MD, Estrela C, Pécora JD. Atomic Absorption Spectrometry and Scanning Electron Microscopy Evaluation of Concentration of Calcium Ions and Smear Layer Removal With Root Canal Chelators. *J Endod*. 2009;35(5):727–30.
63. Gurbuz T, Ozdemir Y, Kara N, Zehir C, Kurudirek M. Evaluation of Root Canal Dentin after Nd:YAG Laser Irradiation and Treatment with Five Different Irrigation Solutions: A Preliminary Study. *J Endod*. 2008;34(3):318–21.
64. Belli S, Erdemir A. Effect of Gutta-percha Solvents on Mineral Contents of Human Root

- Dentin Using ICP-AES. 2004;(1):2003–5.
65. Ceja Andrade I, Valencia Hitte R, Espinosa Sánchez D, Uribe Campero M. Microscopía electrónica y su aplicación en la odontología. 1era edici. Espinosa Fernández R, editor. México: Ámate Editorial; 2013. 1–244 p.
  66. Ramírez-Bommer C, Gulabivala K, Y-I N. Estimated depth of apatite and collagen degradation in human dentine by sequential exposure to sodium hypochlorite and EDTA : a quantitative FTIR study. *Int Endod J*. 2018;469–78.
  67. Sawtarie N, Cai Y, Lapitsky Y. Preparation of Chitosan / Tripolyphosphate Nanoparticles with Highly-Tunable Size and Low Polydispersity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2017; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.055>
  68. Barry AL, Craig WA, Nadler H, Reller LB, Sanders CC, Swenson JM. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. Vol. 19. NCCLS; 1999.
  69. Madureira AR, Pereira A, Castro PM, Pintado M. Production of antimicrobial chitosan nanoparticles against food pathogens. 2015;167:210–6.
  70. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(15):1688–713.
  71. Castro Mandujano N, Vidal Caldas CC. Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Rev la Soc Química del Perú*. 2010;76(4):336–54.
  72. Tomaz AF, Maria S, Carvalho S De, Barbosa RC. Ionically Crosslinked Chitosan

- Membranes Used as Drug Carriers for Cancer Therapy Application. *Materials (Basel)*. 2018;11(2051):1–18.
73. Anand M, Sathyapriya P, Maruthupandy M, Beevi AH. Synthesis of chitosan nanoparticles by TPP and their potential mosquito larvicidal application. *Front Lab Med [Internet]*. 2018;2(2):72–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.flm.2018.07.003>
74. Costa EM, Silva S, Vicente S, Neto C, Castro PM, Veiga M, et al. Chitosan nanoparticles as alternative anti-staphylococci agents: Bactericidal, antibiofilm and antiadhesive effects. *Mater Sci Eng C [Internet]*. 2017;79:221–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.047>
75. Kant TR, Poonam S. Nanoparticles: Their synthesis and their applications. *Res J Biotechnol*. 2019;14(2):92–102.
76. Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surfaces B Biointerfaces [Internet]*. 2012;90(1):21–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042>
77. Almalik A, Alradwan I, Kalam MA, Alshamsan A. Effect of cryoprotection on particle size stability and preservation of chitosan nanoparticles with and without hyaluronate or alginate coating. *Saudi Pharm J*. 2017;25(6):861–7.
78. Huang Y, Lapitsky Y. Monovalent salt enhances colloidal stability during the formation of chitosan/tripolyphosphate microgels. *Langmuir*. 2011;27(17):10392–9.
79. Kimberly Anne Milligan CW and JS. Preparation and Physiochemical Characterization of Chitosan Nanoparticles for Controlled Delivery of Oxytocin. *Int J Pharm Sci Res*.

- 2018;9(4):1430–40.
80. Yousefpour P, Atyabi F, Vasheghani-Farahani E, Movahedi AAM, Dinarvand R. Targeted delivery of doxorubicin-utilizing chitosan nanoparticles surface-functionalized with anti-Her2 trastuzumab. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:1977–90.
  81. Kirshnan R, Arumugam V, Kumar Vasaviah S. The MIC and MBC of Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* - A Facultative Anaerobe. *J Nanomed Nanotechnol*. 2015;06(03).
  82. Geethapriya N, Subbiya A, Padmavathy K, Mahalakshmi K, Vivekanandan P, Ganapathy Sukumaran V. Effect of chitosan-ethylenediamine tetraacetic acid on *Enterococcus faecalis* dentinal biofilm and smear layer removal. *Iran Endod J*. 2015;10(1):39–43.
  83. Elshinawy MI, Al-madboly LA, Ghoneim WM. Synergistic Effect of Newly Introduced Root Canal Medicaments ; Ozonated Olive Oil and Chitosan Nanoparticles , Against Persistent Endodontic Pathogens. 2018;9(July).
  84. Shi Z, Neoh KG, Kang ET, Wang W. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials*. 2006;27(11):2440–9.
  85. Ozdemir HO, Buzoglu HD, Çalt S, Çehreli ZC, Varol E, Temel A. Chemical and ultramorphologic effects of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite in young and old root canal dentin. *J Endod*. 2012;38(2):204–8.
  86. Cobankara FK, Erdogan H, Hamurcu M. Effects of chelating agents on the mineral content of root canal dentin. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* [Internet]. 2011;112(6):e149–54. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.06.037>

87. Tanaskovic-Stankovic S, Tanaskovic I, Jovicic N, Miletic-Kovacevic M, Kanjevac T, Milosavljevic Z. The mineral content of the hard dental tissue of mesiodens. *Biomed Pap.* 2018;162(2):149–53.
88. Cakir F, Korkmaz Y, Firat E, Oztas S, Gurgan S. Chemical Analysis of Enamel and Dentin Following the Application of Three Different At-home Bleaching Systems. *Oper Dent.* 2011;36(5).
89. Lima Nogueira BM, Da Costa Pereira TI, Pedrinha VF, de Almeida Rodrigues P. Effects of different irrigation solutions and protocols on mineral content and ultrastructure of root canal dentine. *Iran Endod J.* 2018;13(2):209–15.
90. Erdemir A, Eldeniz AÜ, Belli S. Effect of gutta-percha solvents on mineral contents of human root dentin using ICP-AES technique. *J Endod.* 2004;30(1):54–6.
91. Silva P V., Guedes DFC, Nakadi F V., Pécora JD, Cruz-Filho AM. Chitosan: A new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation. *Int Endod J.* 2013;46(4):332–8.
92. Silva PV, Guedes DFC, Pécora JD, da Cruz-Filho AM. Time-dependent effects of chitosan on dentin structures. *Braz Dent J.* 2012;23(4):357–61.
93. Bhat SA, Bhat MM, Zargar AW. Determination of chelating ability of chitosan in different acids. *J Adv Med Dent Sci Res.* 2019;7(5):99–101.