

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA**

MAESTRÍA EN ESTOMATOLOGÍA CON OPCIÓN TERMINAL EN PEDIATRÍA

**“Síntesis y caracterización de membranas
mucoadhesivas de arilenaminona/Quitosano con
potencial actividad contra *Streptococcus mutans*”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN ESTOMATOLOGÍA CON OPCIÓN TERMINAL EN PEDIATRÍA

PRESENTA:

NAYELI VANESSA MACHUCA ROJAS

Director: D.C. Alberto Vinicio Jerezano Domínguez ID NSS524063

Director Disciplinario: M.E.P. Jennifer Anton Sarabia ID 100398199

Director Metodológico: M.E.P. Alejandra Peral García ID 100043911

Asesor Externo: Dra. Rita Elizabeth Martínez Martínez

Lector: Miguel Angel Casillas Santana ID 100526485

Heroica Puebla de Zaragoza, junio 2023

I.- Dictamen de aprobación de tesis



Oficio No. FESIEP/CIFE/056/2023

C. Nayeli Vanessa Machuca Rojas
Alumna de la Maestría en Estomatología
con opción en Terminal en Pediatría
Matrícula No.: 221450014
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Siwa este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, el que suscribe MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; por este medio me permito informar a Usted, que, está Secretaría de Posgrado aprueba la impresión de la Tesis titulada:

"Síntesis y caracterización de membranas mucoadhesivas de arilenaminona/Quitosano con potencial actividad contra Streptococcus mutans".

derivada del Proyecto de Investigación Titulado:

"Formulación de membrana de Arilenaminona/quitosano con potencial actividad contra Streptococcus mutans".

misma que presentará para realizar su examen profesional y obtener el grado de Maestra en Estomatología con opción en Terminal en Pediatría; para su conocimiento y atención correspondiente.

Sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., 01 de junio de 2023.

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



*Se anexa: Formato de Impresión de Tesis (Original) - p.s.c y a.
*C.p. Archivo
*MTR. FJMA/DR.FADV/janeth

Facultad
de Estomatología

31 Poniente 1304, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C. P. 72410
01 (222) 229 55 00 Ext. 6400

II.- Autorización de impresión.

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS RECEPCIONAL**

Para obtener el Grado de: **Maestra en Estomatología con Opción terminal en Pediatría**

Registro CIFE: 2022183 Fecha: jueves 01 de junio del 2023

Título de la Tesis "Síntesis y caracterización de membranas mucoadhesivas de arilenaminona/Quitosano con potencial actividad contra Streptococcus mutans".

Nombre del alumno: **Nayeli Vanessa Machuca Rojas**

Matrícula: **221450014**

Domicilio: **31 poniente #3324 Col. Santa Cruz los Ángeles.**

Tel: **66*45 97 73 47**

Fecha de ingreso a la Facultad: **lunes 06 de enero del 2020.**

Firma: _____

Director de Tesis: **DC. Alberto Vinicio Jerezano Domínguez**

Grado académico: **Doctor en Ciencias**

Adscripción: **Facultad de Estomatología**

ID: **NSS524063**

Tel: **22*24 26 95 08**

Firma: _____

Director Disciplinario: **MEP. Jennifer Antón Sarabia.**

Grado académico: **Maestría en Estomatología Pediátrica**

Adscripción: **Facultad de Estomatología**

ID: **100398199**

Tel: **22*21 58 42 90**

Firma: _____

Director Metodológico: **MEP. María Alejandra Peral García**

Grado académico: **Maestría en Estomatología Pediátrica**

Adscripción: **Facultad de Estomatología**

ID: **100043911**

Tel: **22*22 09 40 08**

Firma: _____

Lector: **DC. Miguel Ángel Casillas Santana**

Grado académico: **Doctor en ciencias odontológicas**

Adscripción: **Facultad de Estomatología**

ID: **100526485**

Tel: **44*48 46 76 45**

Firma: _____

Nombre y firma de aprobación del Responsable de la Maestría en Estomatología con Opción terminal en Pediatría.

MEP. José Alberto Hachity Ortega

Firma: _____

La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología, autoriza la impresión de la Tesis.

M.O. Farid Alfonso Dipp Velázquez



Fecha: jueves 01 de junio del 2023

III.- Oficio de aceptación de proyecto C.I.F.E



Oficio No. FESIEP/CIFE/083/2022

ASUNTO: Dictamen

**A quien corresponda
P R E S E N T E:**

*La Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado con base a lo estipulado por el Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por este medio hace **CONSTAR** que:*

*El Proyecto de Investigación (Colectivo) “Formulación de membrana de Arilenaminona/quitosano con potencial actividad contra Streptococcus mutans” presentado por el Responsable del proyecto: DC. Alberto Vinicio Jerezano Domínguez NSS524063; teniendo como Director Metodológico: María Alejandra Peral García ID 100043911; teniendo como Director Disciplinario: MEP. Jennifer Antón Sarabia ID 100398199; teniendo como Asesor externo: Dra. Rita Martínez Martínez; teniendo como alumno a la C. Nayeli Vanessa Machuca Rojas matrícula 221450014; ha sido **ACEPTADO** y queda registrado en esta secretaría en el libro de registros 07 en la hoja 01 con No. de registro **2022183**.*

Se extiende la presente constancia en la Heroica Puebla de Zaragoza a los doce días del mes de octubre del año dos mil veintidós.

Atentamente
“Pensar bien, para vivir mejor”
H. Puebla de Z., a 12 de octubre de 2022

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología

c.c.p. minutarlo



Facultad
de Estomatología

31 Poniente 1304, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C. P. 72410
01 (222) 229 55 00 Ext. 6400

IV.- Reporte de similitud anti plagio.

Síntesis y caracterización de membranas

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA Trabajo del estudiante	9%
2	documents.mx Fuente de Internet	2%
3	ciqa.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	1%
4	Encuentro Nacional Iberoamericano de Investigación en Odontología. "Trabajos presentación cartel", Revista Odontológica Mexicana, 2023 Publicación	1%
5	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
6	repositorioinstitucional.buap.mx Fuente de Internet	1%
7	html.rincondelvago.com Fuente de Internet	1%

revistas.unimagdalena.edu.co

V.- Evidencia de productos académicos derivados del proyecto



Participación en modalidad cartel con el tema "Formulación de membranas de arilenaminona/quitosano con potencial actividad contra *Streptococcus mutans*". en el XXX Encuentro Nacional y XXI Iberoamericano de Investigación en Odontología. ENIO 2022. Noviembre de 2022.

VI.- Agradecimientos

Quiero dar gracias a Dios por darme la capacidad, inteligencia, entendimiento y sabiduría para terminar esta etapa escolar, descubrí una parte de mí estos últimos años que no conocía y sé que tiene un propósito en esta tierra.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que contribuyeron de manera significativa a la realización de este proyecto de investigación. En primer lugar, agradezco a mi asesor académico, Alberto Vinicio Jerezano Domínguez, por su guía experta, apoyo constante y dedicación a lo largo de todo el proceso de investigación. Sus conocimientos y orientación fueron fundamentales para el desarrollo exitoso de este trabajo.

Asimismo, quiero agradecer a todos los participantes de este estudio, Dra. Laura Pazos por su incondicional ayuda, Dra. Jennifer Antón por estar al pendiente de mis avances y ofrecerme siempre su ayuda en revisión del documento, Dra. Alejandra Peral por su excelente y eficiente ayuda en correcciones de redacción, Dra. Rita Martínez por sus excelentes observaciones a través de la redacción y trabajo, a los docentes de laboratorios y pasantes, cuya colaboración fue esencial para obtener los datos necesarios, Dr. Alberto Hachity por darme la oportunidad de estudiar en el posgrado. Su disposición y contribuciones han sido invaluable para la validez y la relevancia de los resultados obtenidos.

Además, quiero expresar mi gratitud y amor a mi esposo Gastón Santos, por apoyarme en mis desvelos en noches de lectura, búsqueda de artículos, por ser novio, esposo, maestro de estadística y psicólogo personal en día de estrés. Por enseñarme a enfocarme en lo que de verdad importa y por ser un pilar fuerte para mí.

A mi familia y amigos quienes me brindaron su apoyo y aliento durante esta travesía académica. Su constante respaldo emocional y palabras de aliento me han motivado a superar los desafíos y obstáculos que encontré en el camino.

Por último, quiero reconocer a la institución educativa y a todos los profesores y personal administrativo que han contribuido a mi formación académica. Su compromiso con la excelencia y los recursos brindados han sido fundamentales para el logro de esta meta. A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento por ser parte de este viaje académico y por su invaluable ayuda y apoyo.

VII.-

1. Índice general

2. RESUMEN.....	14
3. ABSTRACT.....	15
4. INTRODUCCIÓN.....	16
5. ANTECEDENTES.....	18
ANTECEDENTES GENERALES.....	18
CARIES.....	18
ENAMINONAS.....	20
GLUCONATO DE CLORHEXIDINA.....	25
MEMBRANAS.....	25
6. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	26
ENAMINONAS.....	27
7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	29
9. JUSTIFICACIÓN.....	30
10. HIPÓTESIS.....	31
11. OBJETIVOS.....	31

OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
<u>12. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	<u>32</u>
DISEÑO DEL ESTUDIO	32
POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA	33
CRITERIOS DE SELECCIÓN	33
VARIABLES	34
CONCORDANCIA Y FIABILIDAD	36
UBICACIÓN ESPACIO - TEMPORAL	37
PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	37
EQUIPOS E INSTRUMENTOS	38
<u>13. METODOLOGÍA</u>	<u>39</u>
SÍNTESIS DE LA ARILENAMINONA	39
PURIFICACIÓN	39
CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS	39
ANÁLISIS DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TCL)	39
SÍNTESIS DE MEMBRANAS	40
ESPECTROMETRÍA DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA DE RAYOS X (EDS)	41
PRUEBA DE MUCOADHESIVIDAD	41
CAPACIDAD DE HINCHAMIENTO	42
COMPORTAMIENTO DE ABSORCIÓN DE AGUA	42
DESINTEGRACIÓN	43
ABSORCIÓN DE HUMEDAD	43
PH DE SUPERFICIE	44

PRUEBA ANTIBACTERIANA.....	44
<u>14. RESULTADOS.....</u>	<u>46</u>
SÍNTESIS DE LA ARILENAMINONA.....	46
DESCRIPCIÓN DE FTIR	47
SÍNTESIS DE LA MEMBRANA QUITOSANO/ARILENAMINONA	50
PREPARACIÓN DE MEMBRANAS CON Y SIN GLICEROL.....	51
MODIFICACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MEMBRANA DE QUITOSANO/ ARILENAMINONA	52
CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS.....	55
MICROSCOPIA ÓPTICA.	55
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).....	59
ANÁLISIS DE EDS	60
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA <i>S. MUTANS</i>.	62
PROPIEDADES DE LAS MEMBRANAS	64
HINCHAMIENTO DE MEMBRANAS.....	64
ABSORCIÓN DE AGUA	64
PH DE SUPERFICIE	65
MUCOADHESIÓN.....	65
<u>15. DISCUSIÓN</u>	<u>66</u>
<u>16. CONCLUSIÓN</u>	<u>69</u>
<u>17. BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>70</u>
<u>18. ANEXOS</u>	<u>74</u>

VIII.- Índice de tablas y figuras.

Figura 1. Fuente propia. Desventajas de clorhexidina en el efecto contra S. mutans.	19
Figura 2. Fuente propia, b-enaminona, compuesto farmacológicamente activo.	20
Figura 3. Fuente propia, estructura de compuesto de arilenaminona.	21
Figura 4. Prueba mucoadhesión en máquina universal.	42
Figura 5. Propuesta sintética tandem para la obtención del derivado arilenaminona (3).....	46
Figura 6. Propuesta mecanística para la obtención del sistema push-pull de arilenaminona 3.	47
Figura 7. Espectros de FTIR ATR de 1 y 3.....	48
Figura 8. Secuencia de la formulación de membrana quitosano/ arilenaminona.	52
Figura 9. Formulación de membrana quitosano/ clorhexidina.....	54
Figura 10. FTIR Quitosano, arilenaminona y clorhexidina.....	55
Figura 11. Membrana Quitosano/ Arilenaminona al 5%. (4x).....	56
Figura 12. Membrana Quitosano/Arilenaminona al 5% (10x).....	56
Figura 13. Membrana Quitosano/arilenaminona al 5% (20x).	56
Figura 14. Membrana Quitosano/arilenaminona al 5% (40x).	57
Figura 15. Membrana Quitosano/arilenaminona al 7% (4x).	57
Figura 16. Membrana Quitosano/arilenaminona al 7% (10x).	58
Figura 17. Membrana Quitosano/arilenaminona al 7% (20x).	58
Figura 18. Membrana Quitosano/arilenaminona 7%(40x).	59
Figura 19. Imagen MEB de membrana Quitosano/arilenaminona 5%.	59
Figura 20. Imagen EDS de membrana Quitosano/arilenaminona 5%.	60
Figura 21. Imagen MEB membrana Quitosano/arilenaminona 7%.	61
Figura 22. Imagen EDS de membrana Quitosano/arilenaminona 7%.	61

Figura 23 Actividad antimicrobiana de Quitosano/arilenaminona/Glicerol 5% contra S mutans.	62
Figura 24. Actividad antimicrobiana de Quitosano/glicerol contra S. mutans.	63
Figura 25. Actividad antimicrobiana de Quitosano/glicerol/clorhexidina.	63
Figura 27. Bacterias estudiadas contra enaminonas para actividad antimicrobiana. Fuente propia.	67
Figura 28. Incremento de estudios de enaminonas con actividad antibacteriana en los últimos 15 años. Fuente propia.	68
Tabla 1 Revisión de actividad antibacteriana de enaminonas los últimos 15 años.	22
Tabla 2. Distribución de la muestra en los diferentes grupos de estudio.....	33
Tabla 3. Variables de estudio.....	34
Tabla 4. Reactivos y solventes utilizados en laboratorio, pureza y marca.....	38
Tabla 5.Equipos e instrumentos para esta investigación.....	38
Tabla 6. Formulación de membranas de quitosano arilenaminona con glicerol a diferentes concentraciones.	40
Tabla 7. Desplazamientos de FTIR-ATR de compuestos 1 y 3.	47
Tabla 8. Pruebas de formulación de cantidades e ingredientes.	48
Tabla 9. Pruebas de solubilidad de enaminona.	49
Tabla 10. Hinchamiento. Después de 5 minutos en saliva artificial a 35°C y pH 7.54.	64
Tabla 11. Porcentaje de absorción de agua. 5 minutos en saliva artificial a 35 °C y pH 7.54.....	64
Tabla 12. pH de la saliva 7.54.....	65
Tabla 13. Prueba de mucoadhesividad.....	65

Tabla 14. Medición de halo de inhibición en mm.....	74
Tabla 15. Hinchamiento. Después de 5 minutos en saliva artificial a 35°C y pH 7.54.....	74
Tabla 16. Porcentaje de absorción de agua. 5 minutos en saliva artificial a 35 °C y pH 7.54.	74
Tabla 17. pH de la saliva 7.54	75
Tabla 18. Prueba de mucoadhesividad.	75
Tabla 19. Grosor de membranas.....	75

IX.- Abreviaturas

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

S. mutans: Streptococcus mutans

S. sobrinus: Streptococcus sobrinus

S. sanguis: Streptococcus sanguis

C. albicans: Candida albicans

S. aureus: Staphylococcus aureus

E. faecalis: Enterococcus faecalis

E. coli: Escherichia coli

M. catarrhalis: Moraxella catarrhalis

B. subtilis: Bacillus subtilis

S. pneumoniae: Streptococcus pneumoniae

FDA: Federal Drug Association

ARNm: ARN mensajero

ADN: ácido desoxirribonucleico

pH: potencial de hidrogeno

CHX: Clorhexidina

CMC: Carboximetilcelulosa

ePTFE: politetrafluoroetileno

Rpm: revoluciones por minuto

TCL: Análisis de cromatografía en capa fina

FTIR: Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de fourier

MEB: Microscopía electrónica de barrido

EDS: Espectrometría de dispersión de energía de rayos X

Rf: factor de retención

“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS MUCOADHESIVAS DE ARILENAMINONA/QUITOSANO CON POTENCIAL ACTIVIDAD CONTRA *STREPTOCOCCUS MUTANS*”

2. RESUMEN

La caries dental es la destrucción localizada del tejido duro dental bajo la influencia de la actividad microbiana. El *Streptococcus mutans* (SM) es el principal agente microbiano que forma un biofilm en la superficie del diente y causa la caries dental. Las intervenciones de control de caries se centran en disminuir los *Streptococcus* cariogénicos de la cavidad oral, inhibir la producción de glucanos y evitar la formación de biopelículas.

El desarrollo de productos sintéticos para el cuidado bucal se ha enfocado en la aplicación de agentes anti-placa con un elevado efecto anti carioso. Las β -enamionas son compuestos biológicamente activos que se pueden usar de forma sintética y en la química de fármacos. En el presente estudio una nueva enamionona y se formularon nuevas membranas de quitosano/arilenaminona y membranas de quitosano/glicerol/clorhexidina con potencial actividad contra *S. mutans*. Se evaluó la actividad antimicrobiana de las membranas y se consideran una potencial alternativa en el tratamiento de la formación de biofilm y la incidencia de caries dental.

PALABRAS CLAVE: enamionona, quitosano, antibacterial, *S. mutans*, membrana, clorhexidina y mucoadhesivo

3. ABSTRACT

Streptococcus mutans (SM) is the principal microbial agent that forms a biofilm on the tooth surface and causes dental caries. Caries control blasts focus on decreasing cariogenic Streptococci from the oral cavity, inhibiting glucan production, and preventing biofilm formation. The development of synthetic oral care products has focused on the application of anti-plaque agents with a high anti-cariogenic effect. β -Enaminones are biologically active compounds that can be used synthetically and in drug chemistry. In the present study, a new N-diaryleneaminone was synthesized and new chitosan/aryleneaminone, chitosan/glycerol/chlorhexidine membranes with potential activity against *Streptococcus mutans* were formulated. The antimicrobial activity of the membranes was evaluated, and it is considered a potential alternative in the treatment of biofilm formation, reducing the incidence of dental caries.

Key words: enaminone, chitosan, antibacterial, *S. mutans*, film, chlorhexidine and mucoadhesive

4. INTRODUCCIÓN

La caries dental es la destrucción localizada del tejido duro dental bajo la influencia de la actividad microbiana. El *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) es considerado como el principal agente microbiano que favorece la agregación bacteriana en un conjunto de poliespecies, conocido como biofilm, el cual se adhiere a la superficie del diente. El biofilm produce diferentes enfermedades bucales como la caries dental, enfermedad multifactorial que afecta ampliamente al ser humano durante toda su vida. *S. mutans* se adhiere a las superficies de los dientes mediante la síntesis de polisacáridos extracelulares a partir de sacarosa, posteriormente, metaboliza azúcares provenientes de la dieta en ácidos orgánicos, provocando desmineralización del esmalte dental.

Las intervenciones de control de caries apuntan principalmente a disminuir los *Streptococos* cariogénicos de la cavidad oral, inhibir la producción de glucanos y evitar la formación de biopelículas, para bloquear o modificar los sitios implicados en la adherencia de *S. mutans*, lo que reduce la eficacia de las interacciones con la superficie dental. Los dentífricos, enjuagues bucales y diversos productos dentales en forma de gel, polvo, pasta o líquido poseen ingredientes activos que cumplen múltiples funciones con el propósito de mejorar la higiene bucal y mantener una buena salud bucal. El desarrollo de productos sintéticos para el cuidado bucal se ha encauzado hacia la aplicación de agentes anti-placa con un elevado efecto anti carioso, por lo que, en el proceso de desarrollo de nuevos compuestos farmacológicamente activos, los compuestos sintéticos de origen orgánico representan una importante fuente de moléculas potencialmente activas.

Las β -enaminonas, $O=C-C=C-NH$, son compuestos biológicamente activos que pueden usarse de forma sintética y en la química de fármacos. Los derivados de enaminonas se utilizan como materiales de partida adecuados para el desarrollo de moléculas bioactivas en química médica. Considerando su actividad anticonvulsiva, antimicrobiana, antioxidante, antitumoral y citogenética, las enaminonas representan un grupo prometedor de terapias. Actualmente, en la literatura no existen estudios que determinen la actividad antimicrobiana contra *S. mutans* de estos compuestos.

En el presente trabajo se sintetizó una nueva arilenaminona y se formularon nuevas membranas de quitosano/arilenaminona con potencial actividad contra *S. mutans*. Se evaluó la actividad antimicrobiana de las membranas lo que permite considerarlas como una potencial alternativa en el tratamiento de la formación de biofilm, disminuyendo la incidencia de caries dental.

5. ANTECEDENTES

ANTECEDENTES GENERALES

CARIES

La caries dental es la enfermedad crónica más prevalente en el mundo y afecta del 60% al 90% de los niños en edad escolar y la mayoría de los adultos. La caries dental es una enfermedad dinámica, no transmisible, multifactorial, mediada por biopelículas, modulada por la dieta, que produce una pérdida de minerales de los tejidos duros dentales. Esta determinada por factores biológicos, conductuales, psicosociales y ambientales. La caries es principalmente causada por un cambio ecológico en la composición y actividad de la biopelícula bacteriana cuando se expone con el tiempo a los carbohidratos fermentables, lo que provoca una ruptura en el equilibrio entre la desmineralización y la remineralización (1,2).

Los primeros signos consisten en lesiones cariosas no cavitadas, es decir, lesiones iniciales o de manchas blancas. La progresión del proceso de la enfermedad con una mayor pérdida de minerales dentales conduce a una lesión cavitada. Detener las lesiones cavitadas es más difícil, ya que la pérdida de la estructura del diente crea nichos para la biopelícula que no son fácilmente accesibles. Por lo tanto, la disminución de la carga bacteriana de la cavidad bucal es uno de los objetivos biológicos fundamentales en la prevención de la caries dental; preservar la estructura dental y la salud de la pulpa también es un principio rector para el tratamiento de las lesiones cariosas cavitadas (3,4).

Entre los microorganismos que se encuentran involucrados en el desarrollo de la biopelícula o placa dental se encuentran el *S. mutans*, *S. sanguis*, *Lactobacillus* y *Veillonella spp.* Específicamente el *S. mutans* se relaciona con la biopelícula cariogénica. Su morfología es de coco Gram positivo, anaerobio y aerobio facultativo y se dispone en pares o en cadenas cortas. Antes de la formación de la caries dental tiene lugar un aumento significativo de *S. mutans* en la saliva. Además, *S. mutans* y *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) han sido considerados como los principales patógenos orales involucrados en el inicio y desarrollo de la caries dental; han mostrado niveles específicos de resistencia bacteriana a los antibióticos (5).

Entre los antimicrobianos locales, se encuentran los enjuagues bucales, los cuales son soluciones hechas a base de antisépticos, estos se usan para disminuir el número de bacterias causantes de caries, dado que el gluconato de clorhexidina es una bis-biguanida se considera de acción rápida y presenta un elevado índice de adhesión residual o permanencia en la piel (sustantividad), con un tiempo de duración de 7 a 12 h en concentraciones al 0.12% y 0.2% y combinado con otros compuestos como alcoholes, usado en los colutorios, presenta un amplio espectro antimicrobiano y fungicida. Entre pH 5 y 8 el gel de gluconato de clorhexidina es muy eficaz frente al *S. mutans* y la *Cándida albicans* (*C. albicans*), así como a otras bacterias Gram (+) y Gram (-) (5).

La efectividad de la clorhexidina ha sido demostrada ampliamente, al igual que los efectos adversos relacionados con su concentración, tales como, manchas en las superficies de los dientes y en la lengua; para reducir estas complicaciones se usan agentes antioxidantes y se disminuye la dosis diaria, pero ninguno de estos métodos ha logrado su objetivo, solo han obtenido un éxito parcial (Figura1) (5,6).

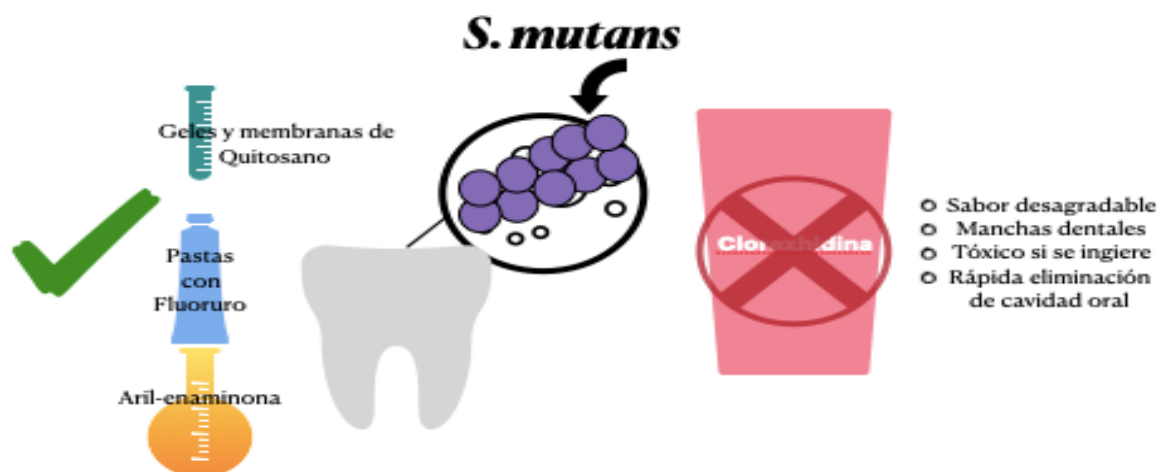


Figura 1. Fuente propia. Desventajas de clorhexidina en el efecto contra *S. mutans*.

Por lo anterior, en el área de la odontología se continúa con la búsqueda de compuestos orgánicos de origen sintético que tengan propiedades antimicrobianas ante *S. mutans*.

ENAMINONAS

En la búsqueda de nuevos compuestos farmacológicamente activos, las β -enaminonas, $O=C-C=C-NHR$, representan una importante fuente de moléculas potencialmente bioactivas. Éstas consisten en un grupo amino unido por un doble enlace carbono-carbono a un grupo carbonilo en donde el grupo carbonilo facilita la preparación, el aislamiento y el almacenamiento del complejo, proporcionando la estabilidad requerida al sistema $OH-C=C-C=NHR$ (Figura 2). La presencia del grupo OH es esencial para obtener actividad biológica probablemente debido a las interacciones favorables a través de enlaces de hidrógeno establecidos (7–10).

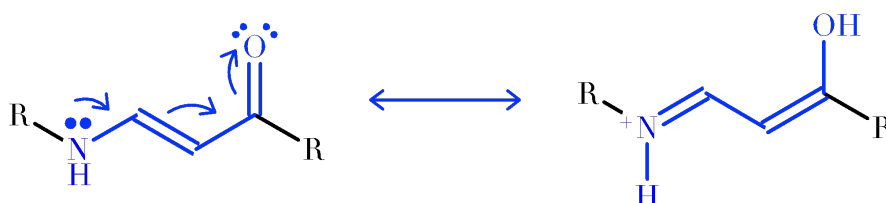


Figura 2. Fuente propia, β -enaminona, compuesto farmacológicamente activo.

Las arilenaminonas son un subgrupo importante de enaminonas que se utilizan para sintetizar varios análogos heterocíclicos y biológicamente activos. Naringrekar y Stella (1990) investigaron la estabilidad estructural de las N-arilenaminonas y evaluaron su capacidad como profármacos de aminas primarias. Las N-arilenaminonas han recibido una gran atención durante la última década y se ha trabajado mucho para explorar nuevas rutas para la síntesis de arilenaminonas (11).

Las arilenaminonas se utilizan como materiales de partida adecuados para el desarrollo de moléculas bioactivas en química médica debido a la lipofilia y la extrema sensibilidad a cambios menores. La principal ventaja de estos compuestos es su estabilidad en condiciones de pH fisiológico simulado y baja toxicidad. Su actividad antibacteriana se ha probado contra cepas Gram + como, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* y cepas Gram - tales como, *Escherichia coli* y *Moraxella catarrhalis* (12–14). En la figura 3 se observa la estructura general de arilenaminonas que se sintetizaron en este trabajo.

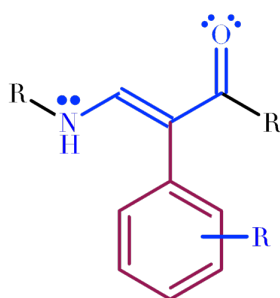


Figura 3. Fuente propia, estructura de compuesto de arilenaminona.

Además, se ha observado que los compuestos que contienen el fragmento de arilenaminona exhiben actividad antibacteriana contra agentes patógenos, así como propiedades anticonvulsivas y antitumorales. Esto indica la amplia importancia biológica de estas moléculas. En la búsqueda de compuestos antiepilépticos con una mayor selectividad y menor toxicidad, se han identificado las arilenaminonas como sustancias químicas prometedoras y se han evaluado por su actividad anticonvulsiva y antibacteriana. La mayoría de las arilenaminonas son de naturaleza básica, lo cual las convierte en excelentes candidatas para detener las convulsiones a través de mecanismos tanto sinápticos como no sinápticos, y también para prevenir los ataques convulsivos (15–17).

En el presente estudio se realizó una revisión de la literatura sobre diversos tipos de enaminonas y que bacterias fueron provadas contra ellas, para así identificar los efectos antimicrobianos que han sido reportados los últimos 15 años (Tabla 1).

Tabla 1 Revisión de actividad antibacteriana de enaminonas los últimos 15 años.

Año	Lugar	Enaminona	Bacterias	Autor
2009	Kuwait	Enaminonas cíclicas	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>E. faecium</i> .	S Edafiogho I y cols.
2010	Pakistan	4-N,N-di-n-propilamina-pent-3-eno-2-ona(HL2), 4-N,N-diciclohexilamina-pent-3-ene-2-ona (HL3)	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> .	Tariq Mahmud y cols.
2011	Egypt	tiadiazol-enaminonas	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i>	Thoraya A y cols.
2011	Pakistan	4-N,N-dietilamina-pent-3-eno-2-ona [HL1], 4-N,N-dietilamina-pent-3-eno-2-ona [HL2] 4-N,N-diciclohexilamina-pent-3-eno-2-ona [HL3]	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> .	Tariq Mahmud y cols.
2015	Egypt	Nafto[b]1,4Oxazina	<i>S. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> .	Islham H y cols.
2015	Kuwait	3-(dimetilamino)-1-(tiophen-2-il)prop-2-en-1-ona. Y 3-(dimetilamino)-1-fenilprop-2-en-1-ona	<i>B. subtilis</i> , <i>E. Coli</i> , <i>S aureus</i> , <i>S. typhi</i> .	Jeragh B y cols.
2017	Croacia	4-[(2-hidroxi-5-metilfenil)amino]pent-3-en-2-ona (H2L1), 4-[(2-hidroxi-4-metilfenil)amino]pent-3-en-2-ona (H2L2), 4-[(4-hidroxi-2-metilfenil)amino]]pent-3-en-2-ona (H2L3), 3-[(2-hidroxi-5- metilfenil)amino]-1-fenilbut-2-en-1-ona (H2L4), 3-[(2-hidroxi-4-metilfenil)amino]-1-fenilbut-2-en-1-ona (H2L5) y 3-[(4- hidroxi-2-metilfenil)amino]-1-fenilbut-2-en-1-ona (H2L6)	<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> .	Marina Cindrić y cols.
2018	Croacia	enaminona derivada de la benzilacetona ONO	<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>M. catarrhalis</i> .	Pisk J y cols.
2020	India	Enaminona de Ácido Úsnico N-Propargil	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> .	Bangalore P y cols.
2020	Iraq	di-β-enaminona	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> .	Ahmed A y cols.
2021	Morocco	pirazolo-enaminonas	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> .	Akhramez S y cols.
2021	EE. UU	Enaminonas cíclicas y acíclicas	<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> y <i>M. catarrhalis</i> .	Isis J y cols.
2022	India	enaminonas de ácido úsnico unidas a aril-n-hexanamida	<i>S typhi</i> , <i>B. subtili</i> , <i>S. mutans</i> y <i>E. coli</i>	Bangalore P y cols.
2022	Iraq	β-enaminona	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>K. pneumonia</i> , <i>E. Coli</i>	Kadhom H y cols.

2022	India	Aril-N-enaminona	<i>B. subtilis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> .	Bangalore P y cols.
------	-------	------------------	--	------------------------

QUITOSANO

En los últimos años, los polímeros naturales han recibido mucha atención debido a que pueden ser una alternativa a los polímeros sintéticos (11). El quitosano es un copolímero aprobado por la FDA (Federal Drug Association), derivado desacetilado de quitina que es el segundo polímero natural más abundante encontrado en conchas de crustáceos y paredes de hongos. El quitosano es una sustancia no tóxica, estable, esterilizable y biocompatible, presenta un perfil único y atractivo con propiedades antimicrobianas, inmunoestimulantes, hemostáticas, de curación, ha sido ampliamente utilizado en sistemas de administración de fármacos e ingeniería de tejidos, tiene propiedades importantes como bioactividad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad, mucoadhesión y actividad antimicrobiana de amplio espectro (18,19).

Su carga positiva se acumula en las paredes celulares de las bacterias, promoviendo una propiedad bactericida y bacteriostática junto con la capacidad de formar una película y adherirse al diente, que promueven al quitosano cómo una base ideal para la liberación sostenida de medicamentos (20).

Recientemente, varios autores han informado sobre la actividad antimicrobiana y antibiofilm del quitosano sobre varios microorganismos relacionados con enfermedades orales. Bae y cols., en el 2006 informaron que presenta efecto antibacteriano *in vitro* sobre *Streptococcus mutans*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* (21). Además, mencionan que el quitosano de bajo peso molecular evita la adsorción de *Streptococcus mutans* a la hidroxiapatita. La sal de amonio de quitosano se ha investigado ampliamente contra *Stafilococcus aureus* y *Escherichia coli*. El quitosano es altamente efectivo contra una variedad de hongos y bacterias debido a que la

mayoría de los productos y derivados a base de quitosano, como micro/nanopartículas, geles y las películas indican efectos antibacterianos (22).

Adicionalmente, los grupos amino protonados de la D-glucosamina en la estructura del quitosano le permiten adherirse a la capa de moco cargada negativamente por interacción electrostática y penetrar en las capas profundas del epitelio. El mecanismo antibacteriano del quitosano puede incluir la interacción de quitosano catiónico con la superficie celular aniónica, lo que aumenta la permeabilidad y la fuga de la membrana de material celular (18).

El quitosano también puede interferir con la síntesis de ARNm, incluyendo síntesis de proteínas, así como también con la adhesión del *S. mutans* y formación de biopelículas primarias, hasta una semana con poca o ninguna disminución en la eficiencia. Su actividad antibacteriana contra *S. mutans* y otros microorganismos presentes en la cavidad oral lo convierte en un agente anti biofilm potencialmente prometedor (23,24). El mecanismo exacto de la actividad antibacteriana aún no se conoce por completo. La actividad antibacteriana propuesta más prevalente del quitosano es la unión a la pared celular bacteriana cargada negativamente que causa la interrupción de la célula, alterando así la permeabilidad de la membrana, seguida de la unión al ADN que provoca la inhibición de la replicación del ADN y, posteriormente, la muerte celular (25). Otro posible mecanismo es que el quitosano actúa como un agente quelante que se une selectivamente a oligoelementos metálicos provocando la producción de toxinas e inhibiendo el crecimiento microbiano (25,26). El quitosano también mejora el proceso de curación al aumentar la infiltración de células inflamatorias en el área lesionada y al estimular los macrófagos y fibroblastos (23).

El quitosano puede presentarse en varias formulaciones, con la finalidad de administrarse como un sistema transportador de fármacos, con ciertas propiedades mecánicas y con un íntimo contacto en la mucosa oral. Según el campo de uso el quitosano se modifica mediante diferentes procesos químicos o enzimáticos a diversos derivados y formas, tales como geles, hidrogeles, membranas, micro y nanopartículas, etc. (26,27).

GLUCONATO DE CLORHEXIDINA.

La clorhexidina es una sustancia activa utilizada para el control de la placa y la gingivitis, así como agente anticaries. Se presenta en forma de clorfenilbiguanida, comúnmente como sal de acetato o sal de gluconato, y se encuentra en colutorios, geles, dentífricos y barnices (28).

Sin embargo, su uso en dentífricos no es apropiado, ya que la mayoría de ellos contienen detergentes aniónicos, como el lauril sulfato de sodio. Estos detergentes son incompatibles con la clorhexidina y reducen significativamente su eficacia antiplaca. La clorhexidina se une a grupos aniónicos en la superficie de las bacterias, lo que provoca una permeabilidad en la membrana celular y la liberación del contenido citoplasmático. Además, en concentraciones más altas, la clorhexidina precipita las proteínas citoplasmáticas (22).

Yadiki y cols., mencionan que el gluconato de CHX es un agente antimicrobiano utilizado como inhibidor y letal para las vegetativas Gram + y Gram -. La sensibilidad y el amplio espectro de la actividad bacteriana son características principales de la CHX. Ésta crea un ambiente bacteriostático mediante la unión a las superficies orales para su posterior liberación (28). Abouassi y cols., analizaron que el compuesto de CHX se ve afectado por las sustancias orgánicas; hay que tener en cuenta que su aplicación al 0,2% presenta excelentes resultados al reducir la formación de placa y compuestos antibacterianos en la cavidad oral. Se ha comprobado que la Clorhexidina carece de toxicidad sistémica en su uso oral y no genera resistencia microbiana. Sin embargo, su uso produce efectos secundarios locales, reversibles, tales como manchas pardas en los dientes, la lengua y en restauraciones con resinas, así como alteraciones pasajeras de la percepción gustativa, por lo cual se recomienda no ingerir alimentos ricos en cromógenos (café, té, entre otros) para evitar las pigmentaciones (29).

MEMBRANAS

El término "membrana" es ampliamente utilizado en varias disciplinas, como la biología, la química, entre otras. Se refiere a un sistema sólido o líquido con un espesor muy reducido en comparación con su superficie, el cual separa dos fases

macroscópicas (líquidos, gases o sólidos) y controla la transferencia selectiva de materia y energía entre ellas (25,30).

Algunas de las propiedades de la membrana que más influyen en el proceso de permeación y/o transporte son: el espesor, la solubilidad de las especies permeantes en la membrana, la carga eléctrica en las superficies de la membrana y su signo y densidad, el diámetro de los poros y la carga y movilidad de los iones transportadores a través de los poros. Las membranas son sometidas sobre cierta influencia o fuerza, donde se pueden considerar como barreras que permiten el transporte preferencial de uno o más componentes, ya sean moléculas, partículas o iones y tienen la capacidad de regular la cantidad de especies que puede atravesarlas desde una mezcla de sustancias o por si solas. Puede variar el grado de paso de las especies por diversos factores, tales como: presión osmótica, concentración, diferencia de potencial químico, temperatura, permeabilidad, afinidad hacia las especies y la porosidad de la membrana (25).

Las membranas pueden ser de diferentes tipos de materiales, orgánicos o inorgánicos y, difieren entre ellas por su composición química y física. Las membranas pueden ser homogéneas molecularmente, es decir totalmente uniforme, o ser químicas, pero físicamente heterogéneas. Pueden ser huecas o porosas en su estructura o también ser completamente densas. Sus ventajas son: baja energía de consumo, propiedades ajustables, operación simple, bajos requerimientos de mantenimiento, fácil combinación de otros procesos de separación y facilidades de escalamiento (30,31).

6. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

QUITOSANO

Tal y como informan Bae y cols., en 2006 el quitosano tiene un efecto antibacteriano *in vitro* sobre *S. mutans*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *porphyromonas gingivalis*. Se informó que el quitosano de bajo peso molecular previene la adsorción de *S. mutans* a la hidroxiapatita (20). La mayoría de las características físicas, químicas y biológicas del quitosano, como el grado de peso molecular, viscosidad, solubilidad y biodegradabilidad depende del grado de desacetilación, y este debe ser proporcional a las propiedades deseadas del

quitosano. Las características destacadas son, el grado de desacetilación en la bioactividad celular, la proliferación y la adhesión. La producción de andamios con mayor adhesión y proliferación requieren un mayor grado de desacetilación, ya que es beneficiario también para la cicatrización de heridas, estas características permiten incorporarlo en la fabricación de armazones para la regeneración ósea, periodontal y dentino-pulpar (32).

Costa y cols., en 2014 evaluaron el efecto en la adherencia y las biopelículas de enjuagues bucales con quitosano sobre varios patógenos orales. Su estudio consistió en comparar formulaciones de quitosano con diferentes enjuagues comerciales que contenían como principio activo aceites esenciales o clorhexidina, utilizaron cinco microorganismos orales (4 bacterias y 1 levadura) como microorganismos modelo y midieron la concentración mínima inhibitoria, la adherencia, la formación de biopelículas y el efecto de los enjuagues sobre biopelículas maduras. Los resultados mostraron que el enjuague bucal a base de quitosano (0.4%) fue capaz de inhibir la adhesión microbiana y la formación de biopelículas al mismo tiempo que fue capaz de promover la disolución de biopelículas ya formadas. Los autores concluyeron que el quitosano posee actividad biológica igual o mejor que los productos comerciales disponibles en la actualidad (33).

Pasquantonio G y cols., en 2008 evaluaron la actividad del quitosano en biopelículas de *S. mutans in vitro* e *in vivo*. La actividad antibacteriana del quitosano se determinó mediante microdiluciones en caldo. Se evaluó el efecto del quitosano a diferentes concentraciones y tiempos de exposición en biopelículas de *S. mutans*. Los resultados mostraron que *S. mutans* en la fase de adhesión fue completamente inhibida por quitosano a cualquier concentración o tiempo de exposición investigado, mientras que *S. mutans* en etapas sucesivas de acumulación (12-24h) se inhibió solo con concentraciones más altas y tiempos de exposición más largos. Estos datos confirman la acción efectiva del quitosano contra las biopelículas de *S. mutans*. (21).

ENAMINONAS.

Mahmud y cols., en 2010 presentaron la síntesis, caracterización y actividad antibacteriana de tres arilenaminonas y sus complejos con zinc y hierro. Las

actividades antibacterianas de los ligandos sintetizados y sus complejos metálicos se probaron contra cepas de bacterias, *S. aureus* y *E. coli*, utilizaron el método de difusión por disco. El complejo Zn (HL1) tiene la mayor actividad contra el *S. aureus* y *E. coli*, demostraron que tiene un buen potencial como bactericida. La arilenaminona sintetizada por acetil acetona y dietilamina se utilizó como agente localizador de cationes universal y así mostraron colores característicos con diferentes metales. Debido a los avances sintéticos de compuestos farmacológicamente activos, los bloques de construcción arilenaminonas, presentan una fuente importante de compuestos potencialmente activos, donde su principal ventaja es la estabilidad en condiciones de pH fisiológico y baja toxicidad (7).

Con base en la información anterior, es posible desarrollar nuevas formulaciones a base de quitosano con compuestos potencialmente antimicrobianos como las arilenaminonas, de lo cual no existen reportes que muestren la actividad antibacteriana de Quitosano/arilenaminonas contra *S. mutans*, con potencial actividad en el área odontológica. Por lo que, en el presente trabajo, se llevó a cabo la novedosa síntesis y formulación de membranas mucoadhesivas de Quitosano/arilenaminonas a diferentes concentraciones y su evaluación antibacteriana.

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La caries dental es una enfermedad multifactorial causada por la presencia de biofilm y agentes bacterianos como el *S. mutans*; principal microorganismo involucrado en la etiología, cuyo metabolismo depende de los azúcares de la dieta. Un método de control es el uso de agentes antimicrobianos que limitan el crecimiento de microorganismos cariogénicos tales como *S. mutans* en la cavidad oral. En la práctica odontológica, los enjuagues bucales con agentes antibacterianos como la clorhexidina han demostrado su eficacia, sin embargo, se ha informado que el uso excesivo de estos productos químicos cambia el microbioma oral e intestinal al causar efectos secundarios como la resistencia bacteriana.

El quitosano tiene una nueva popularidad en este sentido, ya que no se informa que las bacterias desarrollen resistencia al quitosano. Es aclamado por su

naturaleza no tóxica, biodegradabilidad, policatiónica, actividad antimicrobiana, actividad antitumoral, actividad antioxidante, efecto antiolesterolemico, hemostático y analgésico, que al ser combinado con arilenaminonas se espera una mayor actividad en comparación con el uso de quitosano original. De igual manera, las arilenaminonas son importantes intermedios orgánicos heterocíclicos y biológicamente activos, debido a su estabilidad estructural y su capacidad como fármacos. Debido al gran potencial de actividad antibacteriana y al considerar la propiedad de sistema transportador de fármacos del quitosano, se propone desarrollar una nueva formulación de membranas mucoadhesivas de Quitosano/arilenaminona, para combatir al *S. mutans* dentro de la cavidad oral, por esta razón, la búsqueda de nuevos compuestos con potencial actividad antibacteriana es un tema de interés. De lo anteriormente mencionado, surge la siguiente pregunta de investigación:

8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las membranas mucoadhesivas a base de quitosano/arilenaminona presentan actividad antibacteriana contra *S. mutans*?

9. JUSTIFICACIÓN

La caries dental es una enfermedad dinámica, no transmisible, multifactorial, mediada por biopelículas, modulada por la dieta, que produce una pérdida de minerales de los tejidos duros dentales. Esta determinada por factores biológicos, conductuales, psicosociales y ambientales. La caries es principalmente causada por un cambio ecológico en la composición y actividad de la biopelícula bacteriana cuando se expone con el tiempo a los carbohidratos fermentables, lo que provoca una ruptura en el equilibrio entre la desmineralización y remineralización. Hoy en día, el agente antimicrobiano más probado y eficaz que se conoce es la clorhexidina, la cual se ha utilizado por más de tres décadas, pero su uso se limita a corto plazo debido a sus efectos secundarios. Actualmente, la importancia del estomatólogo en el tratamiento de la caries dental debe enfocarse en la búsqueda de nuevas alternativas para el control de enfermedades, sobre esta base la utilización de compuestos sintéticos para controlar el crecimiento de *S. mutans* ha incrementado el interés para su estudio.

Por lo anteriormente citado, se busca la síntesis de membranas mucoadhesivas de quitosano con arilenaminona que ofrezcan una capacidad antibacteriana, mediante la inhibición de la principal bacteria cariogénica *S. mutans*, que pueda potencializar las acciones preventivas, disminución de la incidencia de caries dental.

La relevancia del trabajo estriba en la búsqueda de alternativas con compuestos de potencial actividad antibacteriana, con efecto inhibitorio en bacterias cariogénicas, contribuyendo al control de la caries dental.

10. HIPÓTESIS

H₁: Las membranas mucoadhesivas de Quitosano/arilenaminona presentan actividad antibacteriana contra *S. mutans*.

H₀: Las membranas mucoadhesivas de Quitosano/arilenaminona no presenta actividad antibacteriana antimicrobiana contra *S. mutans*.

11. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de las membranas mucoadhesivas de Quitosano/ arilenaminona a diferentes concentraciones sobre *S. mutans*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Sintetizar la arilenaminona y su caracterización por TLC y FTIR.
- Sintetizar membranas de Quitosano/ arilenaminona a diferentes concentraciones de 1, 3, 5, 7 % p/v.
- Realizar la caracterización de las membranas de quitosano/ arilenaminona mediante FTIR, Microscopía óptica, MEB, EDS.
- Evaluar la actividad antibacteriana de membranas de quitosano/arilenaminona a diferentes concentraciones utilizando el método de sensidiscos.
- Evaluar la capacidad de hinchamiento, de absorción de agua, pH de superficie desintegración, absorción de humedad y mucoadhesividad de las membranas de quitosano/ arilenaminona.
- Analizar grosor de las membranas de quitosano/ arilenaminona.

12. MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO.

Tipo de Investigación: básica.

Tipo de investigación en latín: *in vitro*.

De acuerdo con la intervención del investigador: experimental.

De acuerdo con la medición en el tiempo: prospectivo.

De acuerdo con el número de mediciones: transversal.

De acuerdo con el número de variables: analítico.

De acuerdo con la dirección del análisis: estudio experimental.

POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA.

Población: Discos de membrana de Quitosano/arilenaminona.

Muestreo aleatorio simple de 20 muestras por cada concentración dando un total de 80 muestras de los cuatro grupos experimentales, y dos grupos control positivo y un grupo control (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de la muestra en los diferentes grupos de estudio.

Grupos (n=120)	Técnica de sensidiscos
G1= Membrana de Quitosano/Arilenaminona (n=20) 1%	Halo de inhibición en mm donde exista la inhibición de crecimiento de las bacterias alrededor del sensidisco impregnado con membrana de Quitosano/Arilenaminona 1%.
G2= Membrana de Quitosano/Arilenaminona (n=20) 3%	Halo de inhibición en mm donde exista la inhibición de crecimiento de las bacterias alrededor del sensidisco impregnado con membrana de Quitosano/Arilenaminona 3%.
G3= Membrana de Quitosano/Arilenaminona 5% (n=20)	Halo de inhibición en mm donde exista la inhibición de crecimiento de las bacterias alrededor del sensidisco impregnado con membrana de Quitosano/Arilenaminona 5%.
G4= Membrana de Quitosano/Arilenaminona 7% (n=20)	Halo de inhibición en mm donde exista la inhibición de crecimiento de las bacterias alrededor del sensidisco impregnado con membrana de Quitosano/Arilenaminona 7%.
G5= Control positivo membrana de gluconato de clorhexidina (CHX) (n=20)	Halo de inhibición en mm donde exista la inhibición de crecimiento de las bacterias alrededor del sensidisco impregnado con clorhexidina.
G6= Control negativo membrana a base de quitosano (n=20)	Halo de inhibición en mm donde exista la inhibición de crecimiento de las bacterias alrededor del sensidisco impregnado con quitosano.

CRITERIOS DE SELECCIÓN.

8.3.1 Criterios de inclusión: Discos de membrana de quitosano/arilenaminona.

8.3.2 Criterios de exclusión: Discos de membrana que se contaminen, se sequen, que no tengan la concentración adecuada.

8.3.3 Criterios de eliminación: Discos de membrana que se muevan de su lugar, que se contaminen a la hora de colocarlos y durante la incubación.

VARIABLES.

Tabla 3. Variables de estudio.

Variable Dependiente	Definición conceptual	Definición operacional	Escala	Categorías
Microscopía óptica	Observación de estructuras biológicas, órganos y organismos microscópicos.	Ampliación y visualización de la muestra	Cualitativa	No aplica
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	Resolución de superficie por medio de electrones	Diámetro fibrilar	Cualitativa	No aplica
Espectrometría de dispersión de Energía de rayos X (EDS)	Análisis de composición química elemental	% Atómico	Cualitativa	Nominal
Mucoadhesividad	Fuerza necesaria para retirar una membrana adherida a una superficie	Aplicación de fuerza de 2N por 100s y posteriormente se inicia la prueba al levantar la parte móvil de membrana en contacto con una parte estacionaria	Cuantitativa	Continua
Hinchamiento	Masa ganada de agua con respecto a la masa de una membrana	El índice de hinchamiento que representa la masa ganada de agua por 5 min con respecto a la masa de una membrana completamente seca $H_i = (m_2 - m_1) / m_1$	Cualitativa	No aplica
Absorción de agua	Porcentaje de agua absorbido por membranas	Pesar las membranas desecadas toda la noche en sulfato de sodio anhidro hasta determinar la masa ganada de agua en 5 min	Cuantitativa	Continua

		$A.G. = (m_2 \text{ final} - m_1) / m_1 \times 100\%$		
Desintegración	Tiempo de disolución de membrana en medio acuoso	Sumergir las membranas en cajas Petri con 10 ml de saliva artificial a pH 7.54 y se agitar a 60 rpm durante 3-6-9-12 h a una temperatura entre 35-36°C	Cualitativa	No aplica
Absorción de humedad	Porcentaje de humedad absorbido por membranas	Calcular hinchamiento en cámara de humedad por 12 días y multiplicar x 100 para obtener el porcentaje.	Cuantitativa	Continua
pH de superficie	Potencial de iones de hidrógeno H ⁺ en superficie de membranas	Colocar en un vaso con 5 ml de saliva artificial la membrana, se deja por 5 min y se retira del vaso de precipitado. Se determina el pH de la solución con potenciómetro	Cuantitativa	Continua
Grosor	Dimensión más pequeña de una membrana en tres dimensiones	Colocar cada membrana de un extremo hasta que el micrómetro indique y se obtiene la medida en digital	Cuantitativa	Continua
Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	Identifican componentes moleculares y estructuras	Identificación de bandas y enlaces	Cuantitativa	Continua
Análisis de cromatografía en capa fina	Distancia recorrida por una componente dividida por la distancia	Medición del avance de productos en cromatografía de capa fina (Rf)	Cuantitativa	Continua

	total recorrida por el disolvente			
Actividad antibacteriana	Capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento (la presencia) de una población bacteriana.	Medir en mm el halo de inhibición de la membrana donde exista coloración de bacterias viables.	Cuantitativa	Continua
Variable Independiente	Definición conceptual	Definición operacional	Escala	Categorías
Membrana a base de quitosano/arilenaminona (G1, G2, G3, G4)	Forma farmacéutica a diferentes concentraciones p/p (Quitosa/arilenaminona) de consistencia semisólida de liberación prolongada de fármacos.	Medir la cantidad de mg de Quitosa/arilenaminona y cantidad de quitosano p/p para preparar la membrana a diferentes concentraciones.	Cuantitativa	Dimensional
Clorhexidina (G5)	Agente desinfectante bacteriostático y bactericida dependiendo de la concentración.		Cuantitativa	Dimensional
Membrana a base de quitosano (G6)	Forma farmacéutica de consistencia semirrígida de liberación prolongada de fármacos.	Medir la cantidad de mg quitosano de alto peso molecular (Sigma-Aldrich) y mezclar en 37.6 mL agua tridestilada y 1.2 mL de ácido acético a 60°C.	Cuantitativa	Dimensional

CONCORDANCIA Y FIABILIDAD.

Para la síntesis de la molécula de arilenaminona el investigador se capacitó previamente. Para la síntesis de membranas de quitosano/arilenaminona y

cuantificación de bacterias cultivables el evaluador se capacitó y se realizó una estandarización intra-observador e inter-observador para evitar sesgos de información. Además, las técnicas se realizaron por el mismo investigador con la finalidad de evitar variaciones inter-operador.

UBICACIÓN ESPACIO - TEMPORAL.

Unidad de laboratorio multidisciplinario de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (FEBUAP).

Unidad de laboratorio de Fisiología de la FEBUAP.

Dirección de Innovación y Transferencia del Conocimiento (DITCo).

Laboratorio de biomateriales de la FEBUAP.

Departamento de Bioingeniería y Ciencias del Tecnológico de Monterrey.

PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.

Los reactivos utilizados en la investigación fueron adquiridos con recursos del laboratorio de fisiología y en su requerimiento bajo los recursos del tesista con Clave de beca Conacyt 2021-000001-01NACF-01416, se realizaron múltiples compras de los reactivos y solventes como Ácido acético Glacial 99.8% (J.T Baker, CDMX, México) Quitosano 85% desacetilado (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Burlington, MA, USA), Cloruro de sodio (J.T Baker, CDMX, México) Glicerol 99.5 + (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Burlington, MA, USA), Agua destilada, Agua tridestilada(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Burlington, MA, USA), Infusión Cerebro Corazón ICC (BD Bioxon, CMDX, México) , Carboximetilcelulosa CMC (HCO, Guadalajara, Jal. México), Poli D-glucosamino (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Burlington, MA, USA) Acetonitrilo 99.8% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Burlington, MA, USA) Saliva artificial (Viarden Lab, LH, texas, USA). (Tabla 4). Así como insumos como cajas Petri de diferentes volúmenes (40ml y 20 ml). Los materiales y equipos usados para todo el procedimiento están resumidos en la tabla 4 y tabla 5.

Tabla 4. Reactivos y solventes utilizados en laboratorio, pureza y marca.

Reactivos y solventes	Pureza	Marca
Ácido acético glacial	99.8%	J.T. Baker
Quitosano	85% desacetilado	Sigma - Aldrich
Cloruro de sodio	-	J.T. Baker
Glicerol	99.5+	Acros
Agua destilada	-	Sigma- Aldrich
Agua tridestilada	-	Sigma- Aldrich
Poli(D-glucosamino)		Sigma - Aldrich
Acetonitrilo	99.8%	Sigma - Aldrich
Saliva artificial	-	Viarden Lab
Infusión Cerebro Corazón	-	MCD LAB
Carboximetilcelulosa	-	HCO

EQUIPOS E INSTRUMENTOS.

Tabla 5. Equipos e instrumentos para esta investigación.

Equipos o instrumentos	Marca	Especificaciones
Balanza analítica	OHAUS-Modelo- Adventurer Pro AV265C.	Capacidad (g): 260, Sensibilidad (mg): 0.1, Repetibilidad (Desv-Std)(mg): 0.1, linealidad (mg): ± 0.3 , unidades de medición: mg, g, kg, ct, N, lb, oz t, GN, dwt, mommes, carat, mesghal, taels, modos de pesaje: básico, conteo de piezas, porcentaje, chequeo de peso, totalización, resultado sostenido.
Plancha	Cole-Parmer Modelo: StableTemp.	Longitud: 7(plg), ancho placa sup: 7(plg), material: cerámico, temperatura mínima: 30°C, temperatura máxima: 540°C, baja velocidad (rpm): 30, alta velocidad (rpm):1200.
Barra de agitación	BBTT.ful Tipo C. Walfront Tipo C.	Tamaño 50 mm largo. Tamaño 15 mm largo.
Potenciómetro	ROCA-Modelo: PHS-3CU.	Rango de pH: -2 a 19.99, resolución de 0.01. Rango de mV: 0 a 1999, resolución de ± 1 mV. Rango de temperatura: 0 a 80°C, resolución de 0.1°C.
Microscopio óptico	Leica, DMSL	-
Microscopio electrónico de barrido	JEOL, JSM-6610 LV, Japón	-

13. METODOLOGÍA

SÍNTESIS DE LA ARILENAMINONA

El compuesto Ácido 2-(2,6-diclorofenilamino)-fenilacético fue sometido bajo condiciones térmicas en un tubo de alta presión con el reactivo de Dimetilacetal de la dimetilformamida (DMAMF) en ausencia de disolvente por 12-24 horas.

PURIFICACIÓN

Columna cromatográfica de la enaminona. La enaminona se purificó por cromatografía en columna con una fase sólida de sílice gel 200-400 mallas en una proporción 10g/1g del crudo de reacción soportado en sílice, se eluyó con una fase móvil de Ciclohexano/Acetato de etilo.

CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS

ESPECTROSCOPIA DE TRANSMISIÓN DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Los espectros de FT-IR de los compuestos sintetizados y las membranas formuladas se obtuvieron por la técnica de ATR por medio del uso del espectrofotómetro FTIR-ATR Perkin-Elmer (spectrum 2000) en el rango de 400 – 4000 cm^{-1} para poder observar los grupos funcionales y enlaces químicos presentes ya que cada uno representó absorciones características a diferentes longitudes de onda. Para el Infrarrojo Transformado de Fourier los espectros de las muestras materiales se obtuvieron con 32 barridos en el intervalo entre 400 a 4000 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} , los espectros se obtuvieron utilizando el ATR (atenuado reflectancia total) (Bruker, modelo Vertex 70).

ANÁLISIS DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TCL)

E. Merck silica gel 60 F254-coated 0.25 plates fueron visualizados a través de lámparas de longitud de onda corta de UV. Las columnas cromatográficas (CC) se realizaron con sílice gel (SiO_2 ; 230-400 mesh); (SIGMA-ALDRICH, Co. St Louis, USA)

SÍNTESIS DE MEMBRANAS

La membrana de quitosano a diferentes concentraciones de arilenaminona se obtuvo por un método evaporación lenta de solvente. Primero se preparó una solución acuosa con la cantidad correspondiente de quitosano y como agente catalítico polimerizante 0.8 ml de ácido acético. Esta mezcla se agitó a 700 rpm a temperatura 60°C durante 5 minutos hasta formar el hidrogel para posteriormente vertir en placas Petri de plástico. En la tabla 6 se observan las diferentes concentraciones y cantidades correspondientes de arilenaminona y quitosano según su porcentaje.

Tabla 6. Formulación de membranas de quitosano arilenaminona con glicerol a diferentes concentraciones.

Concentración	Arilenaminona	Quitosano
1%	3.5 mg	346.5 mg
3%	10.5 mg	339.5 mg
5%	17.5 mg	332.5 mg
7%	24.5 mg	325.5 mg
10%	35 mg	315 mg

MICROSCOPIA ÓPTICA

Para el análisis mediante microscopía óptica, las muestras de membranas de quitosano con arilenaminona se prepararon en láminas delgadas y se colocaron sobre portaobjetos de vidrio. Se analizaron utilizando un microscopio óptico (Leica, DMSL) en diferentes aumentos, incluyendo 4x, 10x, 20x y 40x, con el fin de analizar su estructura y características de la membrana.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Para el análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB), las muestras se recubrieron con una fina capa de oro mediante un método de pulverización catódica (Denton Vacuum V), con el fin de observar las muestras mediante un microscopio electrónico de barrido (JEOL, JSM-6610 LV, Japón).

ESPECTROMETRÍA DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA DE RAYOS X (EDS)

Los rayos X de dispersión de energía (Oxford, INCA) también se realizaron por triplicado eligiendo sitios aleatoriamente en cada gel, los picos de elementos conocidos como el oro se enmascararon.

PRUEBA DE MUCOADHESIVIDAD

La prueba de mucoadhesividad en órgano dentario se realizó en la máquina Instron de una prueba modificada de Korel y col., en 2023 (40). En una superficie de 4 x 4 mm de esmalte de incisivo se colocaron 50 microlitros de saliva artificial. Se colocó un extremo de la membrana de 4 mm x 30 mm, parte estacionaria. El extremo de la porción móvil se colocó a 90° como la figura 4. A la parte estacionaria o de contacto se le aplicó una fuerza de 2N por 100s. Posteriormente, se inició la prueba levantando la parte móvil a una velocidad de 0.01 mm/s. Los picos de fuerzas (F_{max}) de desunión fueron registrados. Estas mediciones se realizaron con una $n=5$. La prueba de adhesividad dentaria se realizó para las membranas de quitosano/glicerol y quitosano/glicerol/clorhexidina con el mismo número de replicado.

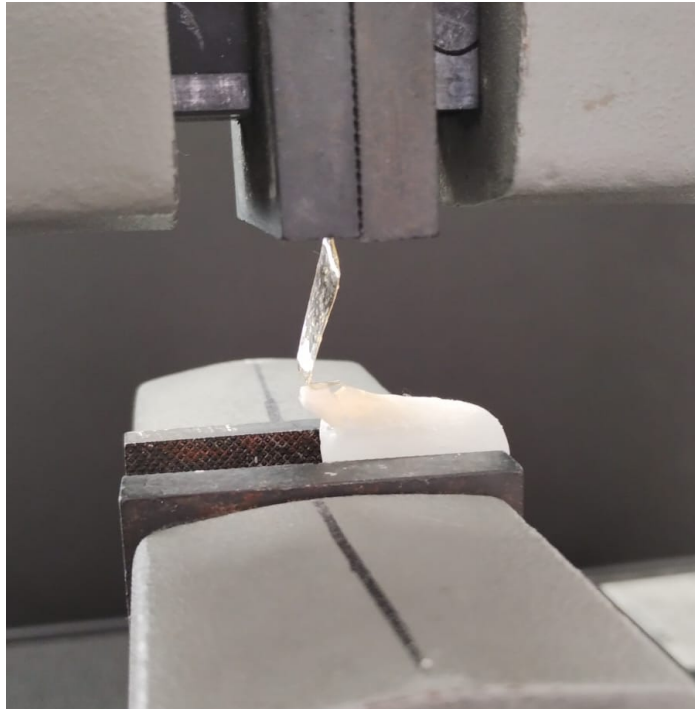


Figura 4. Prueba mucoadhesión en máquina universal.

CAPACIDAD DE HINCHAMIENTO

Las membranas de quitosano fueron cortadas en pequeñas piezas de 1.6 x 1.6 cm, desecadas toda la noche en sulfato de sodio anhidro hasta determinar su masa seca (m_1). Las membranas pesadas fueron colocadas en una caja Petri, inmersas en 5 ml de saliva artificial (pH = 7.54) por 5 min a temperatura entre 35-36°C para imitar las condiciones térmicas de la saliva en la cavidad oral. La masa (m_2) se registró después de limpiar suavemente la membrana con un trozo de papel seco para eliminar el agua superficial. El índice de hinchamiento que representa la masa ganada con respecto a la masa de una membrana completamente seca se determinó con la siguiente ecuación:

$$Hi = (m_2 - m_1) / m_1$$

El experimento de hinchamiento se realizó por triplicado para cada grupo de membrana: Q; CHQ; QA5%; QA7%

COMPORTAMIENTO DE ABSORCIÓN DE AGUA

Las membranas de quitosano fueron cortadas en pequeñas piezas de 1.6 x 1.6 cm, desecadas toda la noche en sulfato de sodio anhidro hasta determinar su masa seca (m_1). Las membranas pesadas fueron colocadas en una caja Petri,

inmersas en 5 ml de saliva artificial (pH = 7.54) por 5 min a temperatura entre 35-36°C para imitar las condiciones térmicas de la saliva en la cavidad oral. Las membranas de quitosano se pesan después limpiar suavemente la membrana con un trozo de papel para eliminar el agua superficial. La operación se repite periódicamente hasta que la medición del peso de las membranas húmedas no varió 0.001 g en la cinética de hinchamiento. Por último, la masa final (m_2) (W.G.) se registró después de limpiar gentilmente la membrana con la superficie de un papel seco. La cantidad de agua ganada se determinó con la siguiente ecuación:

$$A.G. = (m_2 \text{ final} - m_1) / m_1 \times 100\%$$

El experimento se realizó por triplicado para cada grupo de membrana: Q; CHQ; RQ5%; RQ7%; RQ10%; EQ20%.

DESINTEGRACIÓN

La prueba de desintegración se realizó utilizando un método de caja Petri. Se sumergieron las membranas en cajas Petri con 10 ml de saliva artificial a pH 7.54 y se agitaron a 60 rpm durante 3-6-9-12 h a una temperatura entre 35-36°C para imitar los movimientos y condiciones térmicas en la cavidad oral. Durante el experimento se observó el tiempo de desintegración de las membranas.

ABSORCIÓN DE HUMEDAD

La absorción de humedad de las membranas de quitosano se realizó exponiéndolas a 75% de humedad relativa en un desecador con una solución de saliva artificial a temperatura ambiente. Las membranas fueron pesadas previamente (m_1) y almacenadas en la humedad del desecador por 10 días. Posteriormente, se pesaron a (m_2). La capacidad de absorción de humedad fue calculada de la misma manera que la capacidad de hinchamiento y multiplicada por 100 para obtener el porcentaje. El experimento se realizó por triplicado para cada grupo de membrana: Q; CHQ; QA5%; QA7%

PH DE SUPERFICIE

La membrana de una formulación se colocó en un vaso con 5 ml de saliva artificial como modificación al método reportado por Korel et al. (44) La membrana se hincho por 5 min y se retiró del vaso de precipitado. El pH resultante de la saliva artificial se registró utilizando un potenciómetro (ROCA- Modelo PHS-3CU) a temperatura de 35°C y este se tomó como un indicado de pH de la superficie de la formulación.

PRUEBA DE GROSOR

Las membranas se colocaron en un micrómetro electrónico (SHAHE-Modelo T152002FR); éstas se colocaron cada una de un extremo de la membrana hasta que el micrómetro indicó y se obtuvo la medida en digital, la medida de espesor comenzaba desde 0.001mm. El rango de medición del aparato fue de 0-25mm. Se realizó la prueba con una n=5 de cada una de las formulaciones.

PRUEBA ANTIBACTERIANA

Se llevó a cabo la selección de colonias al cultivarse la cepa de SM CDBB-B-1455 en agar, se preparó la suspensión del inóculo y se estandarizó la suspensión del inóculo. Se inoculo la placa y se colocaron los discos de antimicrobiano para incubar la placa con ICC y posteriormente medir zonas de inhibición, posteriormente se interpretan los resultados de la inhibición de dichas membranas.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *S. mutans*

Se esterilizó cada cara de la membrana por 20 minutos a luz UV, de este modo se creció el microorganismo *S. mutans* en 10 ml de medio líquido de Infusión Cerebro Corazón, se dejó crecer a cámara de CO₂ a 37°C x 24 horas. Se plaquearon 100 microlitros de cultivo en placas Petri con medio Infusión Cerebro Corazón Sólido. En el centro de la placa se colocó la membrana con ayuda de pinzas estériles. Se incubaron las placas en CO₂ a 37° x 24 horas. Para control positivo se utilizaron membranas con clorhexidina; como control negativo se utilizó Quitosano/Glicerol.

En el control de esterilidad se colocó cada membrana para corroborar que no creciera nada en ICC.

14. RESULTADOS

SÍNTESIS DE LA ARILENAMINONA.

El éster 2-(2,6-diclorofenilamino)-fenilacetato (3) de metilo se obtuvo en rendimientos bajos en las condiciones térmicas y de presión descritas (Figura 5), como un polvo fino café oscuro después de enfriar y separar por precipitación. La arilenaminona 3 se purificó por columna cromatográfica de sílice gel 200-400 mallas, con Ciclohexano/Acetato de etilo 6:4 para obtener un sólido café claro con un rendimiento de 30%, $R_f = 0.18$ en ciclohexano/acetato de etilo 1:1. El compuesto se cristalizó en Acetato de etilo.

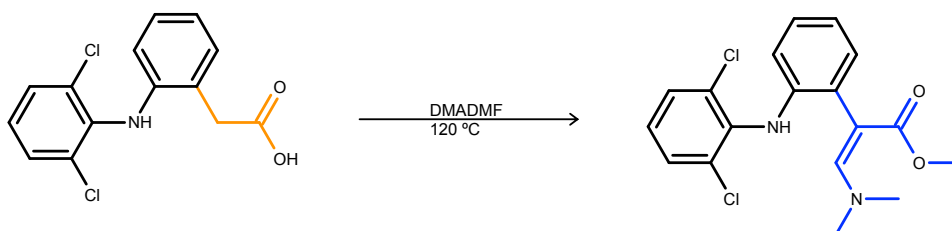


Figura 5. Propuesta sintética tandem para la obtención del derivado arilenaminona (3).

Las condiciones de reacción generadas por el reactivo DMADMF proporcionaron *in situ* un nucleófilo de MeO⁻ (metoxilo) que esterificaron al grupo funcional ácido carboxílico en las condiciones básicas y térmicas. El compuesto 2 no se aisló. Posteriormente en el seno de reacción, el exceso del reactivo DMADMF (3.5 eq) extrajo un protón alfa al grupo carbonilo, especie nucleofílica que atacó a la especie electrofílica de DMADF para obtener el sistema *push-pull* en la arilenaminona 3 (Figura 6).

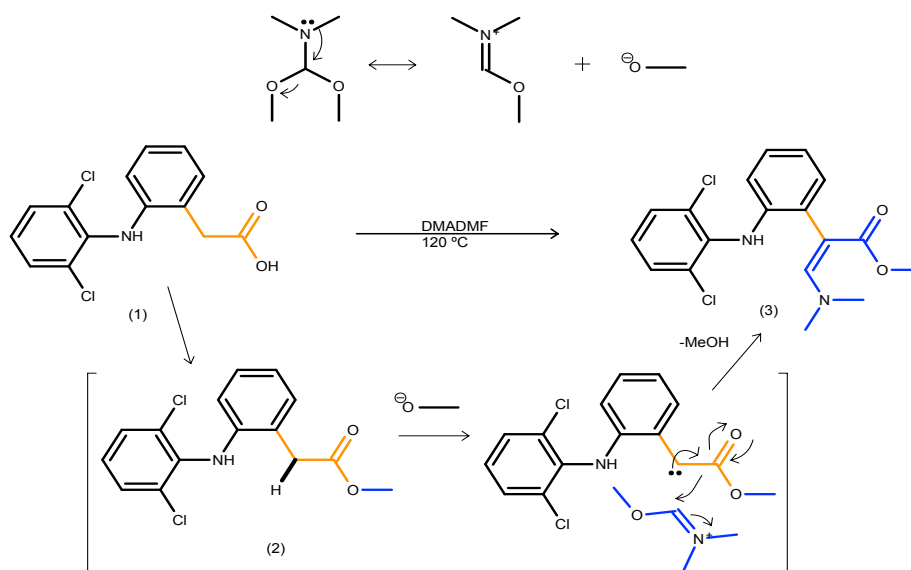


Figura 6. Propuesta mecanística para la obtención del sistema push-pull de arilenaminona 3.

DESCRIPCIÓN DE FTIR

En la tabla 7 de desplazamientos se observa la desaparición de la banda correspondiente al OH (3321.64 cm^{-1}) del compuesto 1 y la aparición de una banda en 1593.29 cm^{-1} en el espectro del compuesto 3, correspondiente al enlace N-Me. En dicho enlace N-Me se observa la presencia de banda extra (1561.20 cm^{-1}).

Tabla 7. Desplazamientos de FTIR-ATR de compuestos 1 y 3.

BANDA	CM ⁻¹	FTIR-ATR de 1	FTIR-ATR de 3
C-Cl	700-900	860.99, 838.33, 766.13, 741.43	949.21, 808.86, 750.13, 633.34
C-N	1020-1220	1157.83, 1094.14	1219.96, 1197.55, 1154.28, 1088.50, 1048.36
NH, N-ME	3500-3560 1560-1640 800	1577.62, 838.33	1593.14; 1561.20 808.86
-OH	3600-3200 1640-1700	3321.64	---
C=O	1600-1800	1729.05, 1690.70	1718.15, 1688.08

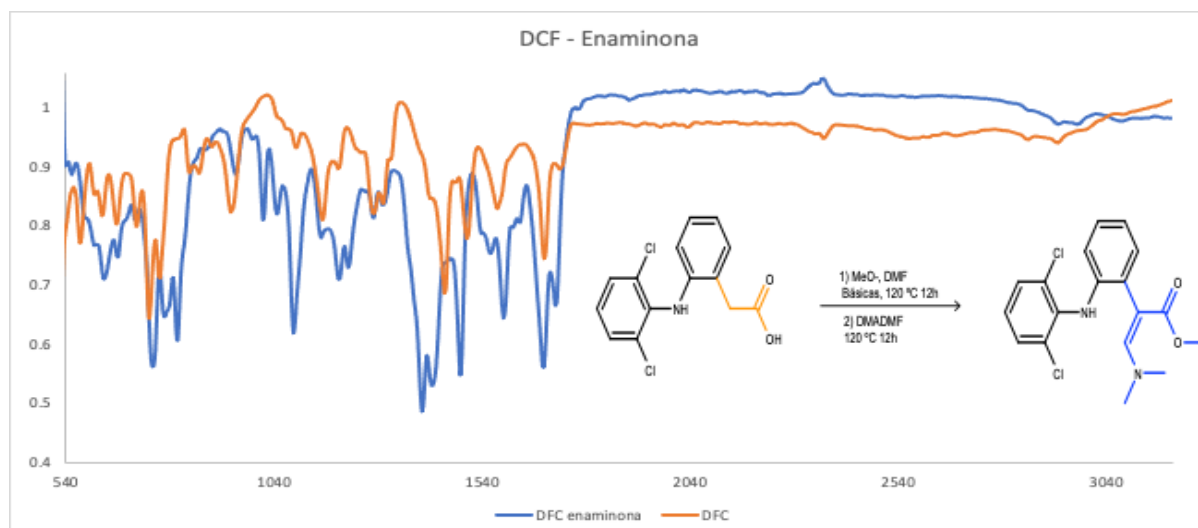


Figura 7. Espectros de FTIR ATR de 1 y 3.

En la figura 7 se observan los espectros de FTIR-ATR de Compuesto 1 (cm^{-1}): 3321.64, 3081.97, 2922.81, 2851.08, 2679.42, 2564.92, 2362.07, 2341.77, 2034.87, 1970.58, 1911.12, 1729.05, 1690.70, 1577.62, 1505.22, 1451.68, 1303.36, 1280.39, 1251.29, 1157.83, 1094.14, 939.13, 891.56, 860.99, 838.33, 766.13, 741.43, 711.07, 663.28, 628.72, 610.47, 524.06. y el FTIR-ATR Compuesto 3 (cm^{-1}): 2229.76, 1894.81, 1718.15, 1688.08, 1593.14, 1561.20, 1489.15, 1420.97, 1397.29, 1302.81, 1279.89, 1219.96, 1197.55, 1154.28, 1088.50, 1048.36, 1015.72, 949.21, 808.86, 750.13, 633.34.

Se realizaron diferentes pruebas de formulación para así obtener las cantidades deseadas y la prueba 4 de la tabla 8 fue nuestra formulación correcta para realizar las formulaciones agregando la Arilenaminona y obtener las membranas de Quitosano/Arilenaminona. Para comenzar con la preparación de la membrana, se pesó el quitosano en la balanza analítica y la arilenaminona, cada formulación con su dosis específica según la concentración requerida de la membrana.

Tabla 8. Pruebas de formulación de cantidades e ingredientes.

No. de prueba	Glicerol	Ácido Acético	Agua destilada	Acetonitrilo	CMC	Quitosano
Prueba 1	0.28 ml	0.8ml	7ml + 9ml	0.7 ml	3.5 mg	168 mg

Prueba 2	N/A	0.8ml	7 ml + 9 ml	0.1 ml	3.5 mg	171.5 mg
Prueba 3	8.75 ml	0.8ml	8.9 ml	.5 ml	--	162.75 mg
Prueba 4	0.4 ml	0.8 ml	37.6 ml	1.2 ml	--	350 mg

Según los experimentos de disolución realizados (tabla 9), se observó que el acetonitrilo es el disolvente más efectivo para incorporar a la matriz acuosa. Por lo tanto, se modificó la técnica de preparación de las membranas, comenzando por disolver la cantidad correspondiente de arilenaminona en acetonitrilo a 60°C durante 5 minutos para alcanzar la concentración deseada. Posteriormente, se añadió agua destilada o tridestilada con quitosano en polvo a la misma temperatura. La reacción se agitó a 700 rpm durante 5 minutos.

Tabla 9. Pruebas de solubilidad de enaminona.

	1.0 ml	HCl (1ml)	AAG
Acetona	I	I	AS
Acetonitrilo	S	I	AS
Etanol	I	I	AS
Hexano	I	I	I

*El acetonitrilo se seleccionó como el mejor medio para solubilizar el compuesto 3. S= Soluble. I= Insoluble. AS= Aparentemente soluble.

Se observa que el compuesto de arilenaminona no se integra como una mezcla homogénea. La enaminona no se disolvió en el medio acuoso de preparación de membranas. Por lo que, se ensayaron pruebas de disolución en diferentes disolventes (Tabla 9), con la finalidad de poder generar una mezcla homogénea de la preparación membranas de quitosano con arilenaminonas a diferentes concentraciones para pruebas piloto de actividad antimicrobiana contra *S mutans*. En las pruebas piloto de la tabla 8 se pudo observar que la utilización del glicerol fue de gran avance en la mucoadhesividad, es decir, las propiedades mucoadhesivas mejoraron y se determinó esa concentración de glicerol para la formulación de la membrana.

SÍNTESIS DE LA MEMBRANA QUITOSANO/ARILENAMINONA

El quitosano y la arilenaminona se pesaron en una balanza analítica, cada formulación con su dosis específica según la concentración requerida de la membrana. Se colocó en un vaso de precipitado la dosis indicada de arilenaminona la cual se mezcló con el 1.2 ml de acetonitrilo hasta disolverse por completo. Después se agregaron 37.6 ml de agua tridestilada, y se dejaron en agitación a 700 rpm por 5 minutos, y se agregó 0.8 ml de ácido acético glacial, por último, se agregó el quitosano, según su concentración, se dejó en agitación por 5 minutos más y se vierte en una caja Petri.

En la preparación inicial de pruebas de membranas, se comenzó utilizando vaso de precipitado, con agua destilada, mezclándose a 600 rpm la dosis de enaminona, para después colocar ácido acético glacial, algunas muestras fueron sintetizadas con 0.28 ml de glicerol y otras sin glicerol como se muestra en la Tabla 7. Al final se agregó el quitosano dejándose en agitación por 5 minutos, posteriormente se vierte en caja Petri de plástico.

La siguiente prueba fue realizada utilizando agua destilada a 700 rpm, con la dosis específica de enaminona, para después colocar ácido acético glacial, en la siguiente prueba realizada no se utilizó glicerol, en esta mezcla se dejó por 5 minutos ya que no había una buena disolución, se agregó ácido acético glacial y se agregó el quitosano, para dejar en agitación 10 minutos, posteriormente se vierte en caja Petri de plástico.

Se realizó la siguiente prueba utilizando 8.9 ml de agua tridestilada, mezclándose a 700 rpm con la dosis específica de enaminona, para después colocar ácido acético glacial, se dejó por 5 minutos agregando acetonitrilo como disolvente, una vez disuelto en su totalidad, se dejó en agitación a 10 minutos, posteriormente se vierte en caja Petri de plástico.

Las membranas resultantes no tienen propiedad mucoadhesiva además en las pruebas de disolución se desintegraban inmediatamente. Por lo que se decidió a realizar pruebas con otros componentes poliméricos. En la tabla 10 se resumen algunas pruebas de formulación con Carboximetilcelulosa (CMC) y glicerol como componentes poliméricos de la matriz de membranas. Se observó que las membranas con CMC no presentaban las propiedades deseadas por nuestra

investigación. Mientras que en las pruebas el glicerol resultó un buen componente en la formulación para que las membranas resultantes presentaran las propiedades deseadas de flexibilidad, mucoadhesividad, etc.

PREPARACIÓN DE MEMBRANAS CON Y SIN GLICEROL

P1CMC CON GLICEROL.

Se mezcló en un vaso de precipitado 1ml de agua tridestilada diluida con 3.5 mg de CMC y después de disolverse se agregó 9ml de agua tridestilada, con 0.28ml de glicerol. Posteriormente se puso en agitación a 650 rpm y se le agregó 168 mg de quitosano para finalizar se agregó 0.1 ml de ácido acético y en seguida se vertió en caja Petri para dejar en ventana de extracción. En el caso de las membranas de clorhexidina se siguió la metodología anterior agregando clorhexidina en lugar de la arilenaminona.

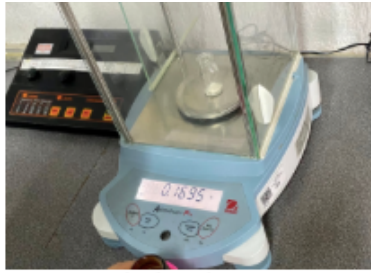
P2 CMC SIN GLICEROL.

En un vaso de precipitado se colocó 9ml de agua tridestilada para que posteriormente se vierten 1ml de agua tridestilada diluida en 3.5 mg de CMC y se agregaron al vaso de precipitado 171.5 mg de quitosano, se dejó en agitación a 650 rpm por 2 minutos, para finalizar se le agregó 0.1ml de ácido acético y en seguida se vertió en caja Petri para dejar en ventana de extracción.

MODIFICACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MEMBRANA DE QUITOSANO/ ARILENAMINONA

Finalmente, se concluyó la formulación de la membrana de quitosano/arilenaminona, con las siguientes indicaciones: En un vaso de precipitado de 50 ml la arilenaminona disuelto en 1.2 ml de acetonitrilo, se añadió 37.6 ml de agua tridestilada, y 0.4 ml de glicerol. La mezcla se dejó en agitación a 700 rpm por 5 minutos, y a continuación se agregó el quitosano, según su concentración. Finalmente, se adicionó 0.8 ml de ácido acético glacial. La reacción se dejó en agitación por 5 minutos más y se vertió en una caja Petri (Figura 8). Para la formulación de membranas de CHX se procede bajo el mismo procedimiento sustituyendo la arilenaminona por CHX (Figura 9).

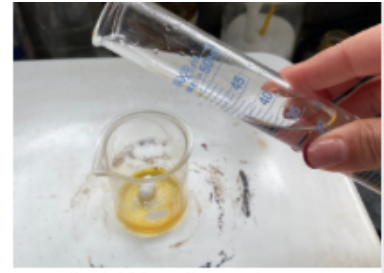
Figura 8. Secuencia de la formulación de membrana quitosano/ arilenaminona.



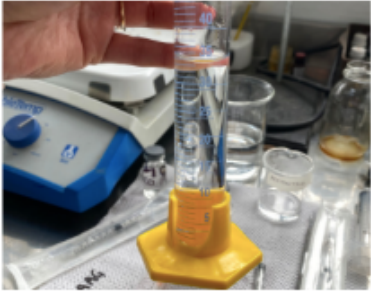
1. Pesaje de quitosano en balanza analítica.



2. Pesaje de arilenaminona.



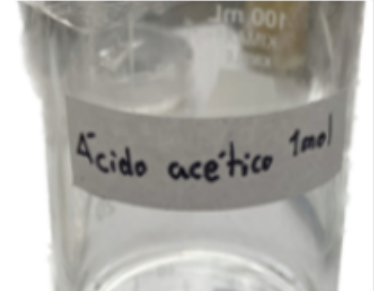
3. Se disolvió la arilenaminona con 1.2 ml de acetonitrilo.



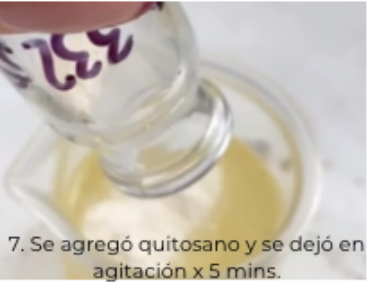
4. Se agregaron 37.6 ml de agua destilada en vaso de precipitado.



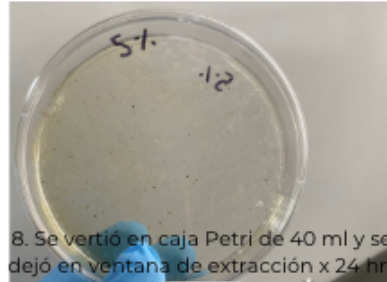
5. Se dejó en agitación a 700 rpm y se añadió 0.4 ml de glicerol.



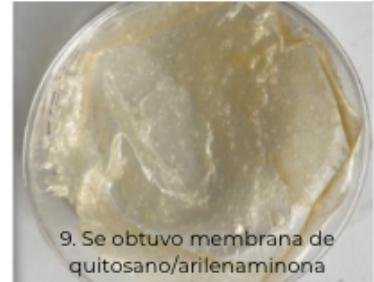
6. Se agregaron 0.8 ml de ácido acético y se dejó en agitación x 5 mins.



7. Se agregó quitosano y se dejó en agitación x 5 mins.



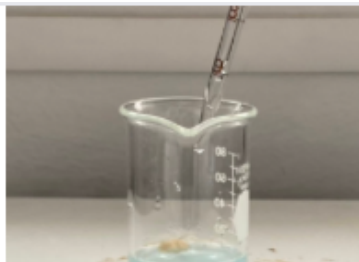
8. Se vertió en caja Petri de 40 ml y se dejó en ventana de extracción x 24 hrs.



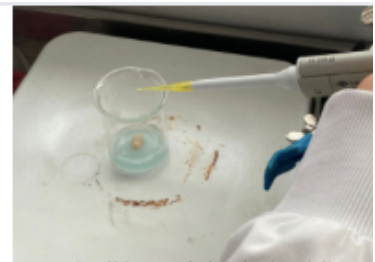
9. Se obtuvo membrana de quitosano/arilenaminona



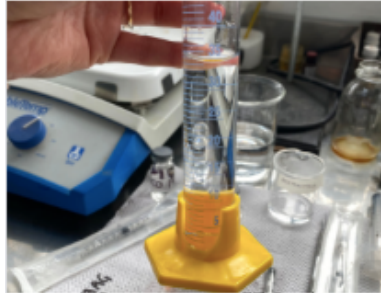
1. En un vaso de precipitado se colocó 1.2 ml de clorhexidina al 2%.



2. Se agregó 0.8 ml de glicerol.



3. Se añadió 1.2 ml de clorhexidina al 2%. a 700 rpm x 5 mins



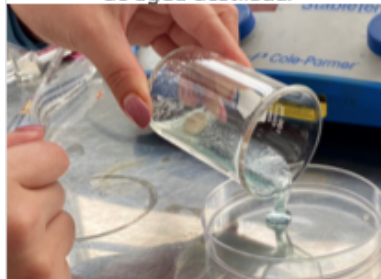
4. Se agregaron 37.6 ml de agua destilada.



5. Posteriormente se realizó la mezcla a 700 rpm x 5 mins



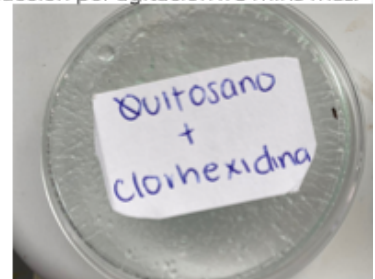
6. Se agregó el quitosano, se dejó en reacción por agitación x 5 mins más.



7. Finalmente se vertió la mezcla en caja Petri.



8. Se dejó en ventana de extracción x 24 hrs.



9. Se obtuvo membrana de quitosano/ clorhexidina

Figura 9. Formulación de membrana quitosano/ clorhexidina.

CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS

En la figura 10 se observan los espectros de FTIR-ATR de las membranas de Quitosano (color azul), arilenaminona al 1% (color verde) y 5% (color gris) donde se observa la similitud de bandas entre estas membranas. Por otro lado, al compararse con el espectro marcado en el compuesto Quitosano/clorhexidina, se observan diferencias en el desplazamiento de las bandas en color amarillo.

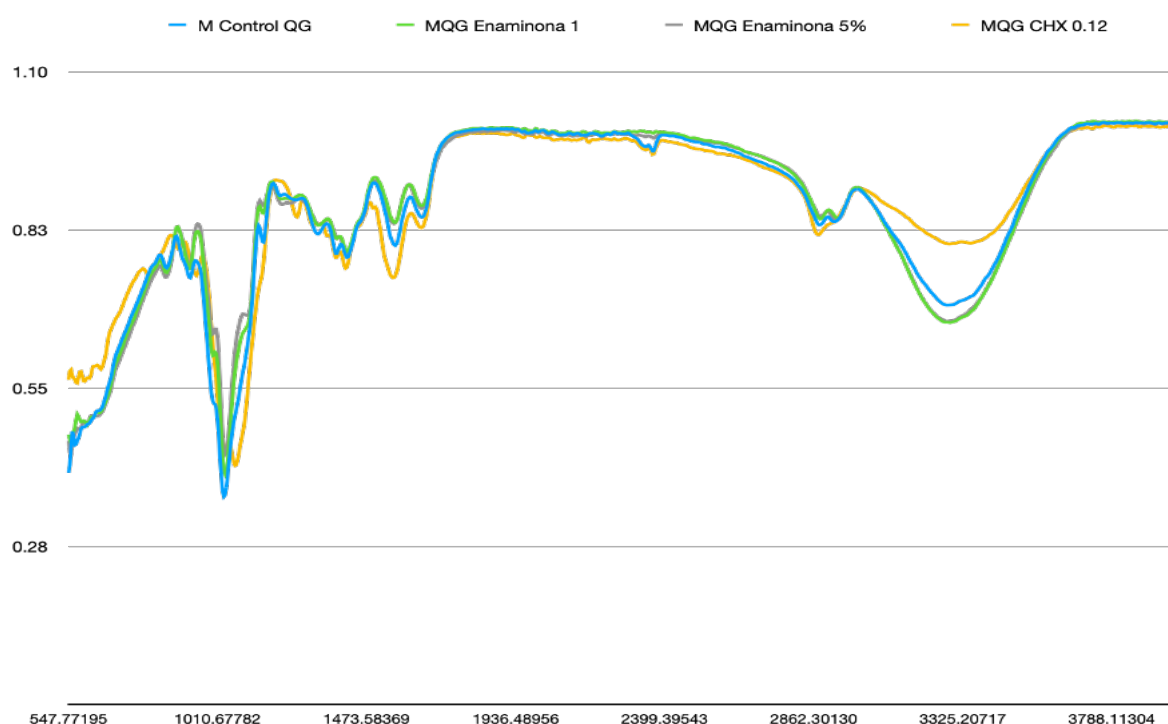


Figura 10. FTIR Quitosano, arilenaminona y clorhexidina.

MICROSCOPIA ÓPTICA.

Para el análisis mediante microscopía óptica, las muestras de membranas de quitosano con arilenaminona se prepararon en láminas delgadas y se colocaron sobre portaobjetos de vidrio. Se analizaron utilizando un microscopio óptico (Leica, DMSL) en diferentes aumentos, incluyendo 4x, 10x, 20x y 40x. En la muestra de membrana de quitosano/arilaminona 5% y 7% (Figura 11 y 12), se observan fibras entrelazadas de quitosano y una distribución homogénea de partículas de enaminona.

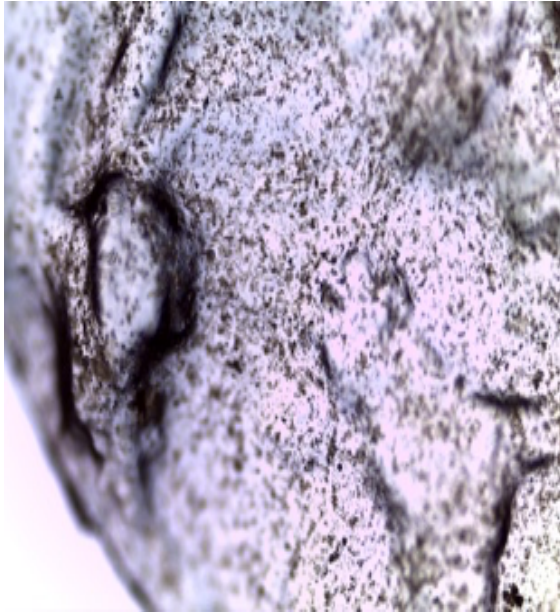


Figura 11. Membrana Quitosano/ Arilenaminona al 5%. (4x).

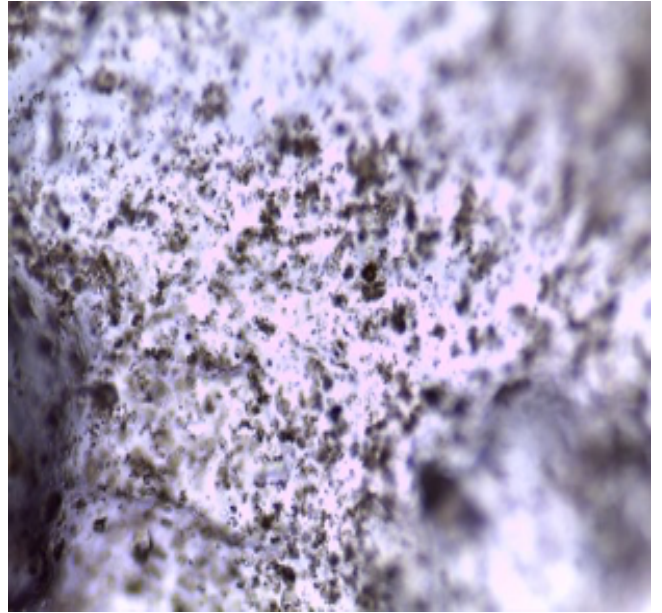


Figura 12. Membrana Quitosano/Arilenaminona al 5% (10x).

La morfología general de la membrana mostró una superficie rugosa con una variabilidad de poros de diferente diámetro (Figura 13).

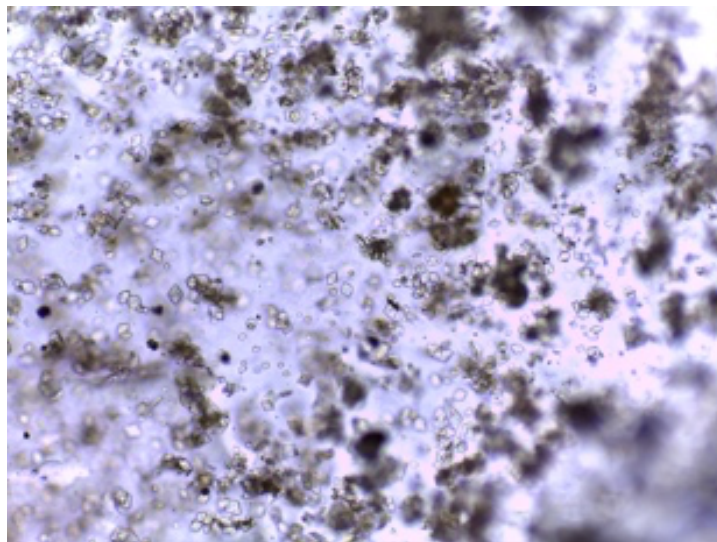


Figura 13. Membrana Quitosano/arilenaminona al 5% (20x).

En la membrana de quitosano/ arilenaminona al 5% a 40x, se observan cristales bien definidos de forma romboidal (Figura 14).

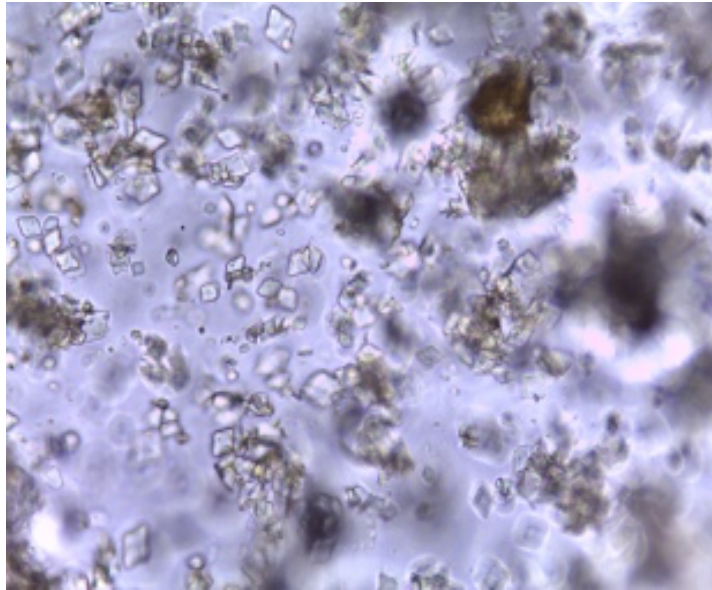


Figura 14. Membrana Quitosano/arilenaminona al 5% (40x).

En la membrana quitosano/arilenaminona a 7% (Figura 15), se observa mayor concentración de enaminona y una distribución más heterogénea de partículas.

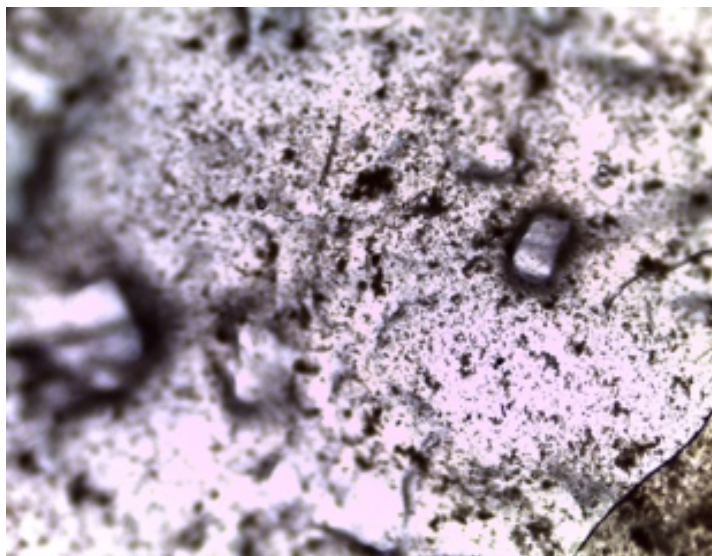


Figura 15. Membrana Quitosano/arilenaminona al 7% (4x).

Aumenta la presencia de estos poros interconectados de diferente diámetro, presentando un aspecto más rugoso (Figura 16), lo cual se observa como una estructura porosa, la cual es adecuada para la actividad antimicrobiana (Figura 17).

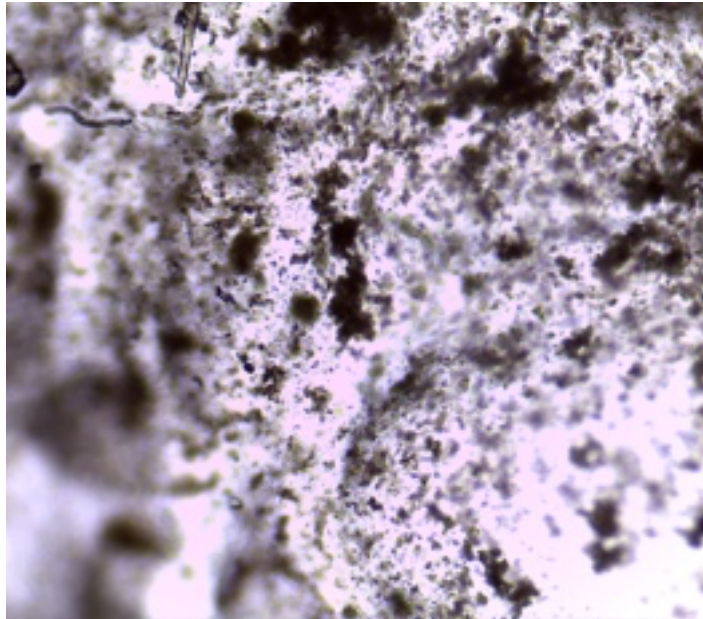


Figura 16. Membrana Quitosano/arilenaminona al 7% (10x).

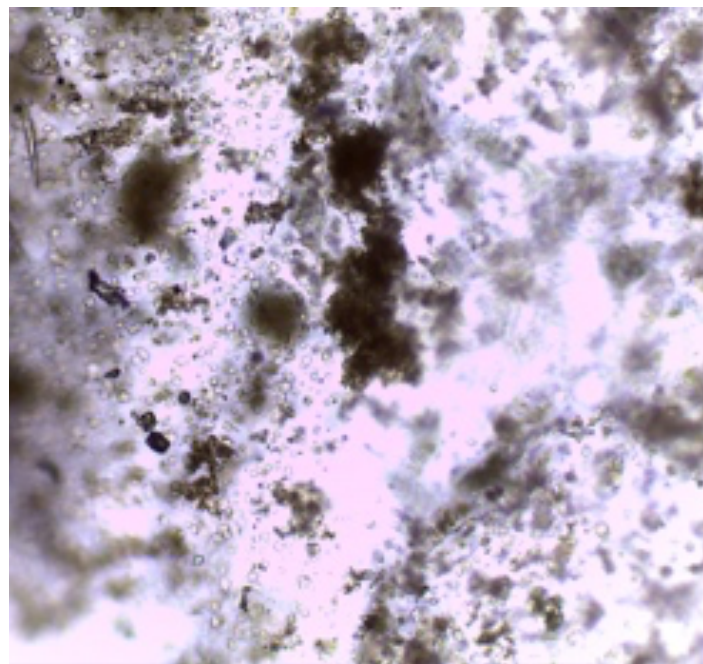


Figura 17. Membrana Quitosano/arilenaminona al 7% (20x).

En el caso de la membrana de quitosano/ arilenaminona al 7% a 40x, se observan un mayor número cristales bien definidos de forma romboidal, con zonas conglomeradas de color marrón sugiriendo mayor presencia de arilenaminona, dónde se confirma la mayor concentración de ésta (Figura 18).

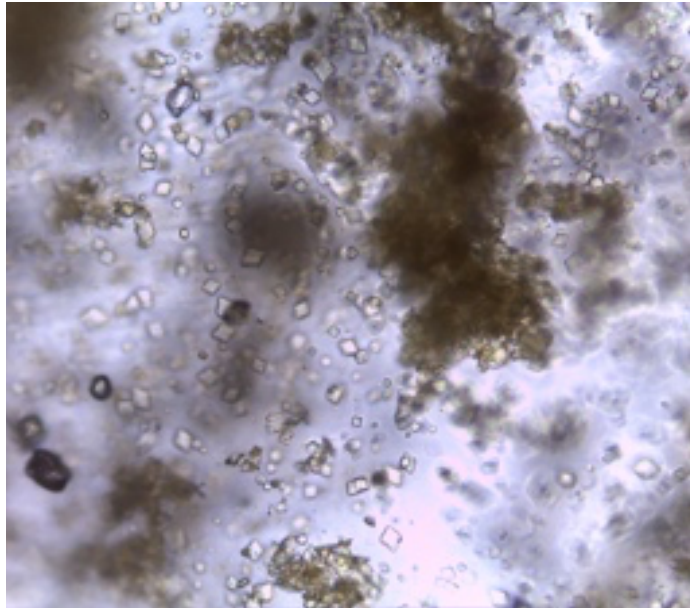


Figura 18. Membrana Quitosano/arilenaminona 7%(40x).

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

En los resultados del análisis por MEB de las membranas Quitosano/Arilenaminona 5% y 7% presentan diversas partículas aglomeradas dando un aspecto rugoso (Figura 19) mostrando así también poros interconectados de diferente diámetro en la membrana, con una superficie de rugosa.

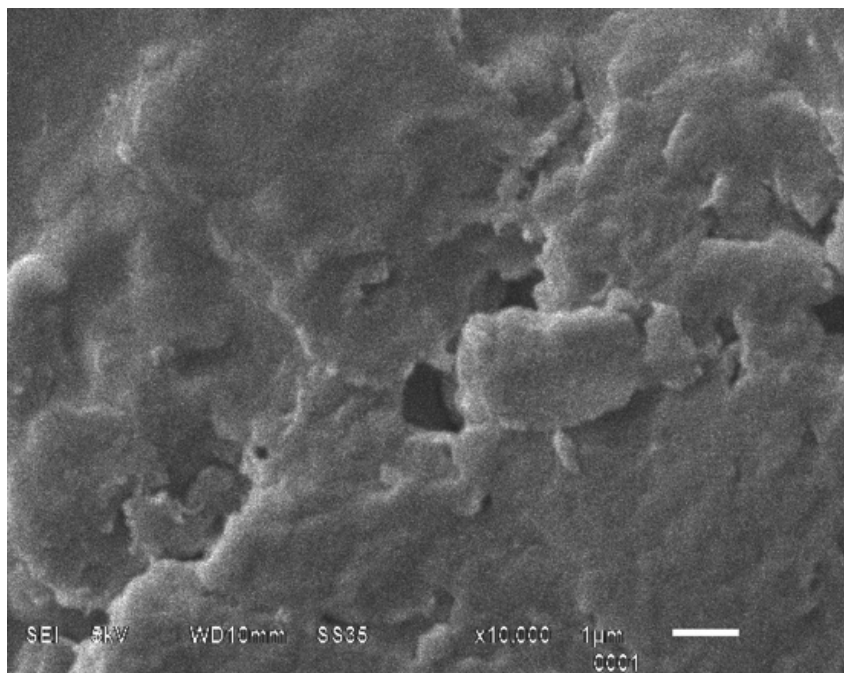


Figura 19. Imagen MEB de membrana Quitosano/arilenaminona 5%.

Análisis de EDS

El análisis de EDS se utilizó para evaluar la composición química de las membranas Quitosano/Arilenaminona 5%, dentro de los cuales encontramos carbono (C), cloro (Cl), calcio (Ca), oxígeno (O) y silicio (Si) presentes, sin embargo, en el caso de las membranas Quitosano/Arilenaminona 7% encontramos un pico correspondiente a Cloro (Cl) en diferentes porcentajes atómicos, así como también se observó calcio (Ca), oxígeno (O), carbono (C) y silicio (Si) observados en la Figura 20.

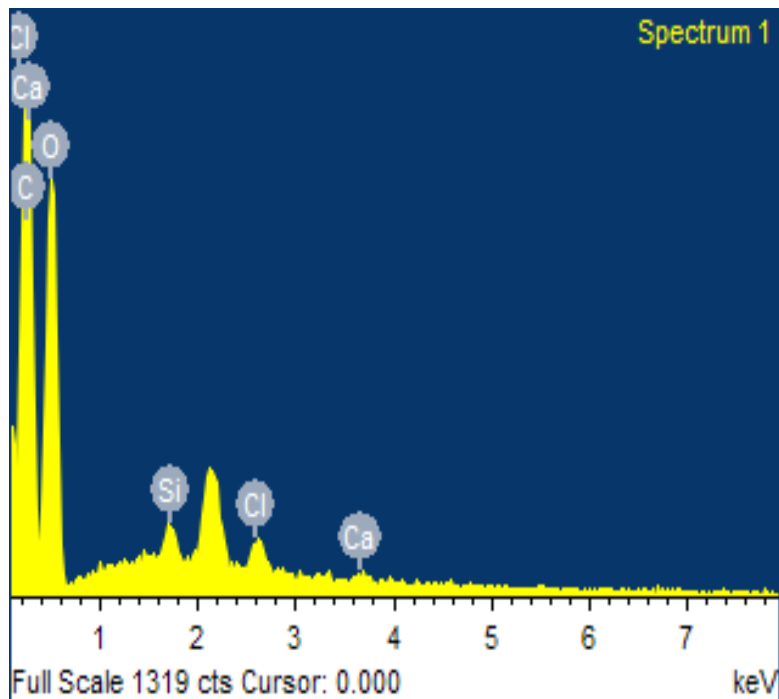


Figura 20. Imagen EDS de membrana Quitosano/arilenaminona 5%.

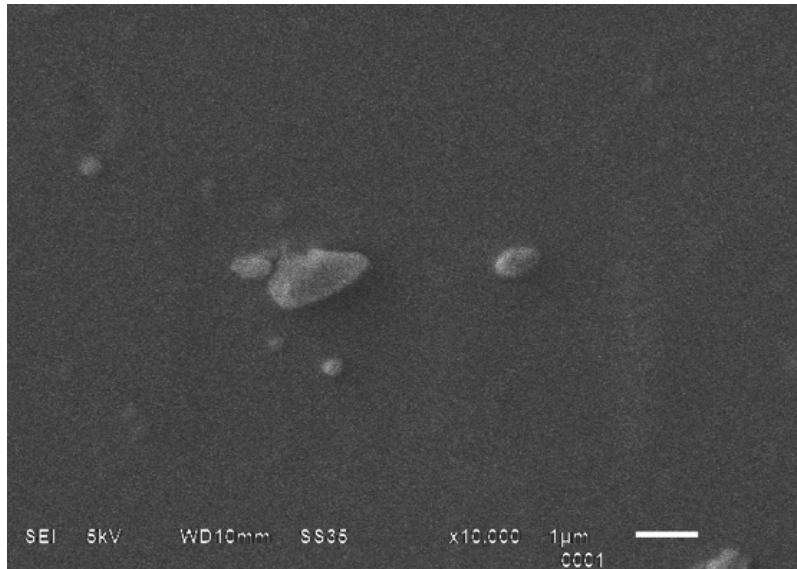


Figura 21. Imagen MEB membrana Quitosano/arilenaminona 7%.

En la imagen de la membrana quitosano/arilenaminona al 7% (Figura 21) se observan menos poros y presencia de aspecto rugoso.

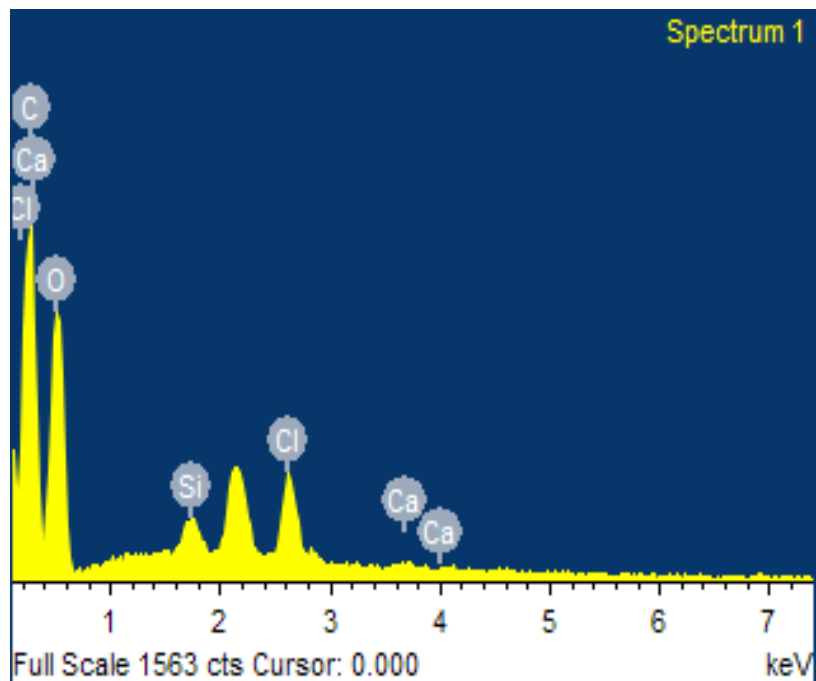


Figura 22. Imagen EDS de membrana Quitosano/arilenaminona 7%.

En la figura 22 se observó un pico correspondiente a Cloro (Cl) en diferentes porcentajes atómicos, así como también se observó calcio (Ca), oxígeno (O), carbono (C) y silicio (Si).

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *S. mutans*.

Se realizaron las pruebas piloto de inhibición, a diferentes concentraciones que aparecen en la Tabla 8, en las cuales, dentro de los porcentajes evaluados, el resultado de la prueba a 5% resultó positivo, formando halo de inhibición contra *S. mutans*.

Se obtuvieron los resultados de la actividad antibacteriana dónde se observó actividad inhibitoria únicamente al 5% de Quitosano/Arilenaminona, por lo cual se procedió a realizar las siguientes pruebas únicamente al 5% y 7%.

La arilenaminona fue sintetizada por segunda vez. Se trabajó con 2 formulaciones, la primera, utilizando agua tridestilada y en la siguiente prueba, utilizando agua destilada, dónde se observó que la primera formulación tuvo resultados más favorables, (Figura 23) es importante señalar que el cambio de agua a destilada también afectó en los resultados de inhibición antibacteriana.

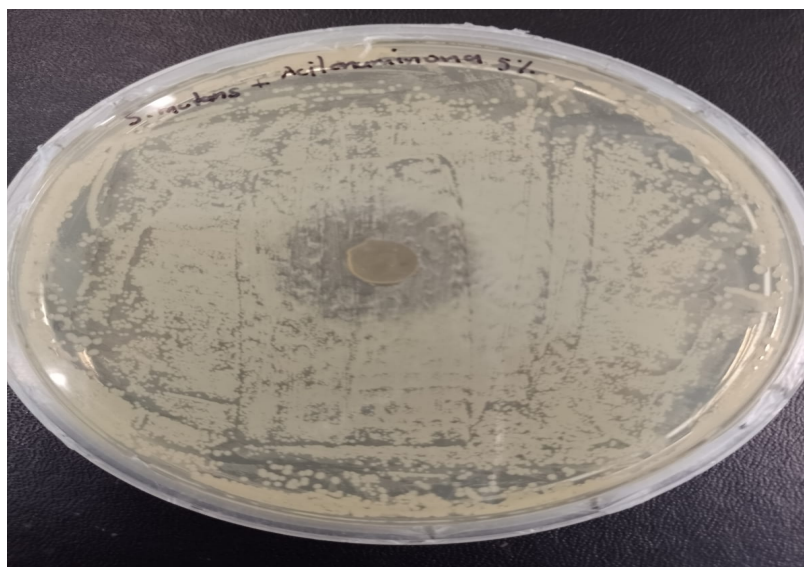


Figura 23 Actividad antimicrobiana de Quitosano/arilenaminona/Glicerol 5% contra *S. mutans*.

En la segunda prueba de actividad antibacteriana, no se lograron obtener resultados positivos, después de realizar las formulaciones nuevamente; en los resultados de la segunda prueba tampoco se logró obtener halo de inhibición como en el control de quitosano con glicerol (Figura 24).

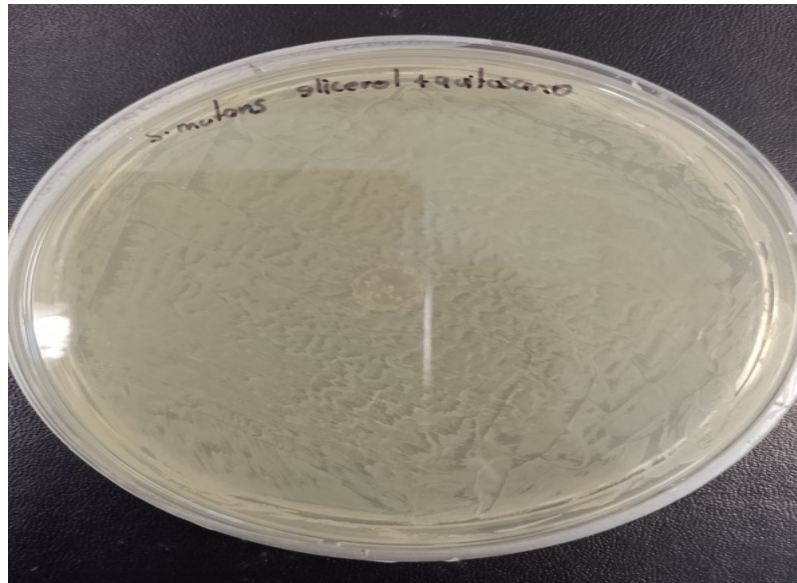


Figura 24. Actividad antimicrobiana de Quitosano/glicerol contra *S. mutans*.

En la última prueba se realiza todo tal y como se realizó en la primera formulación y no se logró obtener halo de inhibición. La única prueba que nos arroja resultados positivos, es decir, halo de inhibición esperado fue la membrana de Quitosano/Glicerol/Clorhexidina de 0.775 mm; esta prueba se realizó como prueba control (Figura 25).

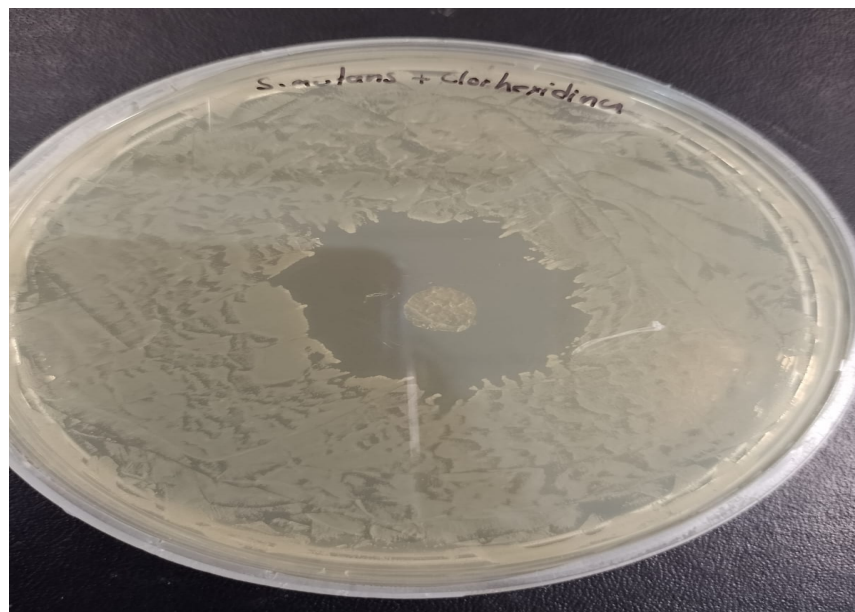


Figura 25. Actividad antimicrobiana de Quitosano/glicerol/clorhexidina.

En el presente trabajo se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de la membrana de Quitosano/arilenaminona a diferentes concentraciones. En una prueba piloto,

la membrana al 5% presenta actividad antimicrobiana por el método de sensidisco. Este resultado no se logró reproducir al escalar o repetir la síntesis nuevamente.

PROPIEDADES DE LAS MEMBRANAS

Hinchamiento de membranas

Se pueden observar en la tabla 10, los resultados de hinchamiento después de 5 minutos en saliva artificial a 35°C y pH de 7.54, con una n=3 de membranas de quitosano/arilenaminona 5%, con un promedio de 2.61 de hinchamiento y desviación estándar de 0.38341, la membrana de quitosano/arilenaminona 7%, con un promedio de 2.31 de hinchamiento y desviación estándar de 0.32648, para finalizar, la membrana de clorhexidina obtuvo un promedio de 2.95 de hinchamiento y un promedio de 0.29681 de desviación estándar.

Tabla 10. Hinchamiento. Después de 5 minutos en saliva artificial a 35°C y pH 7.54.

n=3	MQGE5%	MQGE7%	Clorhexidina
Indice de hinchamiento	2.61 +/- 0.38341	2.31 +/- 0.32648	2.95 +/- 0.29681

ABSORCIÓN DE AGUA

El porcentaje de absorción de agua también fue medido a 5 minutos en saliva artificial a 35°C y pH de 7.54, las membranas de quitosano/arilenaminona al 5% tuvieron una media de 200.82% y su desviación estándar fue de 0.32924, en las membranas de quitosano/arilenaminona 7% se obtuvo una media de 108.30% y una media de 0.76663 y por último las membranas de clorhexidina tuvieron una media de 347.76% y una media de 0.260227 (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentaje de absorción de agua. 5 minutos en saliva artificial a 35 °C y pH 7.54.

	% absorción de agua MQGE5%	% absorción de agua MQGE7%	% absorción de agua Clorhexidina
Promedio	200.82% +/- 0.32924	108.30% +/- 0.76663	347.76% +/- 0.26022

n=3

PH DE SUPERFICIE

El pH de la saliva fue medido en cada una de las membranas dónde se obtuvieron resultados con una media de pH 7.42 para las membranas de quitosano/arilenaminona 5%, con una desviación estándar de 0.01527. Las membranas de quitosano/arilenaminona 7% obtuvieron una media de pH 7.24 y desviación estándar de 0.0472. Por ultimo las membranas de clorhexidina obtuvieron una media de pH 7.38 y su desviación estándar de 0.01732 (Tabla 12).

Tabla 12. pH de la saliva 7.54.

Membrana	MQGE5%	MQGE7%	Clorhexidina
Media	7.42 +/- 0.01527	7.24 +/- 0.04725	7.38 +/- 0.01732
n=3			

MUCOADHESIÓN

Se realizó medición de fuerza de mucoadhesión con un área de contacto de 16 mm², se realizó la prueba por duplicado, la membrana quitosano/glicerol obtuvo valores de 3.08 y 2.07, con un promedio de 2N y prueba de clorhexidina por duplicado con un promedio de 1.3N

Tabla 13. Prueba de mucoadhesividad.

	Membrana QG	Membrana QG Clorhexidina
Prueba 1	3.08 N	1.2 N
Prueba 2	2.07 N	1.4 N
*Área de contacto 16 mm ²		

15. DISCUSIÓN

La caries dental es la destrucción localizada de los tejidos duros del órgano dentario bajo la influencia de los ácidos producidos por el metabolismo de bacterias del biofilm. El agente etiológico bacteriano de la caries dental es *S. mutans* (34,35). Por otro lado, los compuestos sintéticos de origen orgánico son fuente de moléculas con potencial actividad antimicrobiana. En este estudio se probó la actividad antimicrobiana de formulaciones de membranas de quitosano para la liberación de un derivado de N-arilenaminona (8). Reportes previos de nuestro grupo de investigación, Ortiz Y. y cols. probaron en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí este derivado de arilenaminona contra *E. faecalis*, los cuales tuvieron actividad inhibitoria en el crecimiento de esta bacteria (36,37). En nuestro estudio, se plantea la posibilidad de una falla en la formulación, específicamente en la síntesis de la arilenaminona. Durante la búsqueda de posibles causas, se descubrió un defecto de sellado en el tubo utilizado para llevar a cabo dicha síntesis, lo que resultó en fugas al momento de sellarlo. Es importante mencionar que se requieren realizar pruebas adicionales sobre esta enaminona, ya que ha demostrado un potencial antimicrobiano en nuestros resultados. Este estudio tiene un alto valor e importancia en el campo de la investigación.

La única prueba que arrojó resultados positivos y contundentes, en términos de la formación esperada del halo de inhibición, fue la membrana de Quitosano/Glicerol/Clorhexidina, que se utilizó como prueba control en comparación con nuestros resultados de actividad antimicrobiana de la membrana de quitosano/arilenaminona al 5%. Este campo de estudio carece de investigaciones sobre las propiedades mecánicas de la formulación quitosano/glicerol/clorhexidina en los últimos 15 años, según la literatura revisada. Nuestros resultados para esta membrana muestran propiedades de hinchamiento, absorción, mucoadhesividad y grosor. Estos hallazgos nos motivan a considerar la oportunidad de desarrollar y utilizar esta formulación en futuros estudios en el campo de la odontología pediátrica (38-40).

Dentro de las pruebas de Hemmingsen I y cols., en 2021, en sus formulaciones no se evaluaron pruebas de propiedades mecánicas: hinchamiento con una media de 2.61, absorción con un promedio de 200.82%, mucoadhesividad de 3.08N y grosor (41).

Se realizó una búsqueda en la literatura encontrando diversos estudios de enaminonas que presentaban actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. epidermis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *Salmonella*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, ***S. mutans***. (Figura 26) (Fuente propia).

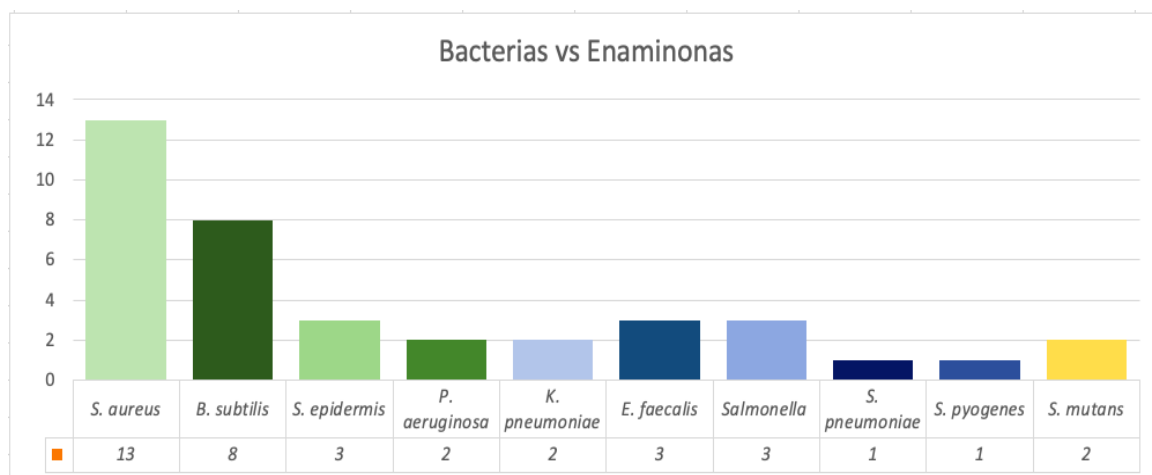


Figura 26. Bacterias estudiadas contra enaminonas para actividad antimicrobiana. Fuente propia.

En esta búsqueda de la literatura, se observa el incremento de interés por estudiar estas enaminonas, las cuales pueden diferir en su síntesis, pero todas con un interés en actividad biológica, principalmente guiada hacia la actividad antimicrobiana (37-40), en este caso, los estudios hacia el *S. mutans* son muy pocas (Figura 27) (Fuente propia), por lo cual es interesante e innovador el giro que se ha dado en esta investigación, dónde las pruebas han dado resultados positivos, que se tienen que seguir explorando.

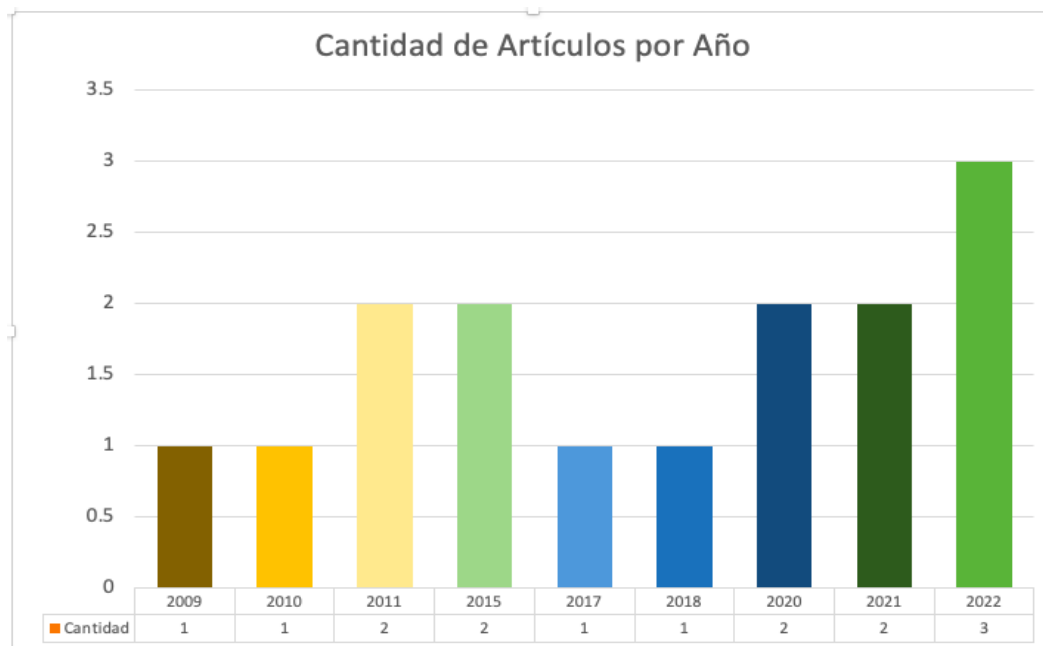


Figura 27. Incremento de estudios de enaminonas con actividad antibacteriana en los últimos 15 años.
Fuente propia.

Si bien existen algunos reportes de membranas para aplicación oral, es importante que las membranas fabricadas se evalúen sus propiedades fisicoquímicas (26,34,36). En el caso de las membranas fabricadas en este proyecto se evaluaron las propiedades de absorción de agua con un promedio de 200.82%, hinchamiento con una media de 2.61, presenta un resultado de mucoadhesividad de 3.08 N en membranas de quitosano y 1.2 N en membrana de quitosano con clorhexidina, pH con un promedio de 7.42 en membranas de quitosano/ arilenaminona 5%, 7.24 en membranas de quitosano/arilenaminona 7% y 7.38 en membranas de quitosano con clohexidina, en el grosor se obtuvo un promedio de 0.157mm en membranas de quitosano, 0.323mm en membranas de quitosano/clorhexidina, 0.172mm de promedio en membranas de quitosano/arilenaminona 5% y 0.162mm en membranas de quitosano/arilenaminona 7%.

16. CONCLUSIÓN

Las membranas de quitosano con enaminona no presentaron actividad antimicrobiana reproducible contra *Streptococcus mutans* CDBB-B-1455 por el método de sensidiscos.

Las membranas de quitosano con clorhexidina presentan una buena actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* CDBB-B-1455 por el método de sensidiscos. Las propiedades físicoquímicas y mucoadhesivas de las membranas formuladas son prometedoras para la aplicación en cavidad oral.

17. BIBLIOGRAFÍA

1. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res.* 2019; 54(1):7-14.
2. Schwendicke F. Contemporary concepts in carious tissue removal: A review. *J of Est and Rest Dent.* 2017;29(6):403-8.
3. Wassel M, Khattab M. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. *J Adv Res.* 2017; 8(4):387-392.
4. Newbrun E. Preventing dental caries: breaking the chain of transmission. *The J Am Den Assoc.* 1992;123(6):55-9.
5. Espinosa L, Martínez G, Loyola J, Niño N, Ruiz F, et al. Bovine Serum Albumin and Chitosan Coated Silver Nanoparticles and Its Antimicrobial Activity against Oral and Nonoral Bacteria. *J of Nan.* 2015:1-9.
6. Poveda M, Sánchez S, Medina E, Espinel M, Ríos E, et al. Gluconato de clorhexidina al 0.12% en la inhibición de la adherencia de *Streptococcus mutans* en restauraciones provisionales de polimetilmetacrilato *in vitro*. *Rev Odon Mex.* 2006;10(1):26-29.
7. Vieira DR, Amaral FM, Maciel MC, Nascimento FR, Libério SA, et al. Plant species used in dental diseases: Ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. *J of Ethnoph.* 2014;155(3):1441-9.
8. Mahmud T, Rehman R, Gulzar A, Khalid A, Anwar J, et al. Synthesis, characterization, and study of antibacterial activity of enaminone complexes of zinc and Iron. *Arab J Chem.* 2010;3(4):219-24.
9. Naringrekar V, Stella V. Mechanism of Hydrolysis and Structure-Stability Relationship of Enaminones as Potential Prodrugs of Model Primary Amines. *J of Pharm Sci.* 1990;79(2):138-46.
10. Bangalore P, Pedapati R, Pranathi A. Aryl-*n*-hexanamide linked enaminones of usnic acid as promising antimicrobial agents. *Mol Div.* 2022;(27):811-836.

11. Cindrić M, Rubčić M, Hrenar T, Pisk J, Cvijanović D, et al. Novel enamminones as non-cytotoxic compounds with mild antibacterial activity: Synthesis and structure-activity correlations. *J of Mol Str.* 2018;(1154):636-42.
12. Theppawong A, De Vreese R, Vannecke L, Grootaert C, Van Camp J, et al. Synthesis and biological assessment of novel N -(hydroxy/methoxy) alkyl β -enaminone curcuminoids. *Bio Med Chem Let.* 2016;26(23):5650-6.
13. Costa E, Silva S, Madureira A, Cardelle A, Tavoria F, et al. A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation in vitro. *Carbohydr Polym.* 2014;(101):1081-1086.
14. Fakhri E, Eslami H, Maroufi P, Pakdel F, Taghizadeh S, et al. Chitosan biomaterials application in dentistry. *Int J Bio Mac.* 2020;162: 956-974
15. Akman A, Tiğli R, Gümüşderelioğlu M, Nohutcu R. bFGF-loaded HA-chitosan: a promising scaffold for periodontal tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 92(3):953-962.
16. Qian R, Zhongcheng L, Longjiang D, Xiuqing W, Yumei N, et al. Anti-biofilm and remineralization effects of chitosan hydrogel containing amelogenin-derived peptide on initial caries lesions. *Regen Biomater.* 2018;5(2):69-76.
17. Bae K, Jun E, Lee S, Paik D, Kim J. Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. *Clin Oral Invest.* 2006;10: 102-107.
18. Pasquantonio G, Greco C, Prenna M, Ripa C, Vitali L, Pretelli D, et al. Antibacterial Activity and Anti-Biofilm Effect of Chitosan Against Strains of *Streptococcus Mutans* Isolated in Dental Plaque. *Int J of Imm and Pharm.* 2008;21(4):993-997.
19. Divya K, Vijayan S, Tijith K. Antimicrobial Properties of Chitosan Nanoparticles: Mode of Action and Factors Affecting Activity. *F Pol.* 2017;18(2):221-230.
20. Utria J, Pérez E, Rebolledo M, Vargas A. Características de las soluciones de la clorhexidina al 2% y al 0.2% en preparaciones cavitarias en odontología: una revisión. *Duazary.* 2018;15(2):181-194.
21. Peers S, Montembault A, Ladavière. Chitosan hydrogels for sustained drug delivery. *J of Cont Rel.* 2020;(326):150-63.
22. Shariatina Z, Jalali A. Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications. *International J of Bio Mac.* 2018;(115):194-220.
23. Luo L, He Y, Jin L, Zhang Y, Guastaldi F, et al. Application of bioactive hydrogels combined with dental pulp stem cells for the repair of large gap peripheral nerve injuries. *Bio Mat.* 2021;6(3):638-654.

24. Yen-Ting C, Shan-Ling H, Li-Wen L, Lin-Yang C. Attachment of Periodontal Ligament Cells to Chlorhexidine -Loaded Guided Tissue Regeneration Membranes. *J Periodontol*. 2003;74(11):1652-9.
25. Cuevas Y. Actividad antimicrobiana de DCF-AP ENAMINONA Sobre *Enterococcus faecalis*: estudio in vitro. 2021:1-62.
26. Krajewska B. Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. *Sep and Pur Tec*. 2005(41):305-312.
27. Baker R. Reverse osmosis in: *Membrane Technology and Applications*. segunda edición. Wiley. 2004.
28. Kusmono, Abdurrahim I. Water sorption, antimicrobial activity, and thermal and mechanical properties of chitosan/clay/glycerol nanocomposite films. *Heliyon*. 2019 (5):1-7.
29. Edafiohgo I, Phillips O, Udo E, Samuel S, Rethish B. Synthesis, antibacterial and anticonvulsant evaluations of some cyclic enaminones. *Eur J Med Che*. 2009;44(3):967-975.
30. Pisk J, Bilić L, Đaković M, Cvijanović D, Damjanović V, et al. Design of mononuclear, binuclear and polynuclear molybdenum (VI) complexes based on ONO benzoylacetone derived enaminones and their in vitro biological activity. *Polyhedron*. 2018;(145):70-76.
31. Farghaly T, Abdallah M, Muhammad Z. Synthesis and Evaluation of the Anti-Microbial Activity of New Heterocycles Containing the 1,3,4-Thiadiazole Moiety. *Molecules*. 2011;(16):10420-10432
32. Islam A, Khaled K. Synthesis, and reactivity of enaminone of naphtho[b]1,4-oxazine: One pot synthesis of novel isolated and heterocycle-fused derivatives with antimicrobial and antifungal activities. *Russ J Bioorg Chem*. 2015(41):421–436.
33. Akhramez S, Oumessaoud A, Hibot A, Talbi S, Hamri S, et al. Synthesis of pyrazolo-enaminones, bipyrazoles and pyrazolopyrimidines and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties. *Ar J of Che*. 2022;(15):2-14.
34. Amaye I, Haywood R, Mandzo E, Wirick J, Jackson-Ayotunde P. Enaminones as building blocks in drug development: Recent advances in their chemistry, synthesis, and biological properties. *Tetrahedron*. 2021;(83):1-15.
35. Mahamud T, Rehman R, Hussain R, Salman M, Shafique U, et al. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of some Enaminones and their Complexes with Nickel (II) and Antimony (III). *J Chem Soc Pak*. 2011;33(3):426-432.

36. Kadhom H, Numan A, Atiyah E. Synthesis and Characterization of New Ligand for β -enaminone and its Mixed Ligand Complexes with Some Metal Ions and Evaluation of their Biological Activity. *Int J of Drug Deliv Tech.* 2022;12(2):640-647.
37. Jeragh B, Elassar A. Enaminone Complexes: Synthesis, Characterization and Bioactivity. *Chem Sci Trans.*, 2015;4(1):113-120.
38. Ahmed A, Waheed E, Numan A. Synthesis, Characterization, Antibacterial study and Efficiency of Inhibition of New di- β -enaminone Ligand and its Complexes. *J Phys Conf Ser.* 2020;(1660):1-15.
39. Han B, Zhang D, Shao Z, Kong L, Ly S. Preparation, and characterization of cellulose acetate/carboxymethyl cellulose acetate blend ultrafiltration membranes. *Desalination.* 2013;(311): 80-89.
40. Korelc K, Larsen B, Gasperlin M, Tho I. Water-soluble chitosan eases development of mucoadhesive buccal films and wafers for children. *Int J Pharm.* 2023;(631):1-13.
41. Hemmingsen L, Giordani B, Pettersen A, Vitali B, Basnet P, et al. Liposomes-in-chitosan hydrogel boosts potential of chlorhexidine in biofilm eradication *in vitro*. *Carb Pol.* 2021;(262):1-10.

18. ANEXOS

FORMATOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Tabla 14. Medición de halo de inhibición en mm.

Actividad antimicrobiana	Grupo experimental (GE)				Controles positivos	
	G1 (1%)	G2 (3%)	G3 (5%)	G4 (7%)	G5 (Quitosano)	G6 (CHX)
<i>S. mutans</i> Halo de inhibición en mm	1.- 0 2. 0 3. 0 4. 0	1.- 0 2. 0 3. 0 4. 0	1.- 0.27 2. 0 3. 0 4. 0	1.- 0 2. - 0 3. - 4. -	1.-. 0 2. 0 3. 0 4. 0	1.- 0.7 2. 0.8 3. 0.7 4. 0.9

Tabla 15. Hinchamiento. Después de 5 minutos en saliva artificial a 35°C y pH 7.54.

Membrana	MQGE5%			MQGE7%			Clorhexidina		
	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Hi	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Hi	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Hi
1	28.90	117.00	3.05	18.00	63.1	2.51	43.90	161.60	2.68
2	37.8	126.5	2.35	20	69.7	2.49	25.9	110.6	3.27
3	29.3	100.5	2.43	14.3	41.9	1.93	41.3	161.6	2.91
Promedio			2.61			2.31			2.95
Desviación estandar			0.38341			0.32648			0.29681

Tabla 16. Porcentaje de absorción de agua. 5 minutos en saliva artificial a 35 °C y pH 7.54.

Membrana	MQGE5%			MQGE7%			Clorhexidina		
	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	% absorción de agua	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	% absorción de agua	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	% absorción de agua
1	28.9	95.8	228.71%	18.00	43.1	139.44 %	43.90	209.7	377.6%
2	37.8	116.9	209.25%	20	52.9	164.5%	25.9	112.9	335.90%
3	29.3	77.5	164.50%	14.3	27.3	20.97%	41.3	177.5	329.78%
Promedio			200.82%			108.30%			347.76%

Desviación estandar			0.32924			0.76663			0.260227
---------------------	--	--	---------	--	--	---------	--	--	----------

Tabla 17. pH de la saliva 7.54

	MQGE5%	MQGE7%	Clorhexidina
Membrana			
1	7.44	7.23	7.36
2	7.43	7.21	7.39
3	7.41	7.3	7.39
Media	7.42	7.24	7.38
Desviación estándar	0.01527525	0.04725816	0.017320508

Tabla 18. Prueba de mucoadhesividad.

	Membrana QG	Membrana Clorhexidina	QG
Prueba 1	3.08 N	1.2 N	
Preba 2	2.07 N	1.4 N	
*Área de contacto 16 mm ²			

Tabla 19. Grosor de membranas.

Medida	Quitosano	Clorhexidina	MQGE 5%	MQGE 7%
1	0.179	0.364	0.122	0.127
2	0.1	0.312	0.096	0.162
3	0.138	0.321	0.192	0.203
4	0.165	0.322	0.233	0.178
5	0.205	0.297	0.219	0.143
Promedio	0.157	0.323	0.172	0.162

La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado con base a lo estipulado por el Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por este medio hace **CONSTAR** que:

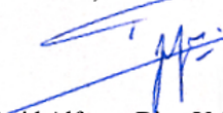
El Proyecto de Investigación (Colectivo) “Formulación de membrana de Arilenaminona/quitosano con potencial actividad contra Streptococcus mutans” presentado por el Responsable del proyecto: DC. Alberto Vinicio Jerezano Domínguez NSS524063; teniendo como Director Metodológico: María Alejandra Peral García ID 100043911; teniendo como Director Disciplinario: MEP. Jennifer Antón Sarabia ID 100398199; teniendo como Asesor externo: Dra. Rita Martínez Martínez; teniendo como alumno a la C. Nayeli Vanessa Machuca Rojas matrícula 221450014; ha sido ACEPTADO y queda registrado en esta secretaría en el libro de registros 07 en la hoja 01 con No. de registro 2022183.

Se extiende la presente constancia en la Heroica Puebla de Zaragoza a los doce días del mes de octubre del año dos mil veintidós.

Atentamente

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., a 12 de octubre de 2022


MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología

c.c.p. minutarlo

