



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“EVALUACIÓN DE GELES DE METFORMINA-MTA COMO RECUBRIMIENTO
PULPAR DIRECTO EN MODELO MURINO” Parte I: preparación y
caracterización**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestría en Estomatología con Opción Terminal en Endodoncia

PRESENTA:

**C.D. LIGIA GABRIELA QUINTANA VAZQUEZ
I.D. 217450002**

**RESPONSABLE DEL PROYECTO Y DIRECTORA METODOLÓGICA
D.C. CAROLINA SÁMANO VALENCIA
I.D. 100526470**

**DIRECTORA DISCIPLINARIA
D.C. BRENDA ERÉNDIDA CASTILLO SILVA
NSS526469**

**ASESOR
C.D.E.E. ALEJANDRO GERARDO MARTÍNEZ GUERRERO
I.D. 100526940**

Puebla, Pue. Octubre 2019

AGRADECIMIENTOS

“Todos nuestros sueños se pueden volver realidad si tenemos el coraje de perseguirlos”

Quiero dar gracias a **Dios** principalmente por permitirme vivir esta etapa que tanto anhelaba, en la universidad que siempre quise y que pude culminar satisfactoriamente, superando tiempos difíciles que se presentaron en los que siempre estuvo conmigo.

No tengo palabras para agradecer a mi **mamá** y a **Santi**, fueron la luz que me guió en este camino y serán la mayor motivación para cada día ser mejor en todos los aspectos de mi vida. Gracias mamá por tus sabios consejos, por tus palabras de aliento en todo momento, por cuidarme de todo y todos, por ser mi fortaleza, por literal vivir conmigo cada día de la maestría y como siempre te digo, gracias porque sin ti todo esto no hubiera sido posible. A ti Santi, gracias por que a pesar de tu edad, entiendes que tu mamá no podía estar siempre contigo, por recibirme feliz siempre que llegaba, algún día sabrás que todo es por y para ti, gracias por acompañarme a atender a mis pacientes, a estudiar, a hacer artículos desde que todavía no nacías. Ustedes son lo mejor de mi vida.

Agradezco a mi **papá**, por el apoyo brindado durante estos años, a tu manera haz estado para escucharme y darme los consejos que crees convenientes en cada situación, siempre con la aprobación de mi mamá.

Gracias a mi **familia**: mi **hermano Habid**, mi cuñada **Belinda**, mi sobrino **Mateo**, mi hermano **Temo**, mis sobrinas **Eunice**, **Zeltzin**, **Estefania** y **Damaris** por apoyarme incondicionalmente en cada paso, en cada toma de decisiones y en cada proyecto que emprendí; por tener paciencia en todas las ocasiones que tuvieron mi ausencia en fechas especiales.

A mi directora de tesis la **Dra. Carolina Samano Valencia**, agradezco por siempre compartir su conocimiento y todas las horas de trabajo teniendo presente cada día nuestra meta: finalizar de la mejor forma este proyecto. Mi más sincero agradecimiento por su comprensión en todo momento y por escucharme cuando lo necesitaba. Gracias al **Dr. Rosendo Carrasco**, siempre que acudí a él, me daba su tiempo y ayuda.

Gracias a mi coordinador y asesor el **Dr. Alejandro** por confiar y ver en mí las ganas de pertenecer a este posgrado y ser el abuelo de bolillo, a todos y cada uno de mis **profesores** por el aprendizaje que me dieron día a día y porque todos se convirtieron en mi familia.

Gracias a **Fátima**, **Maleni** y **Mariana**, por reír, llorar, aprender, estudiar, en pocas palabras vivir toda la experiencia del posgrado conmigo. Fueron las mejores compañeras que pude haber pedido y ahora las llevaré en mi corazón siempre, junto con todas las experiencias vividas.

Finalmente, gracias a la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, por ahora formar parte de mi vida como profesionista.

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1.INTRODUCCIÓN.....	7
2. ANTECEDENTES	8
2.1 ANTECEDENTES GENERALES.....	8
2.1.1 Recubrimiento pulpar	8
2.1.2 Materiales utilizados para realizar recubrimiento pulpar	10
2.1.3. Geles	16
2.1.4. Métodos para realizar la caracterización de geles	19
2.1.5. Descripción de métodos de caracterización.....	19
2.1.6. Instrumentos para pruebas de caracterización en geles	23
2.2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	25
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	32
4. JUSTIFICACIÓN	33
5. HIPÓTESIS	34
6. OBJETIVOS	35
Objetivo general:	35
Objetivos específicos:.....	35
7. MATERIALES Y MÉTODOS	36
7.1 Diseño	36
7.2 Población y muestra	36
7.3. Criterios de selección.....	36
7.4. Definición de variables y escala de medición.....	37
7.5. Concordancia y fiabilidad.....	38
7.6. Ubicación espacio-temporal	38
7.7. Procedimientos, técnicas y fuentes de recolección	39
7.7.1. Prueba de medición de pH de la solución de metformina	39
7.7.2. Curva de calibración de la solución de metformina	39
7.7.3. Preparación de geles.....	40
7.7.4. Pruebas de caracterización realizadas en los geles.....	41
7.8. Logística: recursos humanos, materiales y financieros.....	44
8. BIOÉTICA	45
9. RESULTADOS.....	45
9.1. Prueba de medición de pH de la solución de metformina.....	45
9.2. Curva de calibración de la solución de metformina.....	45

9.3.	Preparación de geles	46
9.4.	Pruebas de caracterización realizadas en los geles	47
10.	DISCUSIÓN	61
11.	CONCLUSIÓN	66
12.	PERSPECTIVAS	66
13.	BIBLIOGRAFÍA	67

RESUMEN

Introducción: En la presente investigación, se formularon geles experimentales, gel de metformina-MTA, gel de metformina, gel de MTA y gel de quitosán, para su posterior caracterización, la cual se llevó a cabo en la Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, con pruebas de medición de pH, viscosidad, espectroscopía infrarroja transformada de Fourier y microscopía óptica, con el fin de poder probar dichos materiales en un modelo animal de experimentación conociendo las características de los geles.

Objetivos: Formular y caracterizar mediante medición de pH, viscosidad, espectroscopía infrarroja transformada de Fourier y microscopía óptica de: un gel de metformina-MTA, un gel de metformina, un gel de MTA y de un gel de quitosán.

Material y Métodos: Se realizaron pruebas de medición de pH, viscosidad, espectroscopía infrarroja transformada de Fourier y microscopía óptica en los cuatro geles experimentales en los laboratorios de la Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento. A excepción de la prueba de medición de pH, la cual se realizó en el Laboratorio de Biomateriales de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Se preparó cada muestra para ser probada en potenciómetro (sólo gel de quitosán) y tiras reactivas (gel de metformina-MTA, gel de metformina y gel de MTA), viscosímetro (sólo el gel de quitosán), espectrofotómetro y microscopio óptico.

Resultados: Medición de pH: estas fueron las lecturas para el gel de quitosán, 1° pH 3.3 y 2° pH 3.6. Para los geles restantes en los que se utilizaron tiras reactivas, los resultados fueron los siguientes: **GEL MTA-METFORMINA:** pH 4, **GEL MTA:** pH 4, **GEL METFORMINA:** pH 3. **Viscosidad:** se utilizaron varias agujas en el potenciómetro. Sin embargo, se mostrará con la que se obtuvo el mejor desempeño: Punta RV – 05. 6960 cP. 50 RPM = 87 %. **FTIR:** Se mostraron picos característicos correspondientes a los componentes de los geles; en el pico 1553 cm^{-1} en el espectro de MTA correspondió a C=O sales de carboxilatos y para metformina en el pico 573 cm^{-1} para un enlace de C-N-C por deformación del enlace. **Microscopía óptica:** Se observaron los geles experimentales y se concluyó que los geles de quitosán y de metformina tuvieron una coloración transparente. En el gel de metformina-MTA se incluyó de mejor forma el MTA, esto debido a la acidez de la metformina. Para el gel de MTA se observaron y midieron las partículas localizadas, siendo de un tamaño de 12 micras y menores.

Conclusión: Se realizaron geles que mostraron propiedades aptas para ser probados como materiales para recubrimiento pulpar directo, tratamiento perteneciente a la terapia pulpar vital, cuyo objetivo principal es mantener la vitalidad pulpar. Mostraron el pH adecuado, incluso en la medición que se realizó a los 3 días, el FT-IR mostró que los geles presentaban los elementos del MTA y al microscopio se observó un tamaño de partícula ideal para la combinación con el gel. Se espera poder observar una vez que se pruebe en el modelo murino, la bioactividad y biocompatibilidad de esta combinación de materiales.

ABSTRACT

Introduction: In the present investigation, experimental gels were formulated which were: form of experimental experiments, metformin gel-MTA, metformin gel, MTA gel and chitosan gel, for its subsequent characterization, which was carried out in the Direction of Innovation and Knowledge Transfer of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, with tests of pH measurement, viscosity, infrared spectroscopy, Fourier transform and optical microscopy, in order to will be able to use these materials in an animal model of experimentation knowing the characteristics of the gels.

Objective: To formulate and characterize by means of pH measurement, viscosity, infrared Fourier transform spectroscopy and metformin gel-MTA optical microscopy, metformin gel, MTA gel and chitosan gel.

Material and methods: pH, viscosity, Fourier transform infrared spectroscopy and optical microscopy tests were performed in the 4 experimental experiments in the laboratories of the Innovation and Knowledge Transfer Department. With the exception of the pH measurement test, which was carried out in the Biomaterials Laboratory of the Faculty of Stomatology of the Autonomous University of Puebla. Each sample was prepared to be tested in potentiometer (chitosan gel) and test strips (metformin gel-MTA, metformin gel and MTA gel), viscometer (only chitosan gel), spectrophotometer and optical microscope.

Results: pH measurement: these were the readings for the chitosan gel, 1 ° pH 3.3 and 2 ° pH 3.6. **MTA-METFORMIN GEL:** pH 4, **MTA GEL:** pH 4, **METFORMIN GEL:** pH 3. **Viscosity:** several needles were used in the potentiometer however the best performance was obtained: Punta RV - 05. 6960 cP. 50 RPM = 87%. **FTIR:** characteristic peaks corresponding to the components of the gels were considered; at peak 1553 cm⁻¹ in the MTA spectrum, it corresponded to C = O carboxylate sales and for metformin at peak 573 cm⁻¹ for a C-N-C bond due to deformation of the surround. **Optical microscopy:** The experimental gels were observed and it was concluded that the chitosan and metformin gels had a transparent coloration. The best form of MTA is included in the metformin-MTA gel, this is due to the acidity of metformin. For the MTA gel, the localized particles were observed and measured 12 microns in size and smaller.

Conclusion: Gels were made that showed suitable properties to be tested as materials for direct pulp coating, treatment belonging to vital pulp therapy, whose main objective is to maintain pulp vitality. They showed the proper pH, even in the measurement that was carried out after 3 days, the FT-IR showed that the gels presented the elements of the MTA and under the microscope an ideal particle size was observed for the combination with the gel. It is expected to be able to

observe once the murine model is tested, the bioactivity and biocompatibility of this combination of materials

1.INTRODUCCIÓN

El recubrimiento pulpar directo implica la colocación de materiales dentales directamente sobre los tejidos vitales de la pulpa después de haber removido tejido carioso, con la finalidad de estimular la formación de dentina reparadora. Por lo que este material funcionará como una barrera física que servirá como un "sello biológico".

Aunque se dispone de materiales para realizar recubrimiento pulpar directo como hidróxido de Calcio (Ca(OH)_2), agregado de trióxido mineral (MTA) y Biodentine No se ha explorado el uso de compuestos biológicamente activos que pueden estimular y acelerar la formación reparadora de la dentina (1).

Los compuestos bioactivos tienen acciones en el cuerpo que pueden promover la salud. Para lo cual, estos están siendo estudiados en la prevención de cáncer, alteraciones del corazón y otras enfermedades. Dentro de los cuales, podemos mencionar algunos ejemplos de éstos, los cuales incluyen el licopeno, el resveratrol, el lignano, los taninos y la metformina (1).

Se ha reportado en estudios previos que la metformina ejerce efectos antiinflamatorios, además de su ya conocida función en el metabolismo de la glucosa. La metformina reduce significativamente la liberación inducida por interleucina-1beta ($\text{IL-1}\beta$) de las citoquinas inflamatorias IL-6 e IL-8 en células endoteliales, células de músculo liso (CML) y macrófagos. Además, afecta la activación nuclear del factor kappa B (NF-kB) en las CML vasculares y ayuda a inhibir la respuesta inflamatoria, al detener la producción del factor de necrosis tumoral alfa ($\text{FNT}\alpha$) y del factor tisular (FT) en los monocitos humanos (2).

Además de sus propiedades antiinflamatorias, varios estudios han informado de los efectos positivos de este agente sobre el metabolismo óseo, determinado por el aumento de la producción de colágeno tipo 1. La metformina también aumenta significativamente la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) y la producción de osteocalcina (OC) e induce factores claves de transcripción para la diferenciación osteoblástica como proteína quinasa activada AMPK (2).

Tomando como referencia los efectos y propiedades descritas previamente sobre la metformina, el presente trabajo de investigación propone en la primera parte preparar y caracterizar geles de Metformina-MTA, y posteriormente continuar en la segunda parte del proyecto con la evaluación del efecto de estos geles sobre la formación del puente dentinario, al ser usados como recubrimiento pulpar directo en un modelo murino.

Palabras clave: hidrogel, agregado trióxido mineral, metformina, quitosán, recubrimiento pulpar directo.

2. ANTECEDENTES

2.1 ANTECEDENTES GENERALES

2.1.1 Recubrimiento pulpar

La caries dental es una enfermedad oral crónica que representa una preocupación importante para la salud en el mundo y una de las principales causas de infección en todos los grupos de edad. Generalmente es tratada mediante la eliminación de las lesiones cariosas infectadas y la restauración de los tejidos perdidos con materiales dentales, como composites o amalgamas. Cuando su eliminación es profunda y la pulpa está expuesta, se realiza frecuentemente un procedimiento de recubrimiento directo de la pulpa para formar dentina reparadora y formar una barrera física que funciona como un "sellado biológico". Un procedimiento exitoso de recubrimiento pulpar directo es importante ya que recupera la vitalidad y la función del órgano dentario que de otro modo requeriría tratamientos invasivos, tales como terapia de conducto radicular o extracción (3).

El recubrimiento pulpar directo consiste en la aplicación de un agente directamente sobre la pulpa. En el caso de los dientes temporales, sólo se llevará a cabo cuando la pulpa haya sido accidentalmente expuesta durante el procedimiento operatorio o en casos de mínimas exposiciones traumáticas. El diente debe estar asintomático y la exposición pulpar debe ser mínima y libre de contaminación. La finalidad del tratamiento es mantener la vitalidad del diente sin evidencias clínicas ni radiográficas de patología pulpar, pudiéndose apreciar formación de dentina reparativa (4).

Se ha sugerido que el recubrimiento pulpar directo es un tratamiento de elección después de la exposición pulpar. En 1989, Stanley (5) reevaluó los criterios para el recubrimiento pulpar directo y concluyó que el control de la hemorragia y el contacto del Ca(OH)_2 con el tejido pulpar parecen influir en el éxito del procedimiento. Matsuo et al. reportaron una incidencia significativamente mayor de fracasos cuando las pulpas mostraron sangrado abundante durante el procedimiento, en comparación con sangrado moderado o deficiente (6). Se ha demostrado que la restauración influye de manera importante en la regeneración de pulpas expuestas.

En la siguiente tabla se mencionan algunos de los materiales que se han utilizado para realizar recubrimiento pulpar directo (7):

Tabla 1. Materiales utilizados para recubrimiento pulpar directo. Tomado o elaborada a partir de “Recent Advances in Pulp Capping Materials: An Overview” (7).

1. Hidróxido de calcio	10. Factores de crecimiento
2. Cemento de óxido de zinc	11. Sialoproteína ósea
3. Corticoesteroides y antibióticos	12. Biodentine
4. Cemento de policarboxilato	13. Enzimas
5. Colágeno	14. Células madre
6. Adhesivos	15. Emdogain
7. Fosfato de calcio	16. Proteína odontogénica asociada a ameloblastos
8. Ionómero de vidrio/Ionómero de vidrio modificado con resina	17. Endo sequence
9. MTA (agregado de trióxido mineral)	18. Theracal

El procedimiento de recubrimiento pulpar se basa principalmente en la capacidad del tejido pulpar para sanar. Varios factores afectan este proceso incluyendo la edad, la condición periodontal y la etapa de formación de la raíz. Factores de procedimiento tales como el tamaño de la exposición, su naturaleza (traumática, mecánica o cariosa) y la contaminación microbiana del sitio también se han descrito como determinantes del éxito del recubrimiento pulpar (4).

La pulpa es un órgano capaz de iniciar varios mecanismos de defensa para proteger al cuerpo en cierta medida de la invasión bacteriana. Una pulpa vital parece ser la mejor barrera para este propósito. Desde este punto de vista, es deseable mantener la vitalidad de la pulpa durante el mayor tiempo posible. La exposición a la pulpa sin la participación de microorganismos puede ser superada por mecanismos de reparación, como la formación de un puente dentinario. Sin embargo, las pulpas previamente infectadas por tejido carioso, pueden estar debilitadas e incapaces de iniciar y mantener mecanismos de defensa cuando ocurre la exposición (3).

Por otro lado, se encuentra el recubrimiento pulpar indirecto siendo el procedimiento en el cual la caries más cercana a la pulpa se deja en su lugar y se cubre con un material biocompatible y el diente se restaura para prevenir la micro filtración. Los objetivos del tratamiento son los mismos que para una pulpotomía. Cuando hay presencia de caries profunda en órganos dentarios de la primera dentición, las indicaciones para realizar recubrimiento pulpar indirecto y pulpotomía son las mismas que en el caso de pulpitis reversible o pulpa normal cuando se considera que la pulpa es vital a partir de criterios clínicos y radiográficos. La diferencia ocurre cuando el proceso de eliminación de caries resulta en una exposición pulpar, en donde se realizará un recubrimiento pulpar directo. El recubrimiento pulpar indirecto evita esta exposición pulpar al dejar la caries más profunda en su lugar por lo tanto no está indicado cuando la pulpa está expuesta a la caries (8).

2.1.2 Materiales utilizados para realizar recubrimiento pulpar

Se ha utilizado una amplia gama de materiales para el recubrimiento pulpar directo tales como cementos hidráulicos de silicato cálcico (HCSC) y el Ca(OH)_2 . El Ca(OH)_2 sigue siendo considerado el estándar y es elegido por los odontólogos debido a su bajo costo, propiedades anti-bacterianas y por favorecer la formación de dentina reparadora(7).

2.1.2.1. Hidróxido de calcio

El hidróxido de calcio se introdujo originalmente en el campo de la endodoncia por Herman en 1920 como un agente para recubrimiento pulpar. El hidróxido de calcio tiene un efecto inductor de tejido duro. Es un polvo blanco inodoro y tiene un peso molecular de 74.08. Ca(OH)_2 tiene baja solubilidad en agua, que disminuye a medida que aumenta la temperatura.

Su coeficiente de disociación permite una liberación lenta y controlada de los iones calcio e hidroxilo. La baja solubilidad es una buena característica clínica porque es necesario un largo período para que se vuelva soluble en los fluidos tisulares cuando está en contacto directo con tejidos vitales. Es un medio alcalino (pOH 12.5-12.8), es insoluble en alcohol, y se clasifica químicamente como una base. Sus principales acciones son el resultado de la disociación iónica de los iones Ca^{2+} y OH^- y su efecto sobre los tejidos vitales, como inducir la deposición de tejido duro y ser antibacteriano. En agua tiene un comportamiento tixotrópico, lo que significa que será muy fluido cuando se agite.

La actividad antimicrobiana del Ca(OH)_2 depende de la liberación de iones hidroxilo en un entorno acuoso. Además, se afirma que los iones hidroxilo son radicales libres, las cuales son sustancias químicas muy reactivas que introducen oxígeno en las células, produciendo la oxidación de sus partes, alteraciones en el ADN, y que provocan cambios que aceleran el envejecimiento del cuerpo. Esto es debido a que el oxígeno, aunque imprescindible para la vida, es también un elemento químico muy reactivo cuando se encuentra en altas concentraciones,

favoreciendo una explosión respiratoria, en la que induce la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS), que interactúan con varias biomoléculas.

Los efectos letales de los iones hidroxilo en las células bacterianas se deben al daño de la membrana citoplásmica bacteriana, la desnaturalización de las proteínas y al daño del ADN.

Aunque estos tres mecanismos pueden ocurrir, es difícil establecer, en un sentido cronológico, cuál es el mecanismo principal involucrado en la muerte de las células bacterianas después de la exposición a una base.

El pH del Ca(OH)_2 altera la integridad de la membrana citoplásmica por medio de daño químico a los componentes orgánicos y transporte de nutrientes o mediante la destrucción de fosfolípidos o ácidos grasos insaturados de la membrana citoplásmica durante el proceso de peroxidación.

Sin embargo, el pronóstico del Ca(OH)_2 a largo plazo ha sido cuestionado porque causa inflamación, se disuelve con el tiempo, induce la generación de dentina reparadora porosa y tiene pobres propiedades de sellado (9).

Por otro lado los HCSC son considerados excelentes alternativas al Ca(OH)_2 y los resultados clínicos superiores alcanzados son debido a su biocompatibilidad y osteoconductividad. Dentro de los HCSC se incluye el MTA que es un material que en el mercado desde hace mucho tiempo y presenta las siguientes características (7).

2.1.2.2. MTA

En las últimas dos décadas, el MTA se ha convertido en uno de los materiales endodónticos más ampliamente estudiados. Éste está constituido de calcio, aluminio y selenio. El MTA se introdujo por primera vez en la literatura dental en 1993 y fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en 1998. Y en 1999, el Pro Root MTA fue el primer producto disponible comercialmente, que se lanzó en los Estados Unidos. El MTA Angelus se lanzó en Brasil en el 2001 y recibió la aprobación de la FDA en 2001. El investigador principal para los usos dentales del MTA, el Dr. Torabinejad, explico que las aplicaciones para esta invención se han convertido en el tratamiento estándar en todo el mundo, induciendo la producción de dentina. (10)

Más de 24 millones de procedimientos de endodoncia se realizan anualmente en los Estados Unidos, de los cuales el 5.5% de estos procedimientos consisten en tratamientos de microcirugía periapical, reparación de perforaciones, apexificación y recubrimientos pulpaes. En los cuales se ha demostrado la efectividad del MTA en el uso clínico (11).

2.1.2.2.1. Características generales

El MTA es un polvo de partículas finas hidrofílicas que fraguan en presencia de humedad. La hidratación del polvo genera un gel coloidal que forma una estructura dura. El material MTA está compuesto principalmente por partículas de: Silicato tricálcico, Silicato dicálcico, Aluminato férrico tetracálcico, Sulfato de calcio dihidratado, Óxido tricálcico y Óxido de silicato, además, de una pequeña cantidad de óxidos minerales, responsables de las propiedades físicas y químicas de este agregado. Se le ha adicionado también óxido de bismuto que le proporciona la radio opacidad (12).

2.1.2.2.2. Presentaciones

El MTA tiene una presentación comercial en sobres herméticamente sellados que contienen el polvo del MTA y agua estéril. Debe prepararse inmediatamente antes de su utilización. El polvo se mezcla con agua estéril en una proporción 3:1 en una loseta de vidrio para dar una consistencia que sea manejable; Una vez el material tenga una consistencia adecuada, éste puede ser aplicado usando un transportador o porta-amalgamas pequeño. El MTA requiere para su fraguado la presencia de humedad. Se puede condensar por medio de una bolita de algodón húmeda, una punta de papel o un atacador pequeño.. Otra presentación es el MTA Flow (Ultradent, Products Inc.) el cual está diseñado para mezclarse de forma rápida y fácil en la consistencia adecuada para una variedad de procedimientos. Además, se puede administrar utilizando jeringas y puntas, asegurando una colocación precisa. Éste material, posee las siguientes características:

- Presenta propiedades bioactivas
- Puede ser preparado en tres consistencias: masilla, espesa y ligera.
- Conformado por un polvo de grano ultrafino y un gel patentado
- Resiste el lavado
- Fragua rápidamente
- Tiene una proporción de mezcla adaptable según el procedimiento

El MTA Flow al ser un material bioactivo, promueve la reparación ya que libera hidróxido de calcio, cuando fragua y cuando éste reacciona con los fluidos tisulares, se forma una capa de fosfato de calcio. Esta capa es reconocida por el cuerpo como hidroxapatita (13).

2.1.2.2.3. Mecanismo de acción y propiedades

El MTA tiene las características de un material bioactivo, como la capacidad de formar una capa parecida a la apatita en su superficie cuando entra en contacto con fluidos fisiológicos *in vivo* o con fluidos corporales simulados *in vitro*. La

formación de apatita es una característica común de los biomateriales que contienen silicato de calcio.

Las investigaciones han demostrado que puede conducir e inducir la formación de tejido duro. A través de la liberación de varios iones, cuando se almacena en medios líquidos; algunos de los iones que libera son: calcio, sílice, bismuto, hierro, aluminio y magnesio. Muchos estudios en animales que han analizado la estructura de tejido duro formada entre la interfaz pulpa-MTA han mostrado la presencia de fósforo y calcio, los componentes principales de la hidroxiapatita. Los estudios han demostrado que la colocación de MTA en el tejido pulpar provoca la proliferación, la migración y la diferenciación de las células odontoblasticas que producen una matriz de colágeno. La matriz formada se mineraliza y produce osteodentina inicialmente y es seguida por una formación de puente dentinario (14).

El MTA tiene varias propiedades deseables como biocompatibilidad, bioactividad, hidrofiliidad, radiopacidad, capacidad de sellado y baja solubilidad. Las características principales son la biocompatibilidad y capacidad de sellado. La alta biocompatibilidad promueve la respuesta en cuanto a la reparación de tejidos. Esto se ha observado histológicamente con la formación de nuevo cemento en el área de los tejidos perirradiculares y una baja respuesta inflamatoria con la formación de puentes en el espacio pulpar. El sellado logrado se debe a su expansión y propiedades de contracción muy similares a la dentina que da como resultado una alta resistencia a las filtraciones marginales y a la migración bacteriana al sistema de conductos radiculares. Esto es un factor clave que facilita el éxito clínico. (11)

El MTA es considerado un excelente material. Sin embargo, se busca mejorar sus características y propiedades como inducir la formación del puente dentinario en menor tiempo. Al ser hidráulico y requerir agua para su activación y fraguado, puede ser posible utilizar compuestos biológicamente activos combinándolos con el agua usada en la mezcla; esto permitiría explorar la liberación de los compuestos, así como los efectos pro-odontogénicos que probablemente puedan potenciar a los del MTA para inducir la diferenciación odontogénica y la formación de la dentina de reparación con la consecuente mejora de los resultados clínicos.

No obstante, varios sistemas de administración de fármacos para el recubrimiento pulpar directo requiere investigación adicional. Estos resultados sugieren la viabilidad de inducir la formación de dentina reparadora usando compuestos bioactivos en conjunción con MTA como un material de recubrimiento pulpar directo (1). Un ejemplo de estos compuestos bioactivos es la metformina.

2.1.2.3. Metformina

Los materiales con los que disponemos actualmente para realizar el tratamiento de recubrimiento pulpar directo, presentan ventajas y desventajas, lo cual genera la necesidad de hacer uso de otros materiales mejorados con ciertas ventajas sobre los que se han utilizado a lo largo de los años, un ejemplo de estos nuevos

materiales son compuestos biológicamente activos como fenamilo, purmorfamina, genisteína y metformina, de los cuales se tiene poca información en su uso para realizar recubrimiento pulpar directo (1).

La metformina (dimetilbiguanida) es un fármaco administrado por vía oral para disminuir las concentraciones de glucosa en sangre en pacientes con diabetes mellitus no insulino-dependiente (NIDDM), mejorando la sensibilidad a la insulina y, por tanto, disminuye la resistencia a la insulina que es prevalente en NIDDM. La eficacia del control glucémico logrado con metformina es similar a la obtenida con sulfonilureas, aunque sus modos de acción difieren. La metformina se puede utilizar como terapia inicial o como fármaco adicional cuando la terapia con sulfonilurea sola es inadecuada (15).

La historia de las biguanidas se remonta al uso de *Galega officinalis* (cabra-rue o lila francesa) como tratamiento para la diabetes en la Europa medieval. La guanidina, componente activo de galega, se utilizó para sintetizar varios compuestos hipoglucemiantes en la década de 1920, y la metformina y la fenformina son dos biguanidas, que se introdujeron a finales de los años cincuenta.

En los pacientes con NIDDM, el efecto reductor de la glucosa que produce la metformina se atribuye principalmente a la disminución de la producción de glucosa hepática y a la mejora de la captación periférica de glucosa. Otras acciones pueden contribuir, como el aumento del uso intestinal de glucosa y la disminución de la oxidación de ácidos grasos.

La metformina incrementa la translocación de los transportadores de glucosa (isoformas GLUT-1 y GLUT-4) en diferentes tipos celulares, e impide la resistencia a la insulina en hepatocitos y adipocitos que en investigaciones son expuestos durante largos periodos a altas concentraciones de insulina.

La metformina mejora la tolerancia oral a la glucosa, mientras que la respuesta plasmática a la glucosa no se modifica o puede disminuir en pacientes con hiperinsulinemia (15).

En estudios previos se reportó que la metformina ejerce efectos antiinflamatorios más allá de su función en el metabolismo de la glucosa. En el que al fármaco se le ha implicado en:

1. La reducción de la liberación inducida por interleucina-1beta (IL-1b) de las citoquinas inflamatorias IL-6 e IL-8 en: a) células endoteliales, b) células de músculo liso (CML) y c) macrófagos. También afecta la activación nuclear del factor kappa B (NF-kB) en las SMC vasculares.
2. Inhibe la producción del factor de necrosis tumoral (FNT) y del factor tisular (FT) en los monocitos humanos. Además de sus propiedades antiinflamatorias, varios estudios han informado de los efectos positivos de

este agente sobre el metabolismo óseo, determinado por el aumento de la producción de colágeno tipo 1.

3. Aumenta significativamente la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) y la producción de osteocalcina (OC) e induce 2 factores claves de transcripción para la diferenciación osteoblástica. Inhibe la pérdida ósea en la periodontitis crónica mediante la promoción de la diferenciación osteoblástica (1).

Por otro lado, los odontoblastos secretan varias proteínas colágenas y no colágenas, como colágeno tipo 1, osteopontina, proteína 1 de la matriz de la dentina (DMP-1) y sialofosfoproteína de la dentina (DSPP), que son marcadores biológicos únicos para la diferenciación celular de la pulpa dental (CPD)(DPC) odontoblasto/osteoblasto. Las CPD (células madre multipotenciales) son potencialmente superiores a otras células madre para aplicaciones de medicina regenerativa, incluida la ingeniería de tejidos óseos. Por lo tanto, se considera que son prometedoras para la reparación/regeneración dental.

La activación de la protein-quinasa (AMPK) inducida por metformina aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), la expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de ALP e induce un proceso de mineralización. Por lo tanto, para comprender si la metformina influye en la diferenciación odontoblástica de células madre de la pulpa (CPD), se realizó un ensayo de actividad de ALP, en el que se encontró un aumento significativamente en el grupo tratado con metformina en el día 14, cuando era más de 2 veces más alto que en el grupo control. El tratamiento de CPD con la metformina aumentó la formación de nódulos mineralizados y el contenido de calcio. Estos resultados son efectos secundarios de la metformina en la maduración odontoblástica de CPD que se encuentra mediado por la activación de la vía de señalización AMPK

La metformina desencadena diferenciación odontoblástica CPD en una forma dependiente de AMPK, regula notablemente la expresión de ARNm de genes odontoblásticos críticos, incluidos sialoproteína dentinaria (SPD), fosfoproteína de matriz dentinaria ácida -1(DMP-1), factor de transcripción relacionado con Runt- 2 (Runx2) y ARNm de osteocalcina (OCN). Estos resultados indican además que AMPK es un factor de mediación clave para controlar la diferenciación odontoblástica inducida por metformina de CPD

Los autores concluyen a partir de los resultados obtenidos que la vía de señalización de AMPK controla en parte los efectos de la metformina sobre la diferenciación odontoblástica de las CPD (25).

La formación de dentina reparativa es inducida por células madre de pulpa dental de tipo odontoblasto (DPSCs), y esto ocurre cuando las capas de odontoblastos existentes se rompen durante la remoción profunda de caries. Por lo tanto, los

compuestos bioactivos como la metformina pueden ofrecer usos terapéuticos potenciales como materiales de recubrimiento pulpar mediante la regeneración de la dentina.

2.1.3. Geles

(47)

Hablando acerca de las características fenomenológicas de los geles, incluyen las siguientes:

1. Son sistemas dispersos coloides coherentes de al menos dos componentes.
2. Exhiben propiedades mecánicas (tenacidad, dureza, plasticidad, ductilidad, maleabilidad, elasticidad, entre otras.) características del estado sólido
3. Tanto el componente dispersado como el medio de dispersión se extienden de manera continua por todo el sistema (47).

Continuando con las características que poseen los geles, Sámano et al. en el 2014 menciona que los hidrogeles presentan varias características como alta permeabilidad al vapor de agua y oxígeno, así como propiedades mecánicas que se asemejan a los tejidos blandos fisiológicos (42).

Ahmed en el 2015 en su estudio describe a los geles como una red polimérica reticulada e hinchada en agua producida por la reacción simple de uno o más monómeros. Hace hincapié en que se han estudiado debido a su desempeño excepcional tienen una amplia gama de aplicaciones y que poseen también un grado de flexibilidad muy similar al tejido natural debido a su gran contenido de agua (50).

Además, menciona en su investigación, los materiales de los cuales pueden estar formulados los geles. Éstos se pueden sintetizar a partir de componentes puramente sintéticos. Recientemente, se han definido como sistemas de dos o varios componentes que consisten en una red tridimensional de cadenas de polímeros y agua que llena el espacio entre las macromoléculas.

Hace mención de una clasificación de los geles conforme a los materiales con los que se producen:

Clasificación basada en la fuente

Pueden clasificarse en dos grupos según su origen natural o sintético.

Clasificación basada en la configuración

Depende de su estructura física y la composición química se puede clasificar de la siguiente manera:

- (a) Amorfo (no cristalino).
- (b) Semicristalino: una mezcla compleja de amorfo y fases cristalinas
- (c) Cristalino.

Clasificación basada en la apariencia física.

La apariencia de los hidrogeles como matriz, película o microesfera depende sobre la técnica de polimerización involucrada en su preparación.

Clasificación según la carga eléctrica de la red.

Pueden clasificarse en cuatro grupos en función de la presencia o ausencia de carga eléctrica ubicada en las cadenas reticuladas:

- (a) No iónico (neutral).
- (b) Iónico (incluso aniónico o catiónico).
- (c) Electrolito anfótero (anfólito) que contiene grupos ácidos y básicos.
- (d) Zwitteriónico (polbetaínas) que contienen grupos aniónicos y catiónicos en cada unidad estructural de repetición.

Hablando como tal de los materiales, menciona que los polímeros naturales formadores de hidrogel incluyen proteínas como el colágeno y la gelatina y polisacáridos como el almidón, el alginato y la agarosa. Los polímeros sintéticos que forman hidrogeles se preparan tradicionalmente utilizando métodos de polimerización química.

Mientras que los hidrogeles generalmente se preparan a base de monómeros hidrófilos, los monómeros hidrófobos a veces se usan en la preparación de hidrogeles para regular las propiedades para aplicaciones específicas.

En general, los hidrogeles pueden prepararse a partir de polímeros sintéticos o polímeros naturales. Los polímeros sintéticos son de naturaleza hidrófoba y químicamente más fuertes en comparación con los polímeros naturales. Su resistencia mecánica da como resultado una tasa de degradación lenta, por otro lado, la resistencia mecánica también proporciona la durabilidad. Estas dos propiedades opuestas deben equilibrarse mediante un diseño óptimo. Además, se puede aplicar a la preparación de hidrogeles a base de polímeros naturales, siempre que estos polímeros tengan grupos funcionales adecuados o se hayan funcionalizado con grupos radicalmente polimerizables.

La preparación de hidrogel a base de acrilamida, ácido acrílico y sus sales mediante polimerización en suspensión inversa y polimerización en solución diluida se ha reportado en otras investigaciones.

Se han realizado menos estudios sobre la polimerización en solución altamente concentrada de monómeros acrílicos, que en su mayoría están patentados. Chen realizó un superabsorbente de acrilato de sodio y ácido acrílico a través de una polimerización en solución concentrada (43,6% en peso) usando persulfato de potasio como iniciador térmico.

Existen muchos tipos de hidrogeles; en su mayoría, son copolímeros ligeramente reticulados de acrilato y ácido acrílico, y polímeros de ácido de almidón-acrílico injertados preparados por suspensión inversa, polimerización en emulsión y polimerización en solución (48).

Enfocándonos en el quitosán o quitosano, ya que fue de los materiales principales empleados en la formulación de los geles para la presente investigación, es el principal derivado de la quitina, (polímero natural que se encuentra en los exoesqueletos de insectos y crustáceos, así como también en las paredes celulares de algunos hongos, levaduras y algas) de ella se obtiene el quitosán mediante un proceso de desacetilación. Es un amino-polisacárido compuesto principalmente de unidades repetitivas de 2- amino-2-desoxi- β -D-Glucopiranosas.

Como polímero natural tiene un gran potencial en diferentes aplicaciones, por ejemplo, en el área de la salud se utiliza en la liberación de medicamentos, injertos, refuerzo de uñas y huesos, sutura absorbible y apósito para heridas. Adicionalmente este polisacárido no es tóxico, ni alergénico, y afortunadamente es biocompatible y bioactivo, convirtiéndolo en una sustancia ideal para diversas áreas como: farmacéuticos y médicos,, donde es usado, como se mencionó anteriormente, en sistemas de liberación controlada de medicamentos y vacunas, principios activos.

Propiedades antimicrobianas. Es un biopolímero (amino-polisacárido) catiónico, y es precisamente la densidad de cargas positivas la que le confiere a éste sus propiedades antibacterianas y antimicóticas. Su actividad antimicrobiana es de amplio espectro y por lo tanto es capaz de actuar contra un número considerable de bacterias (Gram + y Gram -), hongos filamentosos y levaduras.

Actividad antimicótica. Suprime la esporulación, evitando la reproducción de los hongos. Esta característica se ve favorecida por valores bajos de pH.

Queda establecido entonces, que el quitosán es un polielectrolito en soluciones ácidas, y que su densidad de carga a lo largo de su cadena aumenta con el incremento del grado de desacetilación, por lo que se espera una mayor viscosidad intrínseca. Su estructura química lo convierte en un biopolímero con un amplio rango de aplicaciones, que vislumbran un panorama de nuevos desarrollos científicos (49,51).

2.1.4. Métodos para realizar la caracterización de geles

Dentro de las diversas investigaciones (30, 31, 32, 33) sobre geles se reportan diferentes métodos de caracterización como:

1. Pruebas reológicas
2. Microscopía óptica
3. Pruebas de pH
4. Pruebas de termosensibilidad
5. Pruebas de estabilidad
6. Pruebas electroforéticas
7. FT/IR
8. Microscopía Electrónica de Barrido

Utilizando equipos como viscosímetro, potenciómetro, microscopio óptico, espectrómetro. Mas adelante se hablará de los equipos utilizados en esta investigación.

2.1.5. Descripción de métodos de caracterización

En la presente investigación se emplearon las siguientes pruebas:

2.1.5.1. Medición de pH

El potenciómetro cumple la función de determinar el nivel de acidez o alcalinidad de compuestos a partir de la concentración molar de protones o potencial de hidrógeno.

A partir del estudio del comportamiento de sustancias, se creó una escala de medición de la acidez o alcalinidad de las mismas, que va desde 0 hasta 14 correspondiendo los valores menores de 7 a la acidez y los mayores de 7 a la alcalinidad, siendo en este caso el 7 un valor que corresponde a un pH neutro.

Desde la antigüedad se ha tenido conocimiento de las propiedades de los ácidos y las bases, pero a partir de 1834 comenzaron los intentos por explicar su comportamiento y fue hasta 1920 que se define en bioquímica, bases y ácidos.

Johannes N. Brönsted y Thomas M. Lowry desarrollaron sus explicaciones basadas en el comportamiento del agua como sustancia ácida y alcalina con reactivos para análisis de agua. Posteriormente Gilbert N. Lewis profundizó en las características de estos compuestos. Lewis explicó que un ácido tiene las

propiedades de aceptar un par de electrones y una base tiene un par de electrones en uno de sus enlaces que puede ceder a otra molécula.

Dicha investigación realizada por Lewis permitió estudiar solventes que no necesariamente intercambian protones y que pueden actuar como base o ácido en diferentes solventes gracias a un comportamiento llamado disociación.

La disociación está relacionada con la capacidad de una sustancia de actuar como un ácido o una base dependiendo del pH de la solución en la que se encuentra, es decir, una sustancia puede donar protones comportándose como un ácido cuando se encuentra en un medio de acidez baja, o se puede comportar como una base y aceptar protones cuando el medio en el que se encuentra tiene un mayor grado de acidez (52).

2.1.5.2. Viscosidad

La viscosidad es la medida de la fricción interna de un fluido. Esta fricción se hace evidente cuando se hace que una capa de fluido se mueva en relación con otra capa. Cuanto mayor es la fricción, mayor es la cantidad de fuerza requerida para causar este movimiento, lo que se denomina “corte”. El corte se produce cuando el fluido se mueve o distribuye físicamente, como al verter, esparcir, pulverizar, mezclar, etc.

El proceso de selección de la aguja que se coloca en un viscosímetro y la velocidad de un fluido desconocido generalmente es prueba y error. Una selección apropiada resultará en mediciones entre 10% y 100% en la escala de torque del instrumento. Existen dos reglas generales que ayudan a elegir:

1. El rango de viscosidad es inversamente proporcional al tamaño de la aguja.
2. El rango de viscosidad es inversamente proporcional a la velocidad de rotación.

De esta forma, para medir una viscosidad alta, se requiere elegir una aguja pequeña y / o una velocidad lenta. Si la aguja / velocidad elegidos dan como resultado una lectura superior al 100%, se debe reducir la velocidad o elegir una aguja de menor tamaño.

Existe una clasificación para las muestras dependiendo de las características que presenten al momento de ser probadas, pueden ser:

Fluidos newtonianos

Este tipo de fluidos permanecerá constante, independientemente del modelo de viscosímetro, la aguja o la velocidad que utilice para medirlo.

Fluidos no newtonianos

Un fluido no newtoniano se define ampliamente como uno para el que la relación $\tau / \dot{\gamma}$ no es una constante (τ =fuerza del corte/ $\dot{\gamma}$ =velocidad del corte). La viscosidad de tales fluidos cambiará a medida que se varíe la velocidad de corte. Por lo tanto, los parámetros experimentales del modelo de viscosímetro, la aguja y la velocidad tienen un efecto en la viscosidad medida de un fluido no newtoniano. Esta viscosidad medida se denomina la "viscosidad aparente" del fluido y es precisa sólo cuando se suministran y respetan parámetros experimentales explícitos.

El fluido no newtoniano se puede imaginar pensando en cualquier fluido como una mezcla de moléculas con diferentes formas y tamaños. A medida que pasan uno junto al otro, como sucede durante el flujo, su tamaño, forma y cohesión determinarán cuánta fuerza se requiere para moverlos, por esto, a cada velocidad específica de corte, la alineación puede ser diferente y se puede requerir más o menos fuerza para mantener el movimiento.

Los tipos más comunes de fluidos no newtonianos que se pueden encontrar incluyen:

Pseudoplástico: Este tipo de fluido mostrará una viscosidad decreciente con una tasa de cizallamiento creciente. Probablemente el pseudoplástico más común de los fluidos no newtonianos incluye pinturas y emulsiones. Este tipo de comportamiento de flujo a veces se denomina "adelgazamiento por cizallamiento". Por lo tanto, la obstaculización de la rotación de la aguja disminuirá. Cuanto más rápida sea la rotación, más se destruye la estructura y cuanto menos se desliza la estructura de las moléculas juntas, menor será la viscosidad.

Dilatante: el aumento de la viscosidad con un aumento en la velocidad de cizallamiento caracteriza al fluido dilatante. Aunque es más raro que la pseudoplasticidad, la dilatación se observa con frecuencia en fluidos que contienen altos niveles de sólidos defloculados, como lodos de arcilla, caramelo, almidón de maíz en agua y mezclas de arena / agua. La dilatación también se conoce como flujo de "engrosamiento de corte"

Plástico: este tipo de fluido se comportará como un sólido en condiciones estáticas. Se debe aplicar una cierta cantidad de estrés al fluido antes de que se induzca cualquier flujo; este estrés se denomina "estrés de rendimiento" (τ_y) (53).

2.1.5.3. Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier

La Espectroscopia Infrarroja tiene su aplicación más inmediata en el análisis cualitativo y cuantitativo de los grupos funcionales presentes en el material. Las áreas de aplicación pueden ser: la determinación del progreso en la hidratación,

las reacciones con distintos aditivos, la cristalinidad de los productos de hidratación y la identificación de las distintas fases.

Es el método por el cual se estudia la absorción o emisión de energía radiante originada por la interacción entre la radiación electromagnética y el material en estudio. La FTIR se basa en que las moléculas tienen la posibilidad de rotar y vibrar a distintas frecuencias (modos normales vibracionales). O sea que, una molécula puede absorber la energía de fotones en el rango energético de FTIR en el caso en que exista una diferencia en el momento bipolar de la molécula mientras ocurre un movimiento vibracional rotacional y cuando la frecuencia asociada con la radiación resuena con el movimiento vibracional.

Los componentes de los enlaces químicos tienen movimientos vibracionales con frecuencias naturales dentro del rango de frecuencias del infrarrojo: a) lejano: 10 a 650 cm^{-1} , b) medio (FTIR): 650 a 4000 cm^{-1} y c) próximo: 4000 a 12500 cm^{-1} .

Existen modos vibracionales que inducen oscilaciones que pueden entrar en resonancia con un haz de IR. Esto produce un intercambio de energía entre el haz y las moléculas constituyentes. Existe un comportamiento característico para un enlace con un tipo atómico, un entorno químico y una concentración de enlaces determinadas. Se puede decir entonces, que en un espectro infrarrojo se pueden manifestar bandas asociadas a prácticamente todos los compuestos moleculares. Cada una de estas bandas correspondería a un movimiento de vibración de uno de los enlaces dentro de la molécula. Se sostiene entonces que el conjunto constituye la huella dactilar del compuesto. Cada compuesto tendrá entonces un comportamiento particular frente a un haz de infrarrojos, en esto se basa la eficacia de la IR (54).

2.1.5.4. Microscopía óptica

Es el conjunto de técnicas y métodos destinados a hacer visible los objetos de estudio que por su pequeñez están fuera del rango de resolución del ojo normal humano.

Antonie van Leeuwenhoek, un vendedor de telas, logró fabricar lentes lo suficientemente poderosas como para observar bacterias, hongos y protozoos, a los que llamó "animáculos".

El primer microscopio compuesto fue desarrollado por Zacharias Janssen. A partir de éste, los avances tecnológicos permitieron llegar a los modernos microscopios de nuestro tiempo, los que existen de varios tipos y son usados con diferentes fines. Posteriormente Robert Hooke perfecciona el microscopio; Hooke utiliza un microscopio compuesto para estudiar cortes de corcho y describe los pequeños poros en forma de caja, a los que él llamó "células". Publica su libro *Micrographia*.

La microscopía óptica consiste en hacer pasar luz visible de una fuente a través de lentes ópticos simples o múltiples, para lograr una vista ampliada de la muestra (55).

2.1.6. Instrumentos para pruebas de caracterización en geles

A continuación, se hablará acerca de las características del equipo utilizado en el presente proyecto de investigación para cada una de las pruebas de caracterización:

2.1.6.1. El potenciómetro

El equipo El potenciómetro Orion 4-Star proporciona las mediciones de parámetros duales de pH / oxígeno disuelto, pH / conductividad, pH / ISE (electrodo selectivo de iones) así como oxígeno disuelto óptico de pH / RDO. Incluye una función de medición de temperatura y se controla mediante un microprocesador, lo que ayuda a la entrega de mediciones precisas. Además, posee las siguientes características:

- La pantalla LCD retro iluminada muestra las mediciones de temperatura con pH, mV o ISE
- Las funciones Thermo Scientific Orion SMART STABILITY y SMART AVERAGING proporcionan exactitud optimizada automática, precisión y tiempo de respuesta Capacidad de calibración de temperatura
- Calibración de pH hasta de 5 puntos con alarma de calibración y buffer automático con reconocimiento de buffers USA, NIST y DIN
- Pendiente promedio y pendiente de segmento impreso con las mediciones
- Puerto RS232 para extracción de datos y comunicación de software (56).

2.1.6.2. El viscosímetro

El aparato utilizado en esta investigación fue el Brookfield DV1 VISCOMETER el cual se introdujo en 1981. Con este instrumento se logró conocer la viscosidad del gel de quitosán. La viscosidad es la medición de la resistencia de un fluido al flujo.

Este viscosímetro pertenece a la variedad rotacional. Mide el torque requerido para rotar un elemento sumergido (aguja) en un fluido. La aguja es accionada por un motor a través de un resorte calibrado; la desviación del resorte se indica mediante un puntero y un dial (o una pantalla digital). Al utilizar una transmisión de velocidad múltiple y agujas intercambiables, se puede medir una variedad de rangos de viscosidad. Para una viscosidad dada, el arrastre viscoso, o la resistencia al flujo (indicado por el grado de enrollamiento del resorte), es proporcional a la velocidad de rotación de la aguja y está relacionado con el tamaño y la forma (geometría) de la misma. El arrastre aumentará a medida que aumente el tamaño de la aguja y / o la velocidad de rotación. De ello se deduce que, para una geometría y velocidad de aguja dada, un aumento en la viscosidad

se indicará por un aumento en la deflexión del resorte. Para cualquier modelo de viscosímetro, el rango mínimo se obtiene utilizando el eje más grande en la velocidad más alta y el rango máximo utilizando el eje más pequeño a la velocidad más lenta. Las mediciones realizadas con la misma aguja a diferentes velocidades se utilizan para detectar y evaluar las propiedades reológicas del fluido de prueba (57).

2.1.6.3. El espectrómetro Bruker Vertex 70

Este instrumento está equipado con una serie de características como AAR (Reconocimiento Automático de Accesorios) ACR (Reconocimiento Automático de Componentes) y PerformanceGuard que facilitan la realización de mediciones espectroscópicas y aseguran resultados de medición confiables. La función AAR identifica automáticamente el accesorio de tipo QuickLock instalado en el compartimiento de muestra, realiza varias pruebas y carga automáticamente el archivo experimental correspondiente, incluidos los parámetros de medición predefinidos. La función ACR reconoce automáticamente los componentes ópticos instalados actualmente como fuente, detector y divisor de haz. Estos componentes están codificados electrónicamente para que el firmware del espectrómetro pueda reconocerlos. Esta información se transmite al software de aplicación OPUS. El propósito de ACR es permitir al usuario seleccionar los parámetros ópticos correctos en OPUS. Además, los componentes del espectrómetro se monitorean permanentemente para garantizar que funcionen dentro del rango de especificación. Esta característica se llama Performance Guard. Su finalidad es facilitar el diagnóstico y mantenimiento de fallas.

La adquisición de datos se basa en un convertidor A / D de doble canal delta-sigma de funcionamiento libre con rango dinámico de 24 bits. El convertidor A / D está integrado en la electrónica del preamplificador del detector. La tecnología DigiText garantiza una transmisión de señal libre de interferencias y garantiza la mayor relación señal / ruido (58).

2.1.6.4. El microscopio Axio Scope A1 ZEISS

Este es un microscopio universal diseñado especialmente para aplicaciones en campos médicos y biológicos y para estudios de materiales. Dependiendo de la configuración del soporte del microscopio, se pueden usar solo con luz de cabeza o transmitida o con una combinación de ambos.

Se puede utilizar en campos de aplicación biomédicos, tales como:

- Exámenes médicos en laboratorios (investigación), hospitales, consultorios médicos.
- Docencia y ciencia (universidades, facultades e institutos).
- Aplicaciones industriales (la industria farmoquímica, farmacéutica en el área tecnología alimentos).

- Laboratorios metalográficos.
- Industria automotriz..
- Tecnología de microsistemas.

Dependiendo de los accesorios para cada instrumento, se pueden realizar los siguientes métodos de microscopía y contraste:

Luz transmitida

- Campo brillante (H)
- Campo oscuro (D)
- Contraste de fase (Ph)
- Contraste por interferencia diferencial (DIC)
- Polarización (Pol)

Luz reflejada

- Campo brillante (H)
- Campo oscuro (D)
- Contraste por interferencia diferencial (DIC)
- Fluorescencia
- Polarización (Pol) (59)

2.2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Tradicionalmente el recubrimiento pulpar directo se ha llevado a cabo con hidróxido de calcio debido a su pH alcalino y propiedades antibacterianas. Sin embargo, este material tiene inconvenientes conocidos tales como provocar necrosis en el tejido pulpar, alta solubilidad y microfiltración a lo largo del tiempo. Por lo tanto, se ha sugerido el uso de agregado de trióxido mineral (MTA) como material de elección de recubrimiento pulpar directo, por la biocompatibilidad, capacidad para formar puentes de dentina más gruesos y menores tasas de necrosis de la pulpa. Este material también tiene sus desventajas incluyendo el potencial para decolorar los dientes, tiempo de fraguado largo y propiedades de manejo desafiantes.

Medeiros et al. en 2001 realizó exposiciones pulpares y recubrimiento pulpar directo en perros, utilizando MTA e Hidróxido de calcio. Después de un periodo post-operatorio de 60 días, los animales se les aplicó eutanasia para evitar el sufrimiento animal a través de una sobredosis anestésica. Les extrajeron los dientes, se fijaron en solución de formalina al 10% y se descalcificaron en ácido

fórmico y citrato sódico. Los especímenes fueron embebidos en parafina, seccionados en serie a un espesor de 6 µm, fueron teñidos con a través de la técnica de Brown-Brenn (hematoxilina y eosina) .

Los resultados fueron evaluados de acuerdo a puntuaciones de 1 a 4, siendo 1 el mejor resultado y 4 el peor resultado.

Sudsiguientemente, evaluaron los siguientes aspectos:

Puente de tejido mineralizado en cuanto a su continuidad, morfología, espesor (evaluado con un ocular micrométrico en tres puntos diferentes del puente), localización, tejido pulpar, intensidad de la reacción inflamatoria (evaluados en diferentes lugares con un aumento de 400X), la extensión de la reacción inflamatoria, estado general de la pulpa, las células gigantes observadas y partículas del material de recubrimiento y por último la presencia de microorganismos (16).

En otra investigación de Medeiros et al. en 2001 donde utilizaron MTA blanco para realizar recubrimiento pulpar directo, observaron la formación de puente de tejido mineralizado en todos los especímenes, sin formación de zona necrótica superficial; ellos observaron algunas diferencias morfológicas de puentes dentinarios obtenidos por MTA blanco y gris. En algunos casos, no hubo dentina tubular, sino sólo una estructura que selló la exposición de la pulpa. Se observaron algunos defectos en el tejido, pero se restringieron a la porción más cercana al material. También descubrieron que el mecanismo de acción del MTA blanco es muy similar al MTA gris y que, durante su manipulación, el tiempo de fraguado del MTA gris era menor que el del MTA blanco. En conclusión, los resultados observados y el mecanismo de acción del MTA blanco fueron muy similares a los reportados para MTA gris. Teniendo en cuenta estos resultados, se cree que el MTA blanco puede considerarse como un material eficaz para el recubrimiento pulpar (16)

En el estudio de Aeinehchi et al. en 2002 compararon el uso de Ca(OH)_2 y MTA como recubrimiento pulpar directo, midieron la formación de un puente dentinario mediante cortes histológicos y los resultados que obtuvieron fueron los siguientes:

Muestras con MTA: En una semana no se formó puente y se observó inflamación leve y crónica en el sitio de exposición más hiperemia leve y necrosis. A los dos meses, se encontraron puentes de dentina con un grosor máximo de 0.25 mm con inflamación crónica leve subyacente. A los tres meses se registraron puentes dentinarios de espesor máximo de 0.28 mm y odontoblastos. En todas las muestras, inflamación e hiperemia leves, en una muestra se encontró necrosis debajo del puente. A los cuatro meses, se observaron puentes dentinarios de 0.37 mm de espesor, sin hiperemia, necrosis ó calcificación. Por último a los seis meses se observó un puente dentinario de 0.43 mm de espesor y una capa

odontoblástica casi regular. No se registró ninguna alteración, necrosis o calcificaciones.

Muestras con hidróxido de calcio: a la semana no hubo puentes dentinarios. A los dos meses no se formaron puentes dentinarios y predominaron la inflamación aguda y crónica, hiperemia y calcificaciones. A los tres meses se encontró un cuadro inflamatorio moderado, hiperemia leve y necrosis; se formó un puente irregular de 0.02 mm de espesor máximo y no se observaron calcificaciones ni capas odontoblásticas. A los cuatro meses se formó un puente de un espesor máximo de 0.04 mm con linfocitos dominantes en zona inflamatoria e hiperemia leve por debajo; no se encontraron calcificaciones ni capa odontoblástica. A los seis meses se observó calcificación y necrosis debajo de un puente de un grosor máximo de 0.15 mm. No se mostró capa odontoblástica y los linfocitos dominaban en inflamación crónica e hiperemia severa (20).

Los autores concluyeron, al comparar hidróxido de calcio y MTA aplicados como recubrimiento pulpar directo, que el MTA forma puentes dentinarios de mejor calidad y en un tiempo más corto.

De esta forma podemos comprobar que la búsqueda de nuevos y mejores materiales dentales es indispensable. Es por eso que en la presente investigación se busca probar el efecto que tendrá la combinación de MTA, un material que al compararse con el material gold standard para recubrimientos pulpaes (hidróxido de calcio), es superior en muchos aspectos, junto con la metformina, un fármaco hipoglucemiante aprobado por la FDA que presenta las propiedades para inducir un proceso de mineralización en los tejidos.

Hablando específicamente de las características de la metformina, en el estudio realizado por Phung et al. 2017 fue probada en una concentración no citotóxica de 500 μ M y demostró tener propiedades proosteogénicas, indujo la mineralización de los tejidos y aumentó significativamente la expresión de fosfatasa alcalina, osteocalcina y sialoproteína ósea. También incrementó la translocación de las isoformas GLUT-1 y GLUT-4 de los transportadores de glucosa en diferentes tipos de células e impidió el desarrollo de resistencia a la insulina en hepatocitos cultivados y adipocitos expuestos durante largos periodos a altas concentraciones de insulina.

Con los resultados obtenidos por Phung et al 2017, se probó que con la metformina se produjo mineralización en 2 semanas con tan sólo 5 ng / mL. A las 3 semanas, todas las concentraciones probadas indujeron mineralización, obteniendo la mayor cantidad de mineralización con 10 ng/ mL. Por otro lado, el fenilamino y purmorfamina produjeron mineralización en 2 semanas en todas las concentraciones probadas. Se observaron patrones similares en la mineralización inducida por genisteína. Por lo que se concluye estos compuestos biológicamente activos (metformina, fenilamino, purmorfamina y gestaína) tienen un efecto mineralizante tanto en las células preosteoblásticas como en células

preodontoblásticas cuando se presentan a las células en concentraciones no citotóxicas (500 μ M) y que pueden inducir una diferenciación osteogénica y odontogénica (1).

En un estudio reciente de Houshmand et al. del 2018 en donde evaluaron el efecto de la metformina en la unión de células madre de pulpa dental humana (hDPSCs) y su proliferación y diferenciación osteogénica en gránulos bifásicos de hidroxiapatita / fosfato beta-tricálcico de fosfato de calcio bifásico macroporoso (MBCP), los autores concluyeron que, la metformina puede aumentar la adhesión y la proliferación de hDPSCs cultivadas en gránulos de MBCP bifásicos. Las condiciones de cultivo influyeron en la diferenciación osteogénica de hDPSCs (actividad de la fosfatasa alcalina). El análisis estadístico mostró que tanto el grupo como el tiempo ($p < 0,001$), así como su interacción ($p < 0,05$) tuvieron efectos significativos sobre la actividad de la fosfatasa alcalina en ambos medios de cultivo. En uno de los modelos de estudio que se utilizaron en esta investigación, medios osteogénicos, los grupos que contenían metformina (metformina y MBCP + metformina) mostraron una actividad de fosfatasa alcalina relativamente similar ($p = 0.609$) y sus valores fueron significativamente más altos que los otros dos grupos (control y MBCP; $p \leq 0.0016$). La diferencia entre los grupos control y MBCP no fue estadísticamente significativa ($p = 0.132$) (28).

Por otro lado, Qin et al. 2018, desarrollaron un sistema de administración de metformina con liberación controlada para promover la viabilidad celular y la diferenciación odontogénica de los DPC que favorecen la regeneración de la dentina. Se sintetizó cemento de fosfato de calcio (CPC) que contenía quitosán y metformina. Sembraron las células en el andamio, y la viabilidad y la proliferación se evaluaron en distintos intervalos de tiempo. Para el análisis de diferenciación osteogénica, se analizó la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), se tiñeron las células con rojo de alizarina y se evaluó la expresión de marcadores odontogénicos mediante PCR en tiempo real. Las células se mantuvieron viables y se unieron bien al andamio compuesto de CPC-quitosán. La adición de metformina al compuesto de CPC-quitosán no afectó adversamente la proliferación celular, en comparación con la del control de CPC. Los resultados revelaron que el compuesto de CPC-quitosán-metformina mejoró la diferenciación odontogénica de DPC, como lo demuestra la mayor actividad de ALP, la expresión elevada de marcadores odontoblásticos y la fuerte deposición de minerales. Estos resultados sugieren que este material tiene el potencial para aplicaciones de ingeniería de tejidos, incluida la regeneración de dentinaria.(34)

De igual forma, en un estudio reciente de Wang et al. 2019, prueban el uso de la metformina agregándola a la composición de una resina que formularon los investigadores. Dentro de los objetivos se encontraba utilizar la resina como una forma de transportador para la metformina y así, administrarla localmente para estimular las células dentales para la regeneración del tejido e investigar los efectos sobre la diferenciación odontogénica de las células madre de pulpa dental

(DPSC) y la síntesis de minerales. Midieron las expresiones de los genes de la sialofosfoproteína dentinaria (DSPP), matriz de dentina fosfoproteína 1 (DMP-1), fosfatasa alcalina (ALP) y factor de transcripción relacionado con la ruptura 2 (Runx2). Se determinaron la actividad de ALP y la tinción con rojo de alizarina (ARS) de la síntesis de minerales de DPS. Los resultados obtenidos fueron, DPSC en la resina que contiene metformina proliferaron adecuadamente (media $\pm$ DE; n = 6), y el número de células aumentó en 4 veces desde 1 a 14 días ($p > 0,1$). Las expresiones de los genes DSPP, ALP y DMP-1 de las DPSC en la resina de metformina fueron mucho más altas que las DPSC en la resina de control sin metformina ($p < 0.05$). La actividad de ALP del grupo de metformina fue 70% mayor que la de metformina a los 14 días ($p < 0,05$). La síntesis de minerales por DPSCs en resina que contiene metformina a los 21 días fue 9 veces más que sin metformina ($p < 0.05$). Por último mencionan que el impacto clínico de esta investigación es, como estudios previos lo comprueban (algunos ya mencionados en esta investigación), inducir la formación de dentina terciaria debido a todas las propiedades que posee la metformina, principalmente la función que ejerce al elevar la concentración de ALP, esto colocando dicho material en cavidades profundas, de esta forma la metformina ejercería su función mineralizante (35).

Una de las principales limitaciones del uso de estos compuestos en el recubrimiento pulpar directo es el modo de suministro. A nivel clínico, el prototipo de MTA es hidráulico, de tal manera que requiere agua para su activación y fraguado. Por lo tanto, sería posible mezclarlos; esto no sólo permitiría la liberación eficiente sino también proporcionaría los efectos pro-odontogénicos. Estos resultados sugieren la viabilidad de inducir la formación de dentina reparadora usando compuestos bioactivos en conjunción con MTA como un material para recubrimiento pulpar directo (1).

Es por esto que se han creado nuevas presentaciones de MTA, como MTA Flow, de la cual se hablará más adelante. Como ya se mencionó, un punto imprescindible a tomar en cuenta para la búsqueda de nuevos materiales, es su manipulación y administración. Por lo tanto, en la presente investigación se sugiere que una presentación en gel, sería la alternativa ideal para un material que será utilizado en un recubrimiento pulpar directo.

Se han realizado diversos estudios que evalúan las características de los geles de quitosán, principalmente se mencionarán los siguientes:

Senel et al. 2001 (30) evaluaron con diversas pruebas, geles de quitosán a los que les agregaron clorhexidina:

Capacidad de absorción de agua: encontraron que las geles tenían una alta capacidad de absorción de agua que mostraba una absorción del 180910% y la presencia de clorhexidina (Chx) no causó ningún cambio.

Para la prueba de viscosidad: se observó en las curvas de flujo que los geles de quitosán exhiben un flujo pseudoplástico y la viscosidad aumenta significativamente al aumentar la concentración de quitosán. La incorporación de Chx en los geles no cambió la viscosidad.

Por último, para la liberación in vitro del principio activo: la liberación máxima de Chx de los geles de quitosán ocurrió después de los 90 minutos. El aumento de la concentración de quitosán de 1 a 2% dio como resultado un aumento en la liberación de Chx ($p < 0.05$). Con la formulación de gel al 1%, se liberaron 88.95% y 77.99% de Chx después de 1.5 h desde las formulaciones que contenían 0.1 y 0.2% de Chx, respectivamente. Para geles de quitosán al 2%, el porcentaje de liberación fue de 93.92% y 92.95%, respectivamente. El cambio en la concentración de Chx (0.1 y 0.2%) no afectó el porcentaje liberado de formulaciones de gel de 1 y 2% ($p > 0.05$).

Por su parte, Yun Zhou 2008 (33), elaboraron geles de quitosán con diferentes pesos moleculares, una de las pruebas que realizaron para la caracterización fue FTIR. Como resultados obtuvieron que los espectros de los geles con diferentes pesos moleculares no mostraron diferencias significativas; hubo picos amino característicos de quitosán a 3420, 1655 y 1325 cm^{-1} , y los picos asignados a la estructura del sacárido fueron a 1152 cm^{-1} (estiramiento CAH), 1154 cm^{-1} (puente-O), y 1094 cm^{-1} (CAO). Estos resultados mostraron que las muestras de gel de quitosán obtenidas mediante hidrólisis con ácido acético no tuvieron cambios evidentes en sus valores de grado de desacetilación y estructuras moleculares.

Peluso Cid 2012 (32), quien determinó el pH de geles de quitosán observó que para geles puros (formulaciones # 1, # 6 y # 11 en este estudio), el pH aumenta a medida que las concentraciones de quitosán mucoadhesivo (CHT) varían de 1.0% a 3.0%. La adición de celecoxib (Cx) (formulaciones n° 2 y n° 7) a los geles de CHT al 1% o al 2% da como resultado valores de pH ligeramente más altos en comparación con los geles puros. No se observaron cambios significativos en los valores de pH en adiciones al 3% de CHT (# 12). En general, los geles que contienen 2% de Cx y Azona (Az) azitromicina (1% a 3%) mostraron un pH de alrededor de 4.6, 5.0 y 5.9, respectivamente, para concentraciones de CHT de 1.0%, 2.0% y 3.0%, lo que demuestra que la adición de Az no afecta significativamente los valores de pH de formulaciones que contienen diferentes concentraciones de CHT y Cx.

Hablando sobre el MTA Flow que es la presentación en gel del MTA, Gandolfi et al. en el 2013, realizaron un estudio comparando MTA Flow con otros selladores. Utilizaron 16 premolares unirradiculares, se instrumentaron con instrumentos rotatorios ProTaper, asignados al azar en dos grupos ($n = 8$) y se obturaron con Thermafil Obturators utilizando los selladores AH Plus o MTA Flow.

Obtuvieron resultados mediante Micro-CT que detectó espacios en la interfaz dentina-sellador en ambos grupos. Se detectaron volúmenes vacíos mayores de $10.21 \mu\text{m}^3$ con $1.35 \mu\text{m}$ de diámetro. Los tercios apicales tuvieron un volumen de vacío 3D significativamente menor ($P < 0.05$) que los tercios medio y coronal. El volumen vacío de 3D se redujo significativamente ($P < 0.05$) con el tiempo. El análisis ESEM-EDX reveló que el sellador MTA Flow creó una capa de apatita densa después de 7 días mientras que sólo se detectaron depósitos de fosfato de calcio escaso en AH Plus incluso después de 28 días (22).

Existen estudios en donde se utilizan geles para la liberación de fármacos, específicamente la metformina y a pesar de que se empleó en otra rama de la odontología, Pradeep et al. en el 2013 probó las propiedades de geles de metformina a distintas concentraciones de igual forma en el área de Periodoncia en pacientes fumadores. Los pacientes incluidos fueron 37 (múltiples sitios por paciente).

Todos los grupos mostraron una mejora en el índice de placa en sitios específicos y en la boca completa. El índice de sangrado modificado del surco en todos los grupos no mostró diferencias al inicio del estudio, pero disminuyó significativamente en los tres grupos de prueba (geles de metformina 0.5%, 1% y 1.5%) en comparación con el grupo placebo a los 3 y 6 meses ($P < 0.05$).

Los tres grupos de metformina mostraron una reducción significativamente mayor de la profundidad de bolsa y aumento de nivel de inserción a los 3 y 6 meses que el grupo placebo con $P < 0.05$. Además, los geles de metformina 1% y 1.5% mostraron una reducción significativamente mayor de profundidad de bolsa y aumento de nivel de inserción que el gel al 0.5% a los 3 y 6 meses.

Los resultados mostraron que la administración local de concentraciones variables de gel de metformina en bolsas periodontales estimuló un aumento significativo en la reducción de profundidad de bolsa y aumento en el nivel de inserción y mejoró la reducción de la profundidad de la profundidad del defecto intraóseo en comparación con el gel placebo en complemento con raspado y alisado radicular. Se encontró, como en el estudio mencionado anteriormente, que el gel de metformina al 1% junto con un raspado y alisado radicular proporciona una mejora máxima en los parámetros clínicos y radiológicos.

En otra investigación de Padreep et al. en el 2015 obtuvieron buenos resultados. Fue un estudio con 60 pacientes. Los tejidos blandos sanaron adecuadamente sin diferencias visuales significativas. En el intervalo de 6 meses se mostró una reducción significativa en los índices de placa de boca completa. El índice de sangrado modificado del surco en ambos grupos no mostró diferencias al inicio, pero disminuyó significativamente en el grupo de prueba (gel metformina 1%) en comparación con el grupo de placebo a los 3 meses ($P < 0.05$). El grupo de gel de metformina al 1% mostró una reducción de la bolsa y aumento de la inserción significativamente mayor a los 3 meses y 6 meses que el grupo placebo a $P < 0.05$.

Este grupo de investigadores concluyeron que, conforme a los resultados obtenidos, la administración local de gel de metformina al 1% en una bolsa periodontal en pacientes con periodontitis crónica con defectos intraóseos, estimuló una mejora significativa en los parámetros clínicos, como la profundidad de la bolsa y nivel de inserción y mejoró la reducción de la profundidad de defecto intraóseo en defectos óseos verticales en comparación con un gel placebo como complemento de raspado y alisado radicular. Se encontró que el gel de metformina al 1%, junto con un raspado y alisado radicular, mostraba una mejora en los parámetros clínicos y radiológicos (60).

Por otra parte, debido a los resultados obtenidos por Gandolfi et al. 2013 en su estudio sobre las propiedades de MTA Flow, una presentación de MTA en gel que puede combinarse con metformina y ya que no se encuentra disponible a la venta en México, surge la propuesta del presente proyecto de investigación de formular un gel que combine MTA con un compuesto bioactivo, metformina, ya que tanto podrían potencializarse las propiedades de ambos como asegurar que el material se administre de manera precisa en el sitio que se requiere para poder realizar un recubrimiento pulpar directo.

Por lo tanto, el uso de un gel que contenga una molécula bioactiva como la metformina en conjunción con un cemento hidráulico de silicato tricálcico como MTA, que propicien la estimulación y aceleren la formación de dentina reparativa al momento de utilizarse como agentes de recubrimiento pulpar directo, requiere de investigación adicional.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

El recubrimiento pulpar representa una alternativa y se considera un tratamiento conservador dentro del campo de la endodoncia como terapia previa al tratamiento de conductos. Para llevar a cabo este procedimiento existe una gran cantidad de materiales disponibles, sin embargo, siempre se busca la mejora de los resultados obtenidos a partir de estos materiales. Actualmente el material más utilizado es el hidróxido de calcio que presenta desventajas como baja capacidad de sellado, formación de dentina con defectos y la disolución con el paso del tiempo.

Recientemente se ha explorado el uso de moléculas biológicamente activas, como la metformina, para realizar recubrimiento pulpar directo, debido a que presentan propiedades que son favorables para la regeneración del tejido pulpar.(1) La literatura es escasa ya que se trata de una aplicación novedosa. Sin embargo, estas moléculas no se han probado directamente por no contar con un medio de transporte que permita su aplicación. Se ha sugerido su combinación con otros materiales como el MTA con la posibilidad de mejorar sus propiedades al utilizarse como recubrimiento pulpar.

Por lo que surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Qué características poseen los geles de metformina-MTA para ser utilizados como recubrimiento pulpar directo?

4. JUSTIFICACIÓN

Los beneficios del recubrimiento pulpar directo se centran en la preservación de la vitalidad de los órganos dentarios como primera opción antes de realizar el tratamiento de conductos. Existen diversos materiales disponibles que se utilizan para llevar a cabo el recubrimiento pulpar directo, en la actualidad se continúa investigando en esta área de la Endodoncia, ya que se han lanzado al mercado nuevos materiales con esta aplicación. En este caso se evaluará la utilización de una molécula biológicamente activa como la metformina por sí sola y en combinación con MTA, debido a que se ha reportado que esto podría potenciar sus propiedades y de esta forma continuar buscando la mejora de estos materiales. La metformina y MTA es una combinación novedosa con pocos reportes de su uso, por lo tanto, es importante realizar esta investigación que podría beneficiar al estomatólogo, al endodoncista y a los pacientes tratados, obteniendo una opción más de material a elegir para realizar recubrimiento pulpar directo. Con esto se busca que los clínicos recurran a tratamientos conservadores, que preserven la vitalidad de los órganos dentarios en los casos en los que sea posible y no tomar como primera opción el tratamiento de conductos.

5. HIPÓTESIS

- **Hi**
 - Los geles de metformina-MTA poseen las características adecuadas para ser utilizados como recubrimiento pulpar directo.
- **Ho**
 - Los geles de metformina-MTA no poseen las características adecuadas para ser utilizados como recubrimiento pulpar directo.

6. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar la preparación y caracterización de geles de metformina-MTA para ser utilizados como recubrimiento pulpar directo.

Objetivos específicos:

- Preparar gel de metformina-MTA
- Preparar gel de metformina
- Preparar gel de MTA
- Preparar gel de quitosán
- Caracterizar los geles de metformina-MTA, gel de metformina, gel de MTA y gel de quitosán a través de viscosímetro, potenciómetro, FT-IR y microscopía óptica.

- Determinar si los geles de metformina-MTA cumplen con las características adecuadas para ser utilizados como recubrimiento pulpar directo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño

In vitro, prospectivo, transversal. Descriptivo.

7.2 Población y muestra

Gel de metformina-MTA, gel de metformina, gel de MTA y gel de quitosán.

7.3. Criterios de selección

INCLUSIÓN	Geles formulados con los diferentes materiales: quitosán, MTA y metformina		
------------------	--	--	--

EXCLUSIÓN	Los geles que no posean la consistencia adecuada.	Los geles en donde no se incorpore correctamente el MTA.	Los geles en donde no se incorpore correctamente la metformina.
ELIMINACIÓN	Geles que cambien de coloración	Geles que no se mantengan estables	Geles que se evaporen.

7.4. Definición de variables y escala de medición

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Escala y categorías
Variable independiente			
Gel de metformina-MTA	Nuevo material que se realizó al combinar metformina con MTA	Se evaluaron las características del gel a través de medición de pH, espectroscopía infrarroja transformada de Fourier y microscopía óptica	Cualitativa. Descriptiva
Gel de metformina	Nuevo material que se obtiene a partir de una solución de metformina y quitosán	Se evaluaron las características del gel a través de medición de pH, espectroscopía infrarroja transformada de Fourier y microscopía óptica	Cualitativa. Descriptiva
Gel de MTA	Nuevo material el cual se formuló a base de MTA y quitosán	Se evaluaron las características del gel a través de medición de pH, espectroscopía infrarroja transformada de Fourier y microscopía óptica	Cualitativa. Descriptiva

Gel de quitosán	Material el cual se realizó a partir de la mezcla de ciertos materiales, los cuales se agregaron al quitosán	En esta muestra se realizaron todas las pruebas mencionadas además de someterla a una prueba de viscosidad.	Cualitativa. Descriptiva
Variable dependiente			
Medición de pH	Técnica que usa el potenciómetro para calcular la acidez o la alcalinidad de una solución.	Se realizó mediante el potenciómetro Orion 4 Star y tiras reactivas	Cualitativa Ordinal
Viscosidad	Es una medida de resistencia a las deformaciones graduales.	Se utilizó el viscosímetro Brookfield DV-1 Viscometer	Cuantitativa De razón
Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier	Interacción infrarroja con la materia	Las muestras de geles se evaluaron en el espectrómetro infrarrojo Bruker Vertex 70	Cualitativa Descriptiva
Microscopía óptica	Técnicas y métodos destinados a hacer visible los objetos microscópicos.	Las imágenes se obtuvieron con el microscopio óptico A1 Scope ZEISS	Cualitativa Descriptiva

7.5. Concordancia y fiabilidad

Se realizaron pruebas piloto para la preparación de los grupos de geles con diferentes combinaciones de las sustancias activas. Todos los equipos empleados para las pruebas de caracterización estaban calibrados y fueron manejados por un experto.

7.6. Ubicación espacio-temporal

Las pruebas realizadas en los geles se llevaron a cabo en el laboratorio de Biomateriales y laboratorio multidisciplinario de la Facultad de Estomatología de la

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, así como en la Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento (DITCO).

7.7. Procedimientos, técnicas y fuentes de recolección

7.7.1. Prueba de medición de pH de la solución de metformina

Se preparó una solución de metformina a una concentración de 50 mg/ml (0.05 gramos en 10 ml de agua) utilizando la metformina al 97% Sigma Aldrich y la prueba se realizó en el Laboratorio de Biomateriales de la Facultad de Estomatología BUAP, utilizando un potenciómetro, el primer paso a realizar es la calibración del mismo, colocándolo en Ftalato de potasio basado en pH 4 buffer (rojo), Fosfato a base de pH 7 buffer (amarillo) y Borato basado en borato pH 10 (azul) para posteriormente hacer la lectura de la solución madre de metformina.

a)



b)

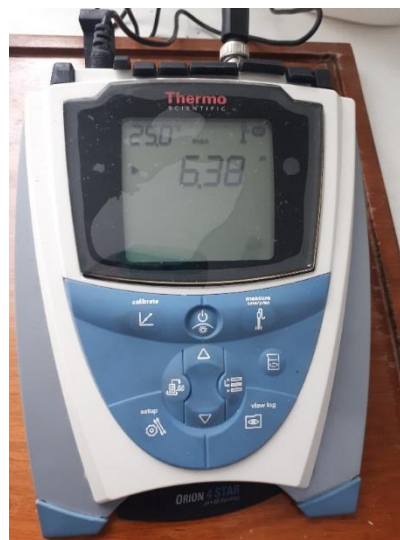


Fig. 1. Potenciómetro del laboratorio de materiales. a) Calibración previa para tomar pH. b) Medición del pH de la solución de metformina. Fuente propia.

7.7.2. Curva de calibración de la solución de metformina

La solución de metformina realizada previamente, se sometió a un barrido por medio de un espectrofotómetro UV-VIS, para determinar la longitud de onda a la cual se obtiene la mayor intensidad de absorbancia. A través de este barrido (233 nm) se realizó una curva de calibración con diluciones de la solución inicial de metformina.



Fig. 2. Espectrofotómetro del laboratorio

Se realizaron diluciones de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10,000. Se tomaron alícuotas para realizar las diluciones y se mezclaban con la parte correspondiente de agua bidestilada para colocarlas en la celda y así medir la absorbancia hasta obtener una absorbancia adecuada y registrar los resultados.

7.7.3. Preparación de geles

De acuerdo a la literatura revisada, se preparó una solución madre de 5 mg / ml de metformina disolviendo 50 mg en 10 ml de agua (23). Se realizaron, pruebas piloto utilizando cemento Portland Blanco como sustituto del MTA, quitosán y solución de metformina, para preparar los geles iniciales. De acuerdo a un procedimiento previamente publicado (24). En total se prepararon 4 geles y a continuación se describe la preparación de cada uno:

Gel quitosán

Se utilizaron los siguientes materiales:

- 1 volumen de quitosán 75% desacetilado Sigma Aldrich 0.0216 g
- 0.25 ml ácido acético al 99% JT Baker
- 0.5 ml agua bidestilada

Se trituró 1 volumen de quitosán en el mortero y se colocó en un vaso de precipitado. En otro vaso de precipitado se colocaron 0.25 ml de ácido acético y 0.5 ml de agua bidestilada. Posteriormente los elementos líquidos se incorporaron en el vaso de precipitado del quitosán y se incorporaron para formular el gel.

Gel metformina-MTA Blanco Angelus

- 1 volumen de quitosán 75% desacetilado Sigma Aldrich 0.0216 g
- 1 volumen de MTA Blanco Angelus 0.0709 g
- 0.25 ml ácido acético al 99% JT Baker
- 1 ml solución madre de metformina 97% Sigma Aldrich
- 0.5 ml agua bidestilada

Se trituraron en un mortero 1 volumen de quitosán y 1 volumen de MTA Blanco Angelus. Se mezclaron con 1 ml de solución de metformina en un vaso de precipitado y en otro vaso de precipitado se mezclaron 0.25 ml de ácido acético y

0.5 ml de agua bidestilada; ésta mezcla se incorporó a la metformina, quitosán y MTA Blanco Angelus y se obtuvo la consistencia de gel.

Gel metformina

- 1 volumen quitosán 75% desacetilado Sigma Aldrich 0.0216 g
- 1 ml solución madre de metformina 97% Sigma Aldrich
- 0.5 ml agua bidestilada
- 0.5 ml ácido acético 99% JT Baker

Se mezcló 1 ml de solución de metformina con 1 volumen de quitosán en un vaso de precipitado y en otro vaso se realiza la mezcla de 0.5 ml de agua bidestilada más 0.5 ml de ácido acético, del cual se toma 0.5 ml únicamente, el cual se incorpora a la mezcla de metformina con quitosán y se obtiene el gel de metformina.

Gel MTA Blanco Angelus

- 1 volumen quitosán 75% desacetilado Sigma Aldrich 0.0216 g
- 1 volumen MTA Blanco Angelus 0.0709 g
- 0.25 ml ácido acético 99% JT Baker
- 0.75 ml agua bidestilada (0.5 ml + 0.25 ml)

Se trituran en un mortero 1 volumen de quitosán y 1 volumen de MTA Blanco Angelus. En un vaso de precipitado se mezclan 0.25 ml de ácido acético y 0.5 ml de agua bidestilada. Posteriormente en otro vaso de precipitado se coloca el quitosán y MTA Blanco Angelus a los que se le agrega la mezcla de ácido acético y agua bidestilada, debido a que la consistencia podía mejorar se le agregaron 0.25 ml más de agua bidestilada con lo que se obtuvo la consistencia de gel deseada.

La búsqueda de la información para la investigación se realizó en artículos, libros y revistas indizadas con factor de impacto.

7.7.4. Pruebas de caracterización realizadas en los geles

Todas las pruebas de caracterización de los geles experimentales (gel quitosán, gel de metformina, gel de metformina-MTA y gel de MTA) se llevaron a cabo en la Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento, localizado en ciudad universitaria de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Medición de pH

Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Biomateriales de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Se utilizó el potenciómetro Orion 4 star de Thermo Electron corporation y tiras reactivas. El gel de quitosán se midió con el potenciómetro de la siguiente manera: se inició con una calibración utilizando las soluciones de Ftalato de potasio basado en pH 4 buffer (rojo), Fosfato a base de pH 7 buffer (amarillo) y Borato basado en pH 10 (azul) en el orden que se mencionan. Se realizaron mediciones de pH del gel de quitosán, gel de quitosán con cemento Portland blanco y del cemento Portland blanco con agua destilada.

Se realizó la medición del pH de los tres geles experimentales restantes (3 veces), utilizando tiras reactivas Macherey-Nagel. Art-Nr. 92110. pH-Fix 0-14. Se realizó una calibración previa de las tiras reactivas, colocándolas en solución buffer (Fosfato) pH 7 para compararla con la tabla de pH que contienen las tiras y que fuera correspondiente a dicho pH. La medición del pH se llevó a cabo colocando las muestras en la superficie de las tiras reactivas y se comparó con la imagen de referencia del paquete de tiras reactivas.



Fig. 3. Tiras reactivas Macherey- Nagel MN utilizadas para medición de pH. Fuente propia.

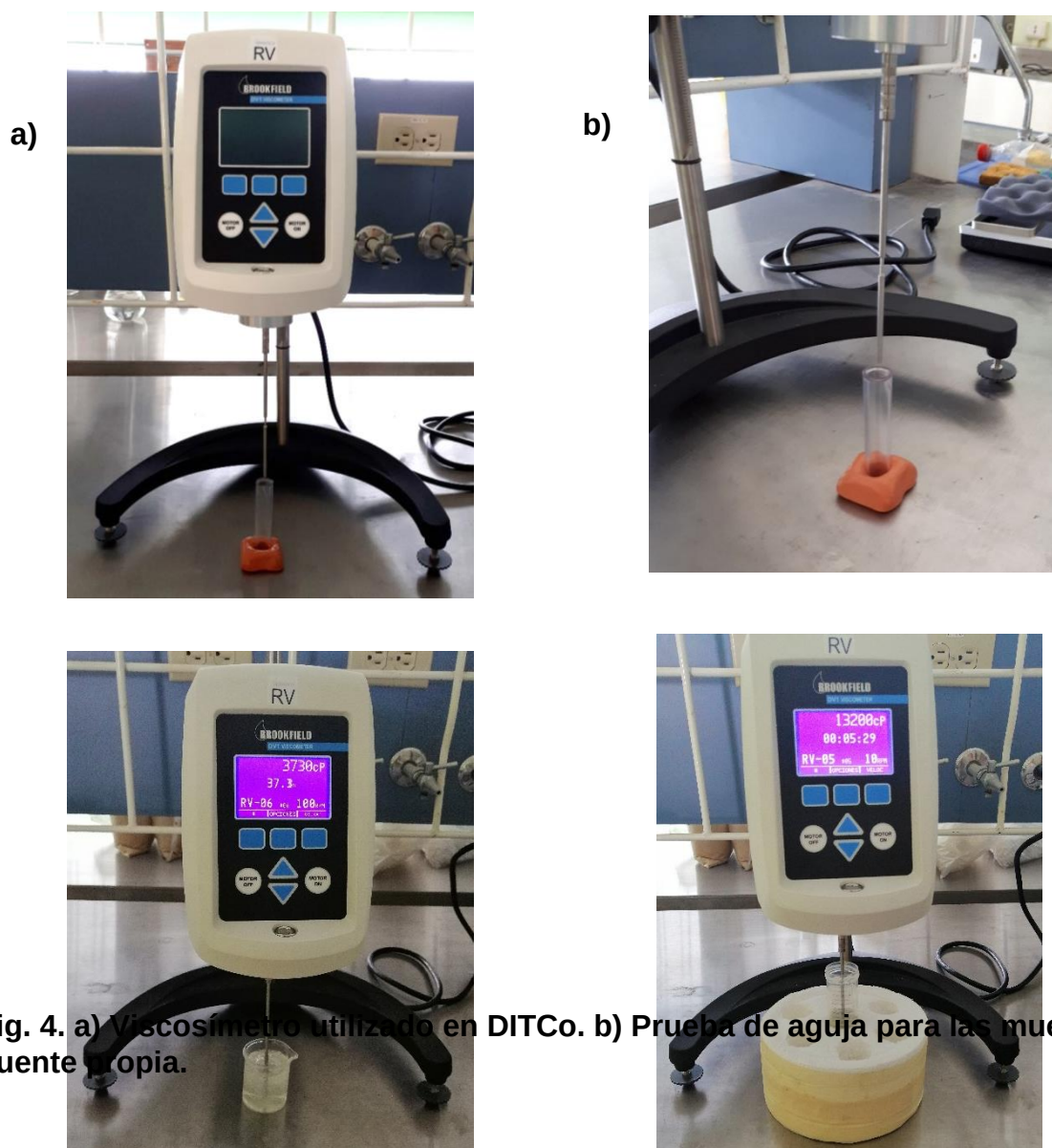
En los geles experimentales se usó el ácido acético a una concentración del 16%, sin embargo al obtener los resultados de medición de pH, el pH de los geles fue muy bajo, por esta razón, así como que nos encontramos en la búsqueda de obtener un material de condiciones óptimas, se decide cambiar la concentración de ácido acético del 16% al 3.3%, por lo que en una nueva muestra que se preparó se utilizó la nueva concentración de ácido acético y se toma el pH nuevamente para este gel en la tiras reactivas.

Viscosidad

El viscosímetro utilizado fue el Brookfield DV1 VISCOMETER el cual se calibró y se niveló sobre la superficie.

Se realizaron pruebas piloto con diferentes agujas y las agujas seleccionadas fueron la RV-07 y RV-05, se colocó la muestra en un tubo falcon debajo de la

aguja para poder insertarla en la muestra, en la pantalla aparecen los datos predeterminados en cuanto a las revoluciones por minuto (RPM) y centipoise (cP) correspondientes para esa aguja. Las 2 agujas utilizadas se probaron a distintas velocidades y se registraron los resultados para la muestra.



Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier.

Se utilizó el espectrómetro de vacío Bruker Vertex 70, que fue calibrado haciendo una medición sin ningún material colocado en la platina de muestras, el procedimiento se lleva a cabo mediante el software OPUS. Posteriormente se colocó una pequeña cantidad de cada uno de los geles en la platina hasta obtener el espectro y entre cada prueba, la platina se limpió con acetona.



Fig. 5. a) Laboratorio para FT-IR, TGA/DSC DITCo. b) Espectrómetro Bruker Vertex 70. Fuente propia.

Microscopía óptica

El microscopio que se utilizó fue ZEISS AXIO SCOPE A1 MICROSCOPE y se opera con el software Axio Vision. Se probaron los cuatro geles experimentales, colocándolos sobre un portaobjetos, el cual se limpió previo a la colocación de cada muestra tanto con acetona como con alcohol. Las muestras se observaron a 5x, 10x y 20x para cada uno de los geles.

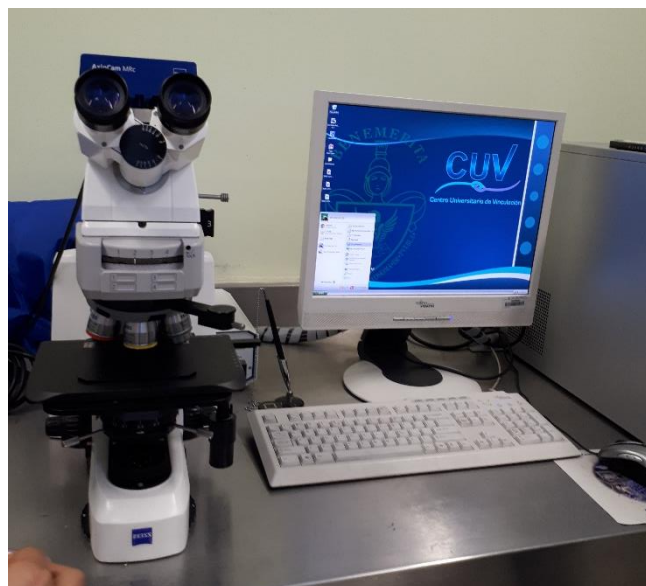


Fig. 6. Microscopio Zeiss Axio Scope A1 utilizado en el laboratorio de pruebas DITCO. Fuente propia.

7.8. Logística: recursos humanos, materiales y financieros

Aplicación de recursos	Recursos humanos • Una tesista • Responsable del proyecto y directora metodológica • Directora disciplinaria • Asesor Recursos materiales • Reactivos: metformina, quitosán, ácido acético • Agua destilada • MTA • Barreras de protección Recursos financieros Fueron aportados por el investigador y la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
------------------------	---

8. BIOÉTICA

La presente investigación no representa un riesgo, motivo por el cual no fue requerido un dictamen por parte de la secretaría de enseñanza de la FEBUAP. El estudio se sometió a evaluación del CIFE de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (2018089).

9. RESULTADOS

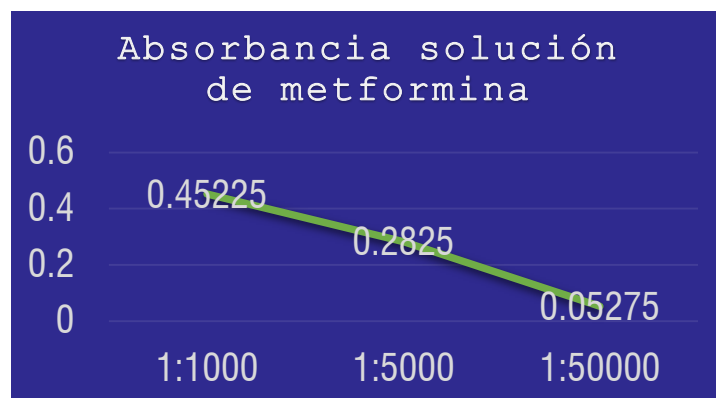
9.1. Prueba de medición de pH de la solución de metformina

La primera medición de pH que se realizó fué en la solución de metformina y el resultado fue de 6.38.

9.2. Curva de calibración de la solución de metformina

Como resultado de la curva de calibración en la solución de metformina se obtuvieron los siguientes datos:

1:1000	1:5000	1:50000
0.45225	0.2825	0.05275



Más adelante se utilizará esta información para realizar la prueba de liberación de metformina en los geles en la segunda parte de este proyecto.

Se obtuvieron resultados adecuados hasta la tercera dilución de 1:1000. En la cual se tomaron 500 μ l de la dilución de 1:100 y se colocaron en 5 ml de agua bidestilada obteniendo una absorbancia de 0.430 y realizan medidas de referencia los resultados fueron, 0.452, 0.464 y 0.463

De igual forma en la dilución de 1:10,000 se tomó una alícuota de la dilución de 1:1000 de 500 μ l y se colocaron en 5 ml de agua bidestilada para colocarlo en la celda, obteniendo una absorbancia de 0.080 con medidas de referencia de 0.087 y 0.089.

Para una dilución menor, se tomó una alícuota de la dilución de 1:10,000 de 500 μ l y se completó 2.5 ml para medir la absorbancia, se obtuvo una dilución de 1:50,000 con absorbancia de y medidas de referencia de 0.040, 0.046, 0.064 y 0.061

Por último se tomó una alícuota de 500 μ l de la dilución de 1:1000 y se completaron 2.5 ml para obtener una dilución de 1:5000 con valores de absorbancia y medidas de referencia de 0.192, 0.245, 0.270, 0.291, 0.272, 0.297. Por lo que los resultados óptimos se obtuvieron con la dilución 1:50,000.

9.3. Preparación de geles

Se realizaron pruebas piloto donde se formularon geles con cemento Portland blanco el cual funcionó de forma adecuada en conjunto con los demás materiales y se logró obtener la consistencia de gel y que éstos fueran transparentes. A partir de estas pruebas se formularon los geles finales de este proyecto, que fueron los siguientes (Fig. 7):

- Gel de metformina
- Gel de MTA-metformina (concentración de ácido acético 16% y 3.3%)
- Gel de MTA
- Gel de quitosán

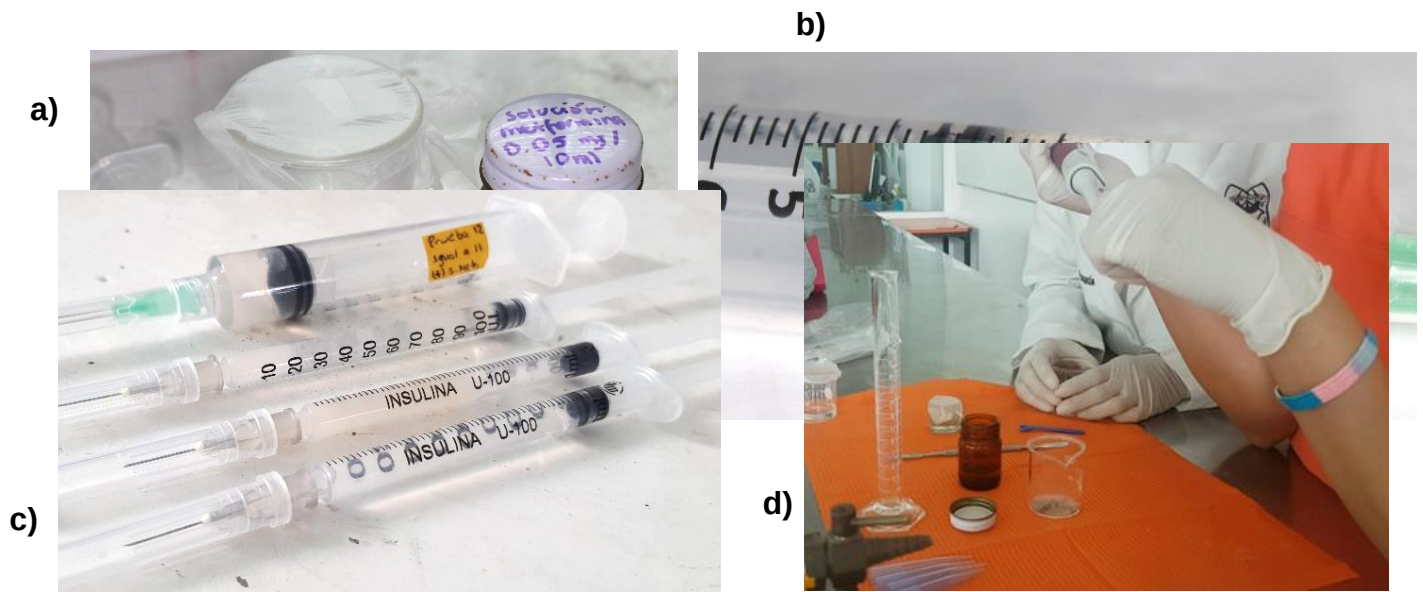


Fig. 7. a) Materiales utilizados para la preparación de los geles. b) Gel de metformina. c) Preparación de los geles en el laboratorio multidisciplinario FEBUAP. d) Muestras almacenadas de geles que se prepararon. Fuente propia.

Gel	pH Potenciómetro	pH Tiras reactivas
Gel de quitosán	3.3	
Gel de metformina-MTA		4
Gel de metformina		3
Gel de MTA		4

9.4. Pruebas de caracterización realizadas en los geles

Medición de pH

Se midió el pH de los geles obteniendo los siguientes resultados:

Tabla II. Valores obtenidos de la medición de pH con potenciómetro y tiras reactivas. Fuente propia.

a)





Fig. 8. a) Valor de pH para gel de quitosán. b) pH gel metformina-MTA. c) pH gel de metformina. d) pH gel de MTA. Fuente propia.

Como se mencionó anteriormente en el capítulo de procedimientos, se realizó un cambio en la concentración de ácido acético para realizar una nueva medición del pH del gel experimental principal (metformina-MTA), el cambio fue de una concentración del 16% al 3.3%. Se realizó una última medición del pH de este gel a los 3 días y fue de 9.

Tabla III. Valores obtenidos para la medición de pH del gel de metformina-MTA con ácido acético al 3.3%. Medición al momento de la preparación y medición 3 días después. Fuente propia.

1° medición pH	2° medición de pH 3 días
11	9



Fig. 9. Valores obtenidos de pH del gel de metformina-MTA con ácido acético 3.3%. Fuente propia.



Viscosidad

De acuerdo a la revisión de la literatura, pudimos determinar que la muestra de gel de quitosán correspondía a un fluido no newtoniano, el cual es cualquier fluido con una mezcla de moléculas con diferentes formas y tamaños. A medida que pasan uno junto al otro, como sucede durante el flujo, su tamaño, forma y cohesión determinarán cuánta fuerza se requiere para moverlos.

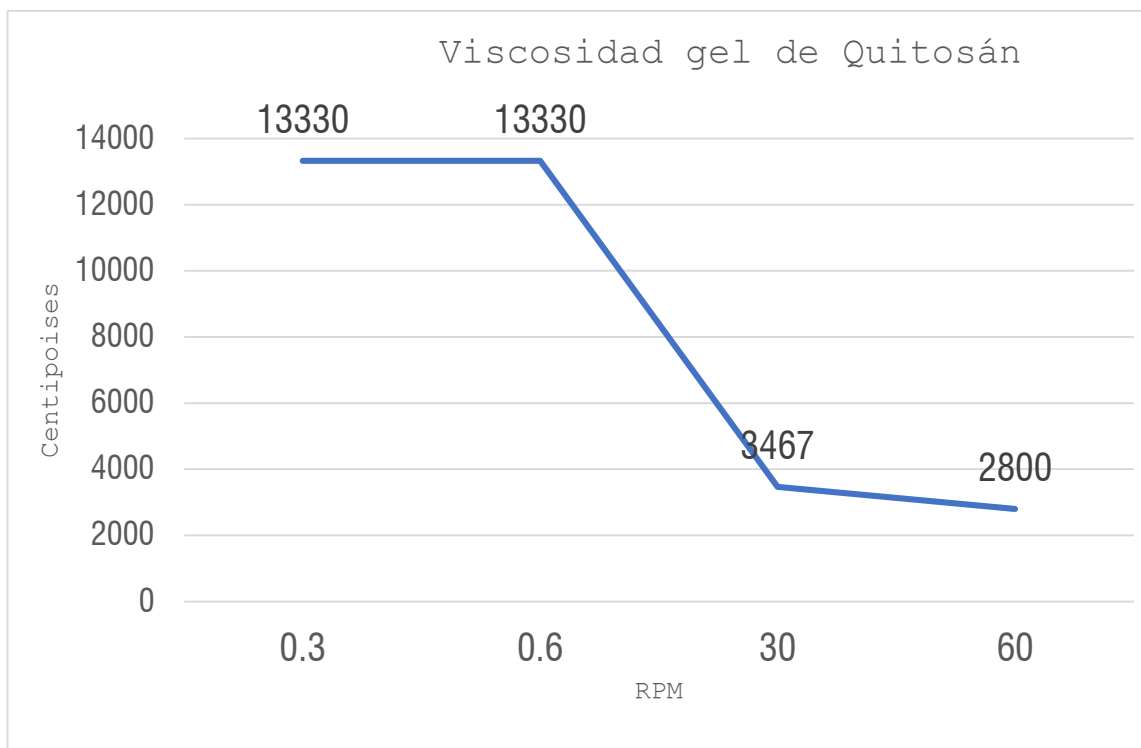
Los resultados y detalles en cuanto a las puntas y velocidades que se obtuvieron en las mediciones realizadas son los siguientes, todas tuvieron una duración de 5 mins aprox:



Fig. 10. Viscosímetro realizando medición de viscosidad punta RV-07 60 RPM. Fuente propia.

Tabla IV. Valores obtenidos para la medición de viscosidad del gel de quitosán con la punta RV – 07 a distintas RPM. Fuente propia.

Punta viscosímetro	Centipoise	RPM	Porcentaje de torque
Punta RV - 07	13330 cP	0.3	0.1%
Punta RV- 07	13330 cP	0.6	0.2%
Punta RV – 07	3467 cP	30	2.6%
Punta RV - 07	2800 cP	60	4.2%



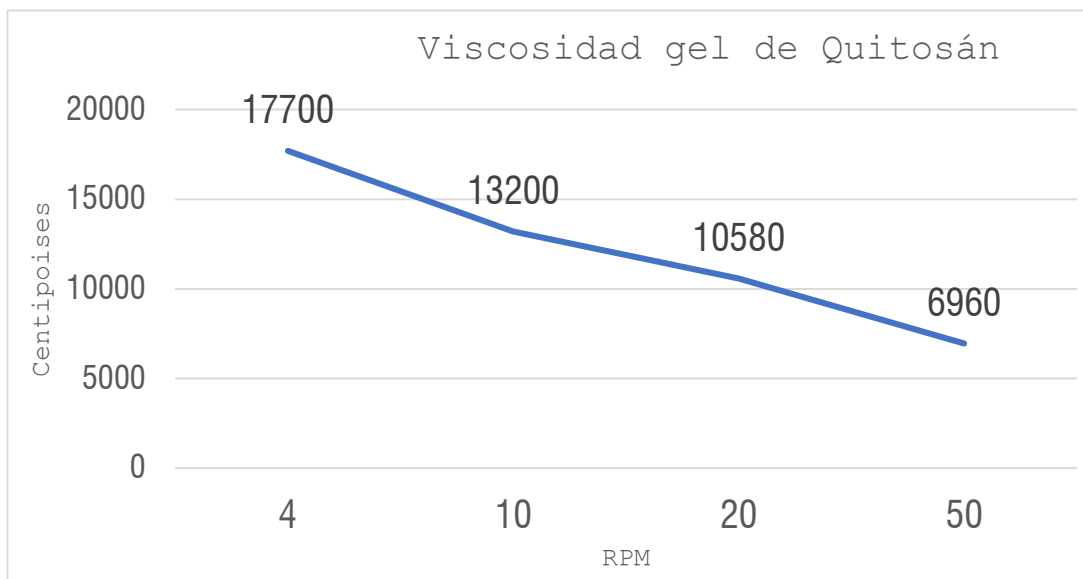
Gráfica I. Viscosidad gel de Quitosán con punta RV-07. Fuente propia.



Fig. 11. Viscosímetro realizando la medición con la punta RV-05 a 20 RPM. Fuente propia.

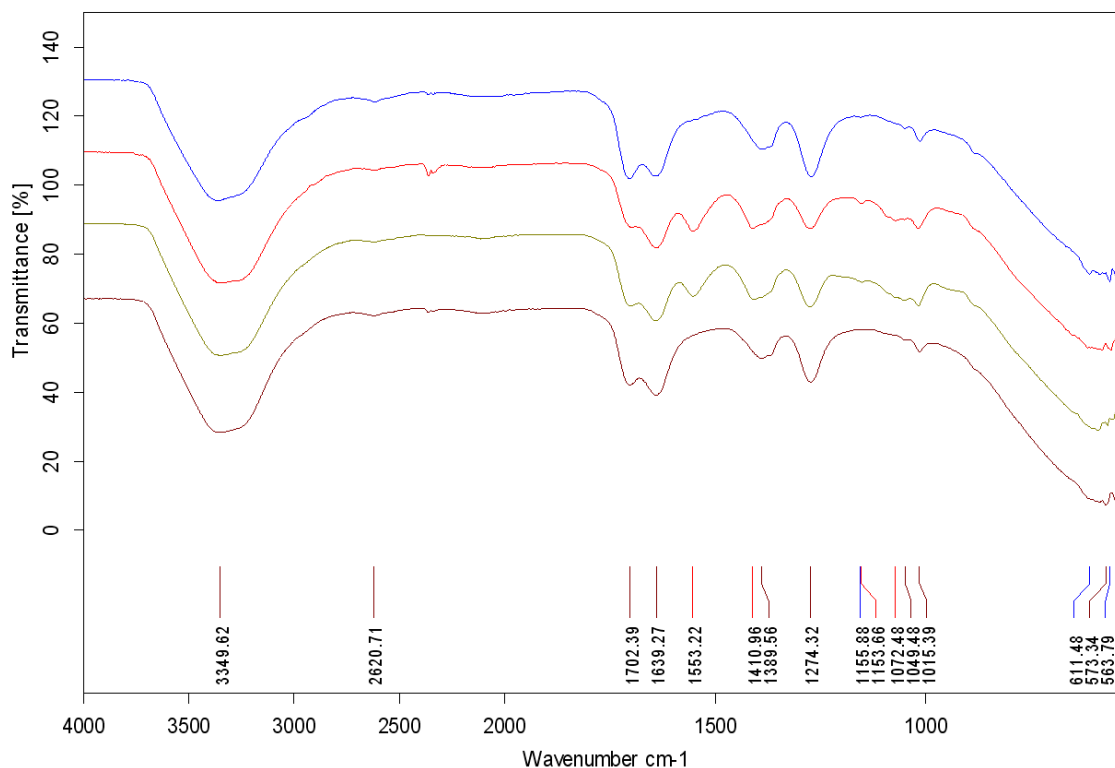
Tabla V. Valores obtenidos para la medición de viscosidad del gel de quitosán con la punta RV – 05 a distintas RPM. Fuente propia.

Punta viscosímetro	Centipoise	RPM	Porcentaje de torque
Punta RV - 05	17700 cP	4	17.7%
Punta RV - 05	13200 cP	10	33%
Punta RV - 05	10580 cP	20	52.9%
Punta RV - 05	6960 cP	50	87%



Gráfica II. Viscosidad gel de Quitosán con punta RV-05. Fuente propia.

Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier



Sample Name: GEL DE QUITOSAN

Sample Name: GEL DE MTA-METFORMINA

Sample Name: GEL DE MTA

Sample Name: GEL DE METFORMINA

Tabla VI. Resultados de FT-IR para gel de metformina-MTA, metformina, MTA

Número de onda cm-1	Tipo de enlace	Tipo de vibración
3349.62	Kumari y Rani 2011 (36) O-H que se traslapa con N-H. Quitosán Abu Zeid et al. 2017 (37) Grupo O-H de moléculas de agua	Tensión del enlace
2620.71	Pawlak et al. 2003 CH ₂ atribuida al anillo de piranosa, correspondiente a quitosán	Tensión simétrica o asimétrica

1702.39	C=O corresponde a ácido carboxílico saturado (ácido acético) por lo cual esta presente en todos los geles esta señal	
1639.27	Kumari y Rani 2011 (36) C=O (amida I). Quitosán Li Q. y Coleman N.J. 2015 (38) H₂O asociada a la hidratación del MTA Abu Zeid et al. 2017 (37) -OH de agua absorbida y se traslapa con la señal de C=O También se asocia con la fase de sulfato (yeso). MTA	Tensión del enlace Tensión y flexión del enlace. Flexión del enlace
1553.22	Nayak et al. 2013 (39) N-H aminas secundarias. Metformina C=O sales de carboxilatos (enlace entre ácido orgánico y ión metálico). MTA	Flexión del enlace.
1410.96	Gandolfi et al. 2010 (40) CO₃²⁻ Calcita e hidroxicarbonato apatita tipo B. MTA	Tensión del enlace
1389.56	Bhattacharai et al. 2005 CH₃ en grupo amida III. Quitosán	Tensión del enlace de anillos de amina heterocíclica
1274.32	Pawlak et al 2003	Tensión simétrica o

	C–O. Quitosán CH ₂ atribuido al anillo de piranosa, correspondiente a quitosán. Quitosán	asimétrica
1155.88	Li Q. y Coleman N.J. 2015 (38) MTA SO ₄ ²⁻ Anhidrita y yeso	Tensión del enlace
1153.66	Gandolfi et al. 2010 (40) MTA Li Q. y Coleman N.J. 2015 (38) SO ₄ ²⁻ Anhidrita y yeso Abu Zeid et al. 2017 (37) Grupos sulfato SO ₄ ⁻² Se traslapa con la vibración de la banda de SiO ₄ ²⁻	Tensión del enlace Vibración v3
1072.48	Kumari y Rani 2011 (36) C-O . Quitosán Nayak et al. 2013 (39) C-N. Metformina	Vibración del enlace. Tensión del enlace
1049.48	Pawlak et al. 2003 –C–O–C– en el enlace glucosídico. Quitosán	
1015.39	Gandolfi et al. (40) 2010. MTA SO ₄ ²⁻ Etringita	Tensión del enlace
611.48	Abu Zeid et al. (37) 2017. MTA PO ₄ ³⁻ sulfato de calcio en forma de yeso y anhidrita	Tensión asimétrica
573.34	Gandolfi et al.(40) 2010. MTA	Flexión del enlace

	PO ₄ ³⁻ Apatita	
563.79	Gandolfi et al. (40) 2010. MTA PO ₄ ³⁻ Apatita	Flexión del enlace

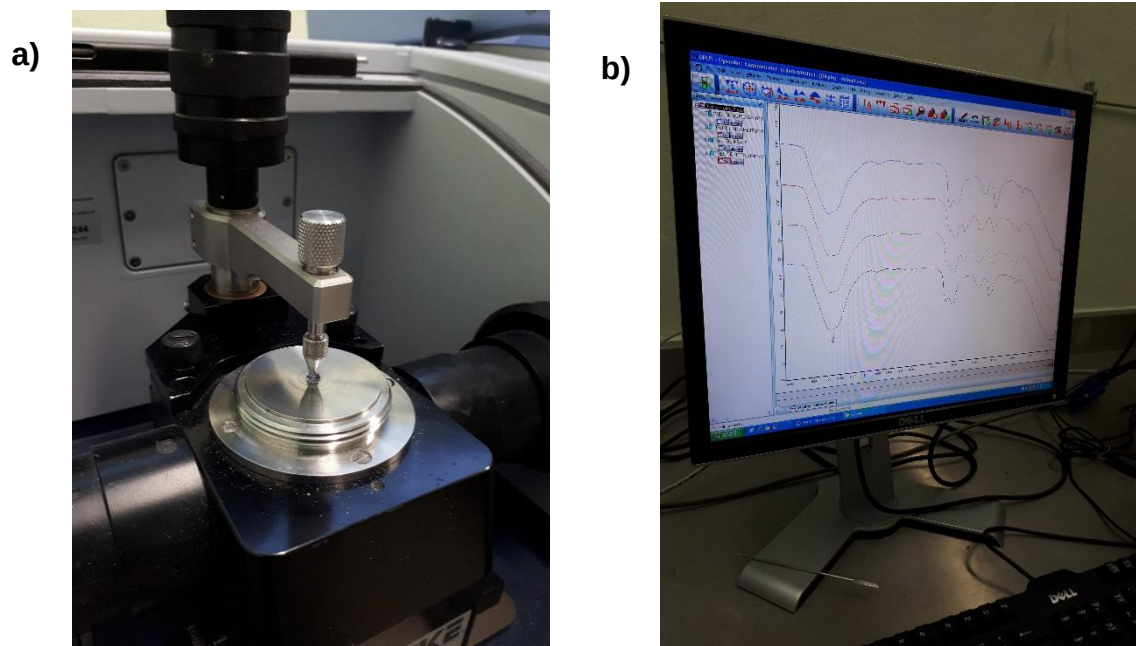


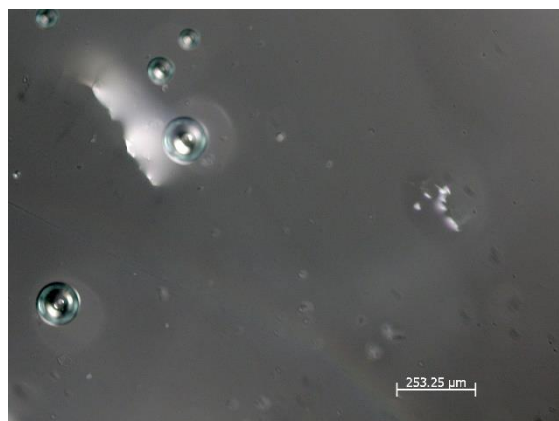
Fig. 12. a) Muestra colocada para realizar lectura de espectroscopía infrarroja transformada de Fourier. b) Computadora donde se observan los resultados. Fuente propia.

Microscopía óptica

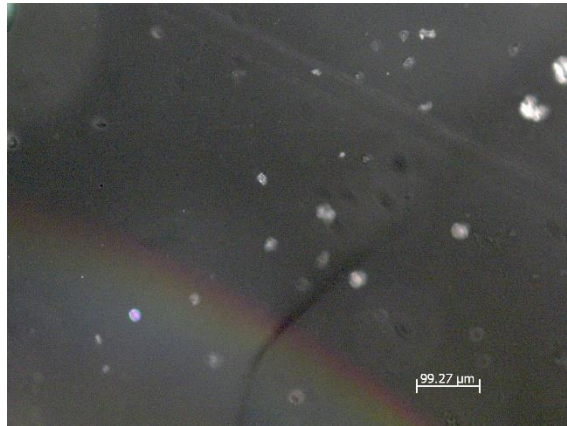
A continuación se describirán las imágenes obtenidas al momento de observar bajo el microscopio óptico los cuatro geles experimentales, los cuales, como se mencionó anteriormente, fueron observados a 5x, 10x y 20x , por lo tanto, se obtuvieron un total de 12 imágenes de las muestras, pudiendo apreciar la inclusión del quitosán, metformina y MTA y el tamaño de las partículas.

Gel de quitosán

a) 5x



b) 10x



c) 20x

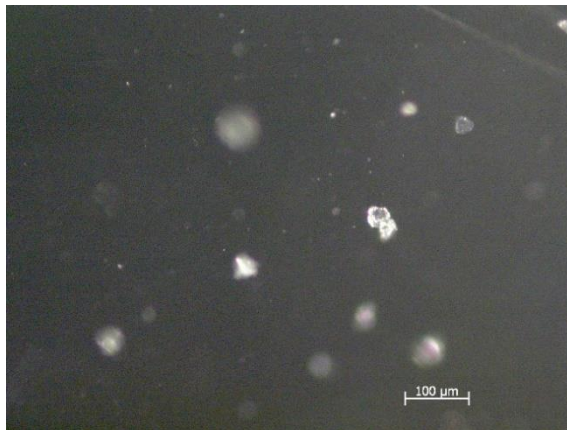


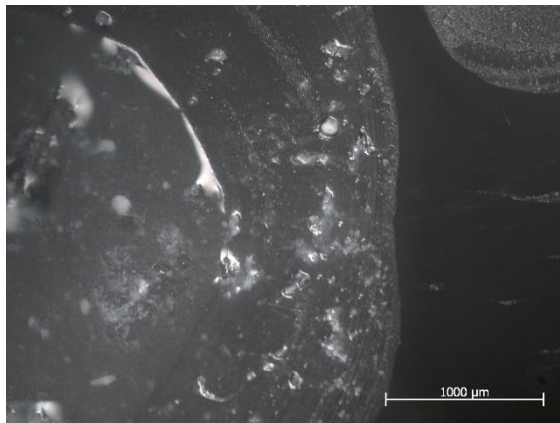
Fig. 13.

Imágenes del gel de quitosán bajo microscopio óptico. a) 5x. b) 10x. c) 20x. Fuente propia.

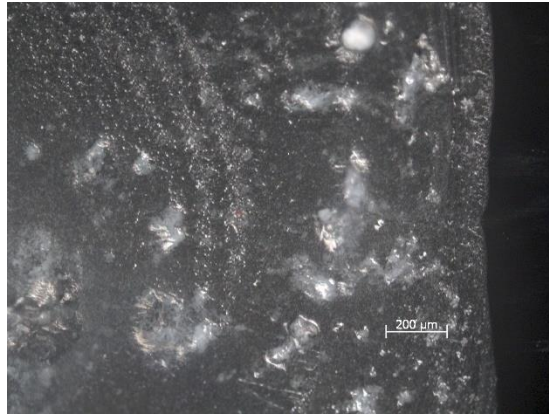
Se puede observar la inclusión de aire en el gel así como partículas de quitosán de distintos tamaños.

Gel de metformina-MTA

a) 5x



b) 10x



c) 20x

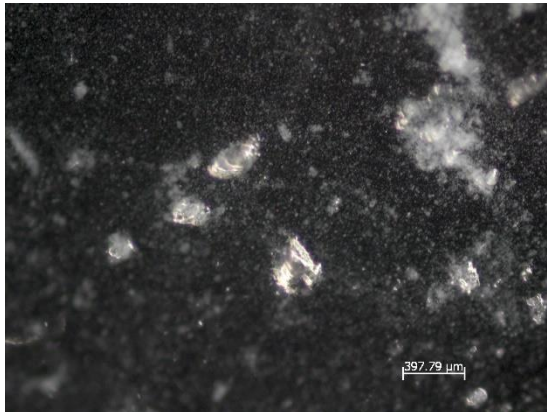
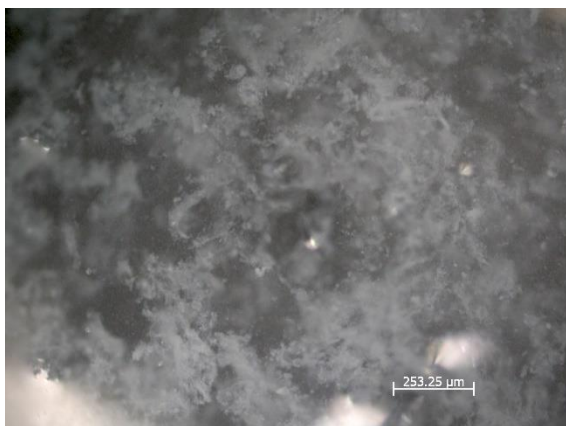


Fig. 14. Imágenes del gel de metformina-MTA bajo microscopio óptico. a) 5x. b) 10x. c) 20x. Fuente propia.

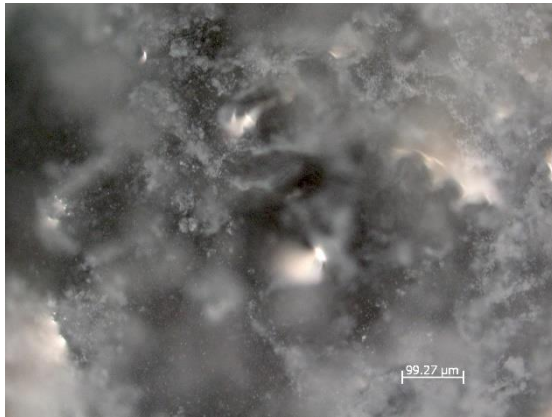
En estas muestras se observan las partículas de MTA en el gel, las cuales corresponden a las estructuras de mayor tamaño y coloración blanca, así como partículas de quitosán. La metformina no se observa. Es un componente que se incluye de mejor forma en el gel si se compara con el MTA y quitosán, esto puede deberse a que el compuesto tiene un pH ácido que favorece su integración.

Gel de MTA

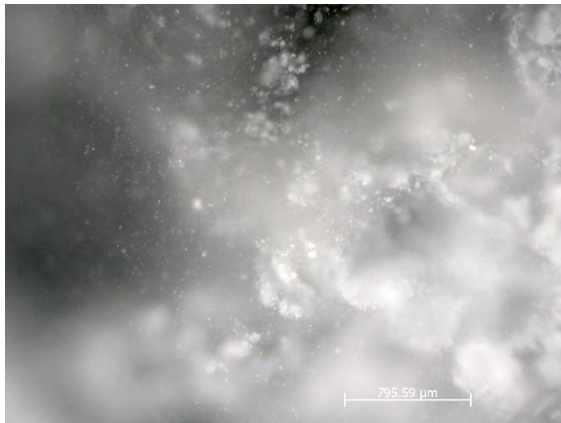
a) 5x



b) 10x



c) 20x



d) 20x

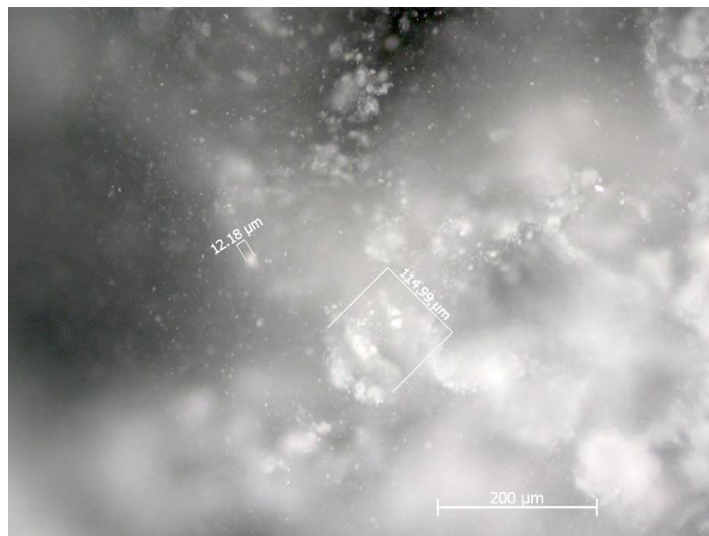


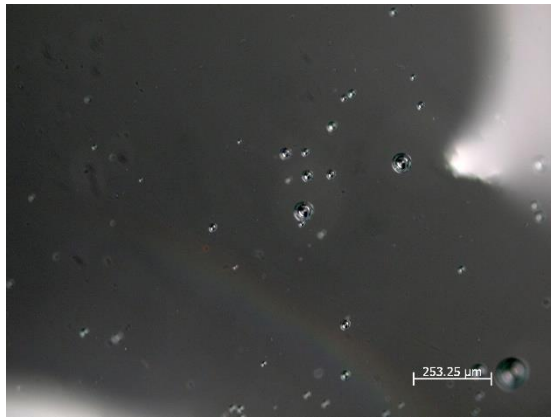
Fig. 15. Imágenes del gel de MTA bajo microscopio óptico. a) 5x. b) 10x. c) 20x. d) 20x con medidas de partículas de MTA y quitosánda. Fuente propia.

En la muestra de MTA se observan las estructuras de gran tamaño y de coloración blanca, las cuales corresponden a la presencia de MTA, así como las formas de

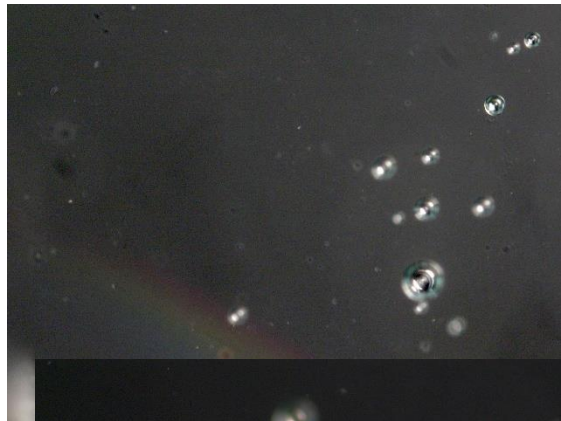
menor tamaño que representan el quitosán en el gel. En el aumento 20x, se midieron dos partículas, una de MTA de 114.99 micras y una de quitosán de 12.8 micras.

Gel de metformina

a) 5x



b) 10x



c) 20x

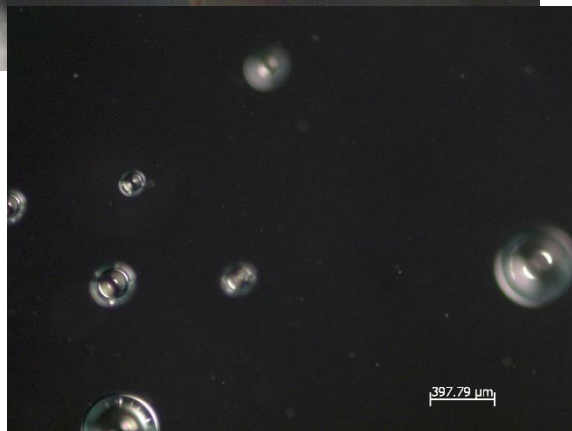


Fig. 16. Imágenes del gel de metformina bajo microscopio óptico. a) 5x. b) 10x. c) 20x. Fuente propia.

Al observar el gel de metformina se observó una diferencia con el gel de quitosán inmediatamente, éste se incluyó de mejor forma en el gel al contar con la presencia de la solución de metformina. Todavía se pueden observar pequeñas partículas, sin embargo al compararlo con el gel de quitosán por sí solo, existe una inclusión mayor de este material en la formulación del gel de metformina.

10.DISCUSIÓN

En la parte I de este proyecto de investigación, se prepararon geles experimentales (metformina, metformina-MTA, MTA y quitosán) y se caracterizaron mediante pruebas de pH, viscosidad, espectroscopía infrarroja transformada de Fourier y microscopía óptica.

En cuanto a la presentación del MTA en forma de gel, existen diferentes productos disponibles en el Mercado: MTA Flow, MTA Plus gel y Neo MTA, estos productos se presentan como polvo y líquido que se mezclan y en el MTA Flow se menciona, el uso de jeringas de aplicación dependiendo el tratamiento que se a realizar. El componente principal del polvo es MTA mientras que el líquido está compuesto por un gel a base de agua. En el presente estudio el polvo incluyó MTA y quitosán y el líquido se encontraba compuesto por agua bidestilada, ácido acético y solución de metformina en los geles que contenían este último compuesto.

A continuación, en las imágenes se puede realizar una comparación de la consistencia del MTA Flow y el gel de MTA que se formuló en el presente proyecto de investigación.

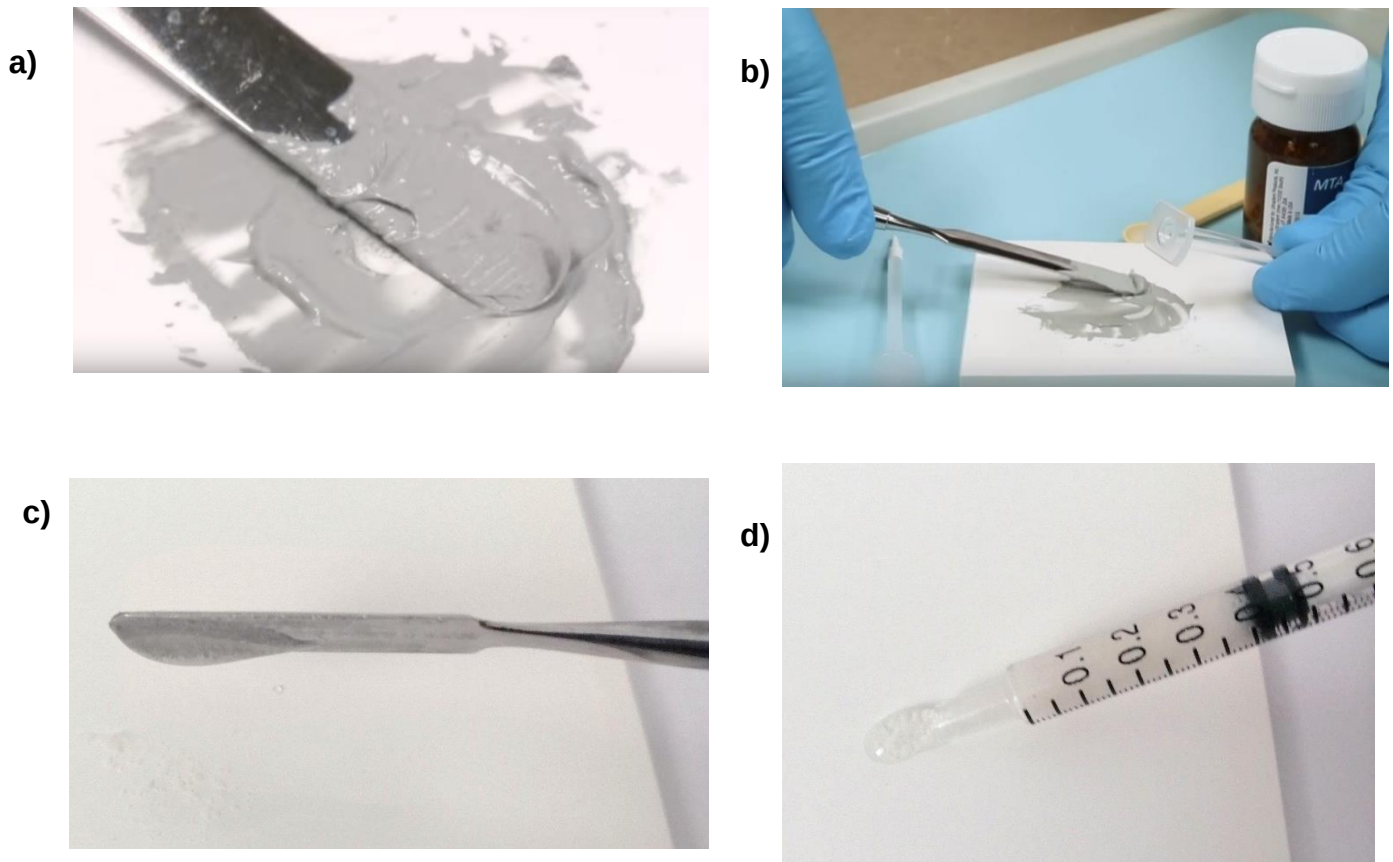


Fig. 17. a) MTA Flow. b) Imagen que muestra la consistencia de MTA Flow y colocación en jeringa. Disponible en: https://www.youtube.com/watch?v=gLwLQke_iKU c) Gel MTA-metformina. d) Imagen que muestra la consistencia de gel MTA-metformina. Fuente propia.

El principal objetivo del presente trabajo fue crear un gel, debido a que en la actualidad no existen geles que combinen el MTA con la metformina como se realizó en esta investigación, sin embargo, en el estudio de Phung et al. (1) hicieron esta recomendación al examinar los efectos de diferentes compuestos bioactivos, entre ellos la metformina, sobre la diferenciación osteogénica, odontogénica y procesos de mineralización. Estos resultados sugieren la viabilidad de inducir la formación de dentina reparadora utilizando los compuestos en conjunción con MTA como material de recubrimiento pulpar. Se indican estudios preclínicos y clínicos adicionales que utilicen estos compuestos bioactivos.

El estudio de Shinkai et al. en el 2017 fue la referencia para poder formular la solución de metformina, ya que reportaron la concentración utilizada en el presente proyecto. Por otro lado, Pradeep et al. en el 2013 y 2015 probaron las propiedades de geles de metformina a distintas concentraciones en el área de Periodoncia en pacientes fumadores, así como comparándola con una sola concentración de gel de metformina con un gel placebo. Este grupo de

investigadores concluyeron que, la administración local de gel de metformina estimuló una mejora significativa en los parámetros clínicos y radiológicos lo cual puede proporcionar una dirección alternativa en el campo de la regeneración periodontal.

En cuanto al pH reportado para el MTA Plus gel fue de 11 de forma inicial ya que en el estudio de Sibone et al. 2017(41) en donde se compararon las propiedades de otro gel de MTA llamado Neo MTA Plus con el MTA Plus gel y en la prueba de medición de pH se realizaron las mediciones en un periodo de 3 hrs, 1, 3, 7, 14 y 28 días, siendo 11 el pH inicial para MTA Plus gel y 8 pH final como en el caso del gel de este proyecto en el cual se cambió la concentración de ácido acético del 16 al 3% y con el que se obtuvo la variación de pH, ya que inicialmente en la medición en el gel formulado con el ácido acético 16% el pH fue de 4 y al cambiar la concentración el pH reportado fue de 11 conservando la consistencia de gel. Se realizó una última medición a los 3 días y el pH fue de 9.

Este cambio en el pH es un aspecto importante y tiene ciertas ventajas como las mencionadas por Siboni et al 2017 (41): la liberación continua de iones de calcio lo cual es un factor clave para promover la regeneración de los tejidos, se mejora la bioactividad y la biocompatibilidad del material, así como promueve una actividad antibacteriana y acelera la nucleación de apatita.

Al obtener los resultados para la prueba de viscosidad, diferimos en esta prueba con la investigación de Samano et al. en el 2014 (42) en la que realizaron pruebas en geles de quitosán y de quitosán con nanopartículas de plata y oro. La viscosidad reportada para el gel de quitosán a 50 RPM fue de 4500 cP y lo que se obtuvo en la presente investigación a la misma velocidad fue una viscosidad de 6960 cP con 87% de exactitud, la diferencia de valores puede ser debido a los equipos utilizados. El manual del viscosímetro utilizado en este estudio menciona que, para obtener una medición confiable y exacta, el porcentaje debe de ir de 10 a 100%, obteniendo un buen resultado con 87%.

Se llevó a cabo un intento de realizar la prueba de viscosidad en los 4 geles experimentales, sin embargo, se requiere una cantidad mínima de aproximadamente 15 ml para el correcto desempeño del viscosímetro debido a que la punta debe de estar cubierta hasta una marca y se requiere una mayor cantidad de la muestra, por esto para los geles que contienen tanto metformina como MTA no fue posible formular esta cantidad de gel, debido a que cantidades mínimas de estos materiales tienen un costo elevado, por lo tanto, ésta prueba sólo se realizó en el gel de quitosán para obtener valores de referencia en cuanto a la viscosidad.

El gel de quitosán mostró ser un fluido no newtoniano debido a los valores de viscosidad obtenidos, lo cual puede ser una ventaja, debido a la resistencia que presentan este tipo de fluidos, no pueden entrar otros componentes en ellos ya que cuando se ejerce fuerza sobre ellos no pueden penetrarse y al manipularlos

no se vuelve más fluido, lo que lleva a una aplicación más fácil y se evitaría que el gel fluya desde el sitio de aplicación.

Bueno et al. 2019 (43) observaron al trabajar con MTA Flow que mostró una composición más fina del polvo que, además del gel a base de agua, facilitó el procedimiento y corroboró que esto es una ventaja en el aspecto clínico. El fabricante afirma que la consistencia uniforme obtenida con el cemento MTA Flow se debe no solo al medio de gel patentado, sino también principalmente al polvo ultrafino, que difiere de otros cementos MTA disponibles en el mercado.

Se realizó una búsqueda de artículos sobre pruebas de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) para conocer el grupo funcional o bases que se encuentren relacionadas con cada componente en los picos que se obtuvieron como resultado en los que se realizó dicha prueba. Se encontró que en cuanto a quitosán, en una investigación reportada por Kumari y Rani en el 2011 (36) a la longitud de onda 3435.7 cm^{-1} corresponde al grupo funcional OH que se superpone al NH en la misma región. El pico a 2923.3 cm^{-1} es el estiramiento C-H típico. Un pequeño pico a 1633 cm^{-1} se debió al estiramiento C = O (amida I), y el pico a 1580 cm^{-1} se informó como un pico de amida II. La banda a 1076.1 cm^{-1} se debe a la vibración de estiramiento C-O en el quitosán, los cuales corresponden a los resultados obtenidos en esta investigación. Nayak et al. 2013 (39) mencionan que en el espectro FTIR de metformina, los picos de absorción principales aparecieron en 3169 cm^{-1} debido al estiramiento de NH del grupo de aminas primarias (-NH_2) y a 1063 cm^{-1} debido al estiramiento de la CN, y un pico a 1584 cm^{-1} ocurre debido a las vibraciones de flexión de NH del grupo de aminas primarias. En cuanto al análisis de MTA, Gandolfi et al. 2010 (40), reportan a una longitud de onda de 3640 cm^{-1} un estiramiento de OH, con una fase cristalina de portlandita, a 1470 cm^{-1} corresponde a CO_3^- así como aragonita, de igual forma a 1415 cm^{-1} se observó CO_3^{2-} que corresponde a una fase cristalina de calcita e hidroxicarbonato apatita tipo B. Para la longitud de onda de 1150 y 1110 existió un estiramiento de SO_4^{2-} y fases cristalinas de anhidrita / yeso y etringita respectivamente. En el número de onda de 580 a 605 cm^{-1} se encuentra un pico que corresponde a flexión del enlace PO_4^{3-} en la fase cristalina de apatita. Lo mismo sucede para el número de onda de 560 a 600 cm^{-1} .

Los geles fueron evaluados frescos, sin pasar por el fraguado, cuando se pierde humedad.

De acuerdo a Li Q. y Coleman N.J. 2015(38) reportaron tensiones de enlaces de sulfato en forma de anhidrita y hemidrato da origen a las señales a 1115 , 1155 y 1160 cm^{-1} . Modos de estiramiento y flexión de grupos hidroxilo unidos a hidrógeno y de agua asociada a la hidratación del cemento da origen a bandas amplias a $3,450$ y 1640 cm^{-1} respectivamente.

Abu Zeid et al. en 2017 (37) analizaron el comportamiento químico y la bioactividad de Neo MTA plus y MTA Angelus®. Reportaron espectros de FT-IR

del polvo previo a la mezcla, de la mezcla fresca de ambos cementos y de los materiales fraguados. El espectro reportado de los cementos recién mezclados reporta una banda amplia a 3300 cm^{-1} que corresponde al grupo -OH de las moléculas de agua. También presentaron bandas débiles a $2900\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ que corresponden al grupo CH_2 . Otra banda a 1637 cm^{-1} esta asignada a moléculas de agua y esta asociada a sulfato (yeso). La banda intensa a 1120 cm^{-1} se asigna a la vibración ν_3 de sulfatos (SO_4^{2-}) se traslapa con la vibración del SiO_4^{2-} . Además, se identificó una vibración de tensión asimétrica de fosfato (PO_4^{3-}) a 600 cm^{-1} . Una banda débil a 940 cm^{-1} se asignó a tensión simétrica de silicato y se traslapa con PO_4 detectado en el líquido de ambos materiales.

Los picos característicos para los geles de MTA y metofrmina-MTA se encontraron en 1553 cm^{-1} . Se mostró la mayor diferencia entre el gel que solo contiene quitosán y los que presentan MTA en este pico el cual representó N-H aminas secundarias para la metformina, sin embargo también se presentó un enlace C=O sales de carboxilatos (enlace entre ácido orgánico y ión metálico). Las bandas a 510 y 450 cm^{-1} , asignables a modos vibracionales de tetraedros de silicato poco polimerizados (modos de flexión fuera del plano y en el plano, respectivamente).

En cuanto al gel de metformina se observa un pico característico en 573 cm^{-1} correspondiente a una señal débil de enlace C-N-C por deformación del enlace. En esta región los picos para MTA se muestran de forma distinta y proporcionan las siguientes señales: a 677 y 613 cm^{-1} (modos de flexión) indican sulfato de calcio en las formas de yeso y anhidrita, y el pico a 596 cm^{-1} es distintivo de la anhidrita.

El tamaño de partícula reportado para el MTA Flow es de 10 micras, con lo cual coincidimos con el artículo de DentistryIQ Editors del 2016, en donde mediante microscopía óptica observaron dicho tamaño de partícula, así como en esta investigación, encontrando un tamaño de partícula de 12 micras en las imágenes de microscopía óptica. Como se mencionó anteriormente, esta formulación permite una dispensación suave y fácil, y la presencia del gel lo hace más resistente al lavado que otros MTA mezclados con agua. Así mismo coincidimos con Bueno et al. 2019 (43) debido a que mencionan que la influencia del tamaño de partícula podría aumentar la reactividad de las partículas de silicato dicálcico y tricálcico, ya que la geometría de las partículas pequeñas de MTA permite la entrada en los túbulos dentinarios abiertos, lo que podría ser un mecanismo importante para mejorar la capacidad de sellado e incluso mejorar el manejo de MTA.

Guimaraes et al. en el 2017 (45) reportaron esta característica acerca del MTA Flow, el anti-lavado con el objetivo de aumentar la viscosidad y la resistencia de las partículas a los líquidos. El gel anti-lavado mejora las propiedades físicas como la resistencia a la compresión y reduce el tiempo de fraguado y la porosidad.

11. CONCLUSIÓN

12. En el presente estudio podemos concluir que logramos realizar geles que muestran propiedades aptas para ser probados como materiales para recubrimiento pulpar directo, tratamiento perteneciente a la terapia pulpar vital, cuyo objetivo principal es mantener la vitalidad pulpar. Mostraron el pH adecuado, incluso en la medición que se realizó a los 3 días, el FT-IR mostró que los geles presentaban los elementos del MTA y al microscopio se observó un tamaño de partícula ideal para la combinación con el gel. Se espera obtener en el modelo murino, la bioactividad y biocompatibilidad de esta combinación de materiales. **PERSPECTIVAS**

Para los endodoncistas esto podría representar un nuevo material de silicato de calcio bioactivo y, por lo tanto, parece ser una alternativa a los cementos de MTA convencionales; Sin embargo, es necesaria más investigación.

Por lo que, se sugieren realizar investigación con respecto:

- Tamaño de partícula; tanto del polvo de MTA como del quitosán para una mayor inclusión en el gel.
- Combinar el MTA Flow con metformina.
- Evaluar la liberación de metformina a través Espectrofotometría UV.
- Probar los geles en un modelo Murino. para observar la formación o no de un puente dentinario.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Phung S, Lee C, Hong C, Song M, Yi JK, Stevenson RG, et al. Effects of Bioactive Compounds on Odontogenic Differentiation and Mineralization. J Dent Res [Internet]. 2017;96(1):107–15. Available from: <http://myaccess.library.utoronto.ca/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=rzh&AN=120371108&site=ehost-live>
2. Liu L, Zhang C, Hu Y, Peng B. Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin. J Endod [Internet]. 2012;38(7):943–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.03.010>
3. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats. J South Calif Dent Assoc. 1966;34(9):449–51.
4. Barthel C, Rosenkranz B, Leuenberg A, Roulet J. Pulp Capping of Carious Exposures: Treatment Outcome after 5 and 10 Years: A Retrospective Study. J Endod [Internet]. 2000;26(9):525–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0099239905608849>
5. Stanley HR. Pulp capping: Conserving the dental pulp-Can it be done? Is it worth it? Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol. 1989;68(5):628–39.
6. Matsuo T, Nakanishi T, Shimizu H, Ebisu S. A clinical study of direct pulp capping applied to carious-exposed pulps. J Endod. 1996;22(10):551–6.
7. Qureshi A, Soujanya E. Recent Advances in Pulp Capping Materials: An Overview. 2014;8(1):316–21.
8. Coll JA. Indirect Pulp Capping and Primary Teeth: Is the Primary Tooth Pulpotomy Out of Date? Is Pulpotomy Indicated for Carious Exposures? 2008;34(7).
9. Article R. Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide in Endodontics: A Review. 2012;133–40.
10. Dentistry S of. Mahmoud Torabinejad, most cited endodontic journal author. J Endod. 2011;
11. Tawil PZ, Duggan DJ, Galicia JC. HHS Public Access. 2016;36(4).
12. Gil AMC, Habana L, Herrera LH, Fonseca P, Habana L. P á g i n a | 1 Generalidades del agregado de trióxido mineral (MTA) y su aplicación en odontología: revisión de la literatura P á g i n a | 2. 2007;1–8.
13. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical Basis of the Biologic Properties of Mineral Trioxide Aggregate. 2005;31(2):97–100.
14. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate : A Comprehensive Literature Review — Part III : Clinical Applications , Drawbacks , and Mechanism of Action. J Endod [Internet]. 2010;36(3):400–13.

15. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: Old or new insights? *Diabetologia*. 2013;56(9):1898–906.
16. Medeiros I, Jr F, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. 2001;163–6.
17. García JAG, Alvarenga JCL, Ponce FJ, Tapia YR, Pérez LL, Bernal AR. Investigación en farmacología clínica. In: Metodología de la investigación bioestadística y bioinformática en ciencias médicas y de la salud. 2° edición. México: Mc Graw Hill Education; 2014. p. 163–77.
18. Iannaccone PM, Jacob HJ. Rats ! 2009;210:206–10.
19. Cvek M. Scientific articles A Clinical Report on Partial Pulpotomy and Capping with Calcium Hydroxide in Permanent Incisors with Complicated Crown Fracture.
20. Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J*. 2003;36(3):225–31.
21. Ford Trp, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using Mineral Trioxide Aggregate as a Pulp-Capping Material. *J Am Dent Assoc* [Internet]. 1996;127(10):1491–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002817715612090>
22. Gandolfi MG, Parrilli AP, Fini M, Prati C, Dummer PMH. 3D micro-CT analysis of the interface voids associated with Thermafil root fillings used with AH Plus or a flowable MTA sealer. 2013;(July 2012):253–63.
23. Shinkai K, Taira Y, Kawashima S, Suzuki S, Suzuki M. Histological evaluation of direct pulp capping with all-in-one adhesives in rat teeth. 2017;36(3):348–56.
24. C. Sámano-Valencia, G.A. Martínez-Castañón, R.E. Martínez-Martínez, J.P. Loyola-Rodríguez, J.F. Reyes-Macías, G. Ortega-Zarzosa, N. Niño-Martínez, Bactericide efficiency of a combination of chitosan gel with silver nanoparticles, In *Materials Letters*, Volume 106, 2013, Pages 413-416, ISSN 0167-577X, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.05.075>.
25. Qin W, Gao X, Ma T, Weir MD, Zou J, Song B, et al. Metformin Enhances the Differentiation of Dental Pulp Cells into Odontoblasts by Activating AMPK Signaling. *J Endod* [Internet]. 2018;44(4):576–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.11.017>
26. Seleem, Dalia Chen, Emily Benso, Bruna Pardi, Vanessa Murata, Ramiro. In vitro evaluation of antifungal activity of monolaurin against *Candida albicans* biofilms.[Internet]. *Biol. Pharm. Bull.* 41, 1299–1302 (2018). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27366648%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4924139>
27. Sakima V, Barbugli P, Cerri P, Chorilli M, Carmello J, Pavarina A, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy Mediated by Curcumin-Loaded Polymeric Nanoparticles in a Murine Model of Oral Candidiasis. *Molecules* [Internet].

28. Houshmanda B, Tabibzadeha Z, Reza S, Kouhestani F. Effect of metformin on dental pulp stem cells attachment, proliferation and differentiation cultured on biphasic bone substitutes. *Archives of Oral Biology* 95 (2018) 44–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.07.012>
29. Rojo A. Cálculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animales. Valoración de las incidencias. *Animales de laboratorio*. Número 62 (2014).
30. Kas S, Sargon MF. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. 2000;193:197–203.
31. Chenite A, Buschmann M, Wang D, Chaput C, Kandani N. Rheological characterisation of thermogelling chitosan / glycerol-phosphate solutions. 2001;46:39–47.
32. Cid YP, Pedrazzi V, Sousa VP De, Bernadete M, Pierre R. In Vitro Characterization of Chitosan Gels for Buccal Delivery of Celecoxib : In fl uence of a Penetration Enhancer. 2012;13(1).
33. Zhou HY, Guang X, Kong M, Sheng C, Su D, Kennedy JF. Effect of molecular weight and degree of chitosan deacetylation on the preparation and characteristics of chitosan thermosensitive hydrogel as a delivery system. 2008;73:265–73.
34. Qin W, Chen J, Guo J, Ma T, Weir MD, Guo D, et al. Novel Calcium Phosphate Cement with Metformin-Loaded Chitosan for Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Cells. 2018;2018.
35. Wang S, Xia Y, Ma T, Weir MD, Ren K, Reynolds MA, et al. Novel metformin-containing resin promotes odontogenic differentiation and mineral synthesis of dental pulp stem cells. 2019;85–96.
36. Kumari K, Rani U. Controlled Release of Metformin hydrochloride through crosslinked blends of chitosan-starch. *Pelagia Research Library Adv. Appl. Sci. Res.*, 2011, 2 (2):48-54
37. Abu Zeid, S. T., Alamoudi, N. M., Khafagi, M. G., & Abou Neel, E. A. (2017). Chemistry and Bioactivity of NeoMTA Plus™ versus MTA Angelus® Root Repair Materials. *Journal of Spectroscopy*, 2017, 1–9.[doi:10.1155/2017/8736428](https://doi.org/10.1155/2017/8736428)
38. LI, Q., & COLEMAN, N. J. (2015). The hydration chemistry of ProRoot MTA. *Dental Materials Journal*, 34(4), 458–465. [doi:10.4012/dmj.2014-309](https://doi.org/10.4012/dmj.2014-309)
39. Nayak, A. K., Pal, D., Pradhan, J., & Hasnain, M. S. (2013). Fenugreek seed mucilage-alginate mucoadhesive beads of metformin HCl: Design, optimization and evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 144–154. [doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.12.008](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.12.008)

40. Gandolfi, M. G., Taddei, P., Tinti, A., & Prati, C. (2010). Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *International Endodontic Journal*, 43(10), 917–929. doi:10.1111/j.1365-2591.2010.01768.x
41. Sibone F, Taddei P, Prati C, Gandolfi MG (2017). Properties of NeoMTA Plus and MTA Plus cements for endodontics. *International Endodontic Journal*, 50, e83 e94. doi:10.1111/iej.12787
42. Sámano-Valencia, C., Martínez-Castañón, G. A., Martínez-Gutiérrez, F., Ruiz, F., Toro-Vázquez, J. F., Morales-Rueda, J. A Niño Martínez, N. (2014). Characterization and Biocompatibility of Chitosan Gels with Silver and Gold Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 1–11. doi:10.1155/2014/543419
43. Bueno, C. R. E., Vasques, A. M. V., Cury, M. T. S., Sivieri-Araújo, G., Jacinto, R. C., Gomes-Filho, J. E. Dezan-Júnior, E. (2018). Biocompatibility and biomineralization assessment of mineral trioxide aggregate flow. *Clinical Oral Investigations*. doi:10.1007/s00784-018-2423-0
44. Artículo de revista en Internet. Ultradent Products Inc. introduces MTA Flow repair cement. *DentistryIQ Editors*. Apr 11th, 2016. Consultado junio 2019. Disponible en: <https://www.dentistryiq.com/products/endodontics/article/16352862/ultradent-products-inc-introduces-mta-flow-repair-cement>
45. Guimarães, B. M., Vivan, R. R., Piazza, B., Alcalde, M. P., Bramante, C. M., & Duarte, M. A. H. (2017). Chemical-physical Properties and Apatite-forming Ability of Mineral Trioxide Aggregate Flow. *Journal of Endodontics*, 43(10), 1692–1696. doi:10.1016/j.joen.2017.05.005
46. Rogovina L., Vasil V., Braudo E. Definition of the concept of polymer gel. *Polymer Science, Ser. C*, 2008. Vol 50. No. 1, pp. 85-92.
47. Almdal K., Hvidt S., Dyre J. Towards a phenomenological definition of the term “gel”. *Polymer gels and Networks*. 1993. 0966-7822/93. Elsevier Science Publishers.
48. Schmidt H. Chemistry of material preparation by the sol-gel process. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 1998. 51-64. Elsevier Science Publishers.
49. Giraldo J. Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. Research Gate. 2015.
50. Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105–121.
51. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. Citation DataJournal of advanced research, ISSN: 2090-1232, Vol: 6, Issue: 2, Page: 105-21Publication Year2015
52. Thermo Scientific. Orion Star and Star Plus meter User Guide. 2010. Thermo Fishr Scientific Inc. Islam M., Rodriguez N., Ciotti S., Ackermann C. Rheological

53. Brookfield Ametek. More solutions to sticky problems. 2017. AMETEK Brookfield Inc.
54. Piqué T., Vázquez A. Uso de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) en el estudio de la hidratación del cemento. Investigación y Desarrollo. Vol. 3 Núm. 2. 62-71. Enero-junio 2012.
55. Masters, B. R. (2008). History of the Optical Microscope in Cell Biology and Medicine. Encyclopedia of Life Sciences. doi:10.1002/9780470015902.a0003082
56. Thermo Scientific. Orion Star and Star Plus meter User Guide. 2010. Thermo Fishr Scientific Inc.
57. Brookfield ametek DV1 Digital Viscometer. Operating Instructions. Manual No. M14-023-A0416
58. Bruker Optik GmbH. Vertex 70 User Manual. 6° edición. July 2013
59. Carl Zeiss MicroImaging GmbH. Operating Manual Axio Scope A1. Microscope for routine and entry research. Issue data: Version 6-13-05-2008. Number of manual. M60-2-0007e
60. Pradeep, A. R., Patnaik, K., Nagpal, K., Karvekar, S., Ramamurthy, B. L., Naik, S. B., Raju, A. (2015). Efficacy of locally-delivered 1% metformin gel in the treatment of intrabony defects in patients with chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. Journal of Investigative and Clinical Dentistry, 7(3), 239–245. doi:10.1111/jicd.12150
61. Pawlak, A., & Mucha, M. (2003). Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. Thermochimica Acta, 396(1-2), 153–166. doi:10.1016/s0040-6031(02)00523-3
62. Bhattarai, N., Ramay, H. R., Gunn, J., Matsen, F. A., & Zhang, M. (2005). PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. Journal of Controlled Release, 103(3), 609–624. doi:10.1016/j.jconrel.2004.12.019
63. Tablas para la interpretación básica de espectros en la región infrarroja http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Tabla_de_IR_20785.pdf