



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOPATOLOGÍA.

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS
DE MEMBRANAS DE QUITOSANO/PROPÓLEO DE POSIBLE UTILIDAD
EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS BLANDOS EN CAVIDAD BUCAL.**

www.bdigital.ula.ve

Autores: Marisen Leo Montilla.

Leonardo Martínez Castillo.

Tutor: Prof. Fernando Rincón.

Cotutor: Dr. Reinaldo Ortíz.

Mérida – Venezuela, agosto 2019.



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOPATOLOGÍA.

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS
DE MEMBRANAS DE QUITOSANO/PROPÓLEO DE POSIBLE UTILIDAD
EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS BLANDOS EN CAVIDAD BUCAL.**

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Odontólogo

www.bdigital.ula.ve

Autores: Marisen Leo Montilla.

Leonardo Martínez Castillo.

Tutor: Prof. Fernando Rincón.

Cotutor: Dr. Reinaldo Ortíz.

Mérida – Venezuela, agosto 2019.

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso, le damos toda gloria y honra por mostrarnos que todo es posible para el que cree, iluminando nuestro sendero cuando más oscuro ha estado.

A nuestra familia, por darnos ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy podemos ver alcanzada nuestra meta. Por siempre estar impulsándonos, brindándonos cantidades inagotables de amor, esperanza y fortaleza.

A nuestros compañeros de promoción y a todo el que hace vida en nuestra amada Facultad de Odontología, por ser ustedes fuente de inspiración, ejemplo de constancia y lucha, son ustedes lo que necesita nuestro país.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

A nuestro Dios, gracias por iluminar nuestros caminos, dándonos fuerzas para caminar por tu sendero.

A la Ilustre Universidad de Los Andes, por brindarnos la oportunidad de vivir el más grande orgullo de ser ULANDINOS, gracias por permitirnos pertenecer a esta casa de estudio, cumpliendo con nuestro más grande sueño.

A nuestros profesores Reynaldo Ortíz, Fernando Rincón y Elaysa Salas, gracias por esa solidaridad, dedicación e interés que siempre reflejaron. Por ser esa luz y fuente de sabiduría en todo este tiempo de estudio.

¡Gracias a todos!

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE IMÁGENES	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1 Definición y contextualización del problema	3
1.2 Objetivos de la investigación	6
1.2.1 Objetivo general.....	6
1.2.2 Objetivos específicos	6
1.3 Justificación	6
CAPÍTULO I	9
MARCO TEÓRICO.....	9
2.1 Antecedentes	9
2.1.1 Membranas tridimensionales de hidroxapatita y quitosano como terapéutica en regeneración ósea guiada	9
2.1.3 Quitosano y propóleo en tratamientos dentales	10
2.1.4 Efectividad del quitosano en el proceso de regeneración ósea y tisular posterior a la extracción dental.	11
2.1.5 Efectividad del propóleo en los procesos de regeneración tisular de alvéolos dentales post exodoncia.	12
2.1.6 Quitosano en otros procesos de regeneración en boca.	12
2.1.7 Propóleo en otros procesos de regeneración en boca	14
2.1.8 Quitosano en Odontología	14
2.1.9 Propóleo en Odontología	16

2.1.10	Propiedades del Propóleo en tratamientos no bucales	19
2.1.11	Propiedades del Quitosano en tratamientos no bucales	20
2.2	Bases conceptuales	20
2.2.1	Microbiología en cavidad bucal.....	20
2.2.2	Generalidades sobre regeneración tisular post cirugía bucal.....	22
2.2.3	Biomateriales empleados en la regeneración de tejidos blandos post cirugía bucal.....	23
2.2.4	Quitosano.....	24
2.2.4.1	Historia del Quitosano.....	24
2.2.4.2	Descripción general.....	25
2.2.4.3	Composición química.....	25
2.2.4.4	Propiedades biológicas del quitosano.....	26
2.2.4.5	Mecanismos de acción.....	26
2.2.4.6	Reacciones adversas.....	26
2.2.4.7	Uso del quitosano en medicina.....	27
2.2.4.8	Uso del quitosano en Odontología.....	27
2.2.5	Propóleo.....	28
2.2.5.1	Historia del propóleo.....	28
2.2.5.2	Descripción general.....	28
2.2.5.3	Características organolépticas.....	29
2.2.5.4	Composición química.....	29
2.2.5.5	Propiedades biológicas del propóleo.....	30
2.2.5.6	Mecanismos de acción.....	31
2.2.5.7	Reacciones adversas.....	32
2.2.5.8	Uso del propóleo en medicina.....	32
2.2.5.9	Uso del propóleo en Odontología.....	33
2.2.5	Propiedades Químicas de compuestos.....	33
2.2.5.1	Potencial de disociación (pKa).....	33

2.2.5.2	Métodos de determinación de pKa.....	34
2.2.5.3	Implicación del valor de pKa en la aplicación clínica de quitosano en tejidos blandos de cavidad bucal.....	36
2.2.6	Velocidad de liberación de sustancias.....	36
2.2.6.1	Métodos químicos de determinación de velocidad de liberación de sustancias. 37	
2.2.6.2	Implicación del valor de velocidad de liberación de sustancias en aguadestilada para aplicación clínica.....	38
2.2.7	Actividad antimicrobiana.....	39
2.2.7.1	Determinación de actividad antimicrobiana de un compuesto.....	39
	CAPÍTULO III.....	43
	MARCO METODOLÓGICO.....	43
3.1	Nivel y diseño de investigación.....	43
3.2	Sistemas de variables.....	44
3.4	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	45
3.5	Procedimientos, materiales, equipos e instrumentos.....	45
3.6	Principios bioéticos.....	52
3.7	Análisis de resultados.....	53
	CAPÍTULO IV.....	54
	RESULTADOS Y DISCUSION.....	54
4.1	Resultados.....	54
4.1.1	Componente Químico.....	54
4.1.2	Componente Microbiológico.....	60
4.2	Análisis y Discusión de resultados.....	62
	CAPITULO V.....	65
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	65
5.1	Conclusiones.....	65

5.2	Recomendaciones	66
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
	ANEXOS Y APÉNDICES	82
	APÉNDICE A	82
	APÉNDICE B	84
	APÉNDICE C	87

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1 Membranas de quitosano/propóleo.	46
Imagen 2 Titulación con una solución de NaOH.	48
Imagen 3 Medición de cambio de pH durante la titulación.	49
Imagen 4 Espectrofotómetro UV-visible Perkin Elmer modelo Lambda 25 y celdas empleadas en las medidas.	50
Imagen 5 Preparación de Agar Muller Hinton.	51
Imagen 6 Preparación de medios de cultivo.	51
Imagen 7 Colocación de membranas en medios de cultivo.	52
Imagen 8 Observación de halos de inhibición con el contador de colonias.	52
Imagen 9. Zonas de inhibición en el crecimiento bacteriano de <i>P. aeruginosa</i> (izquierda) y <i>K. pneumonie</i> (derecha).	61
Imagen 10. Halo de inhibición observado en crecimiento bacteriano de <i>P. aeruginosa</i>	62
Imagen 11. Halo de inhibición observado frente a crecimiento de <i>K. pneumonie</i>	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de los grupos muestrales.	44
Tabla 2 Valores de pKa de los grupos estudiados.	55
Tabla 3 Valores de absorbancia de los fragmentos de membrana.	58
Tabla 4 Pendientes de las curvas de liberación para las distintas porciones de películas estudiadas.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de titulación potenciométrica de muestra representativa de los grupos de estudio, una vez disuelta en HCL.	56
Figura 2 Uv-visible de: (A) película de quitosano/propóleo disuelta en agua destilada. (B,C,D): Película de quitosano/propóleo a los 30 seg (línea negra) y 60 seg (línea roja).	57
Figura 3 Curvas de concentración de grupos estudiados P1 (0,3 ml), P2 (0,4 ml) y P3 (0,5 ml), en función de intervalos de tiempo constantes.	59



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOPATOLOGÍA

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE
MEMBRANAS DE QUITOSANO/PROPÓLEO DE POSIBLE UTILIDAD EN
LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS BLANDOS EN CAVIDAD BUCAL.**

Autores: Marisen Leo Montilla.
Leonardo Martínez Castillo.
Tutor: Fernando Rincón.
Cotutor: Reinaldo Ortiz.
Mérida – Venezuela, julio 2019.

RESUMEN

Ante procedimientos o entidades patológicas que involucren lesiones tisulares en cavidad bucal, se generarán cambios dimensionales producto de reacciones inflamatorias. Por ello, se han incorporado materiales y técnicas que buscan disminuir esas reacciones, a fin de restaurar forma y función del tejido afectado, tal como el uso del quitosano y el propóleo en cavidad bucal. Viso la vació en la literatura acerca de las propiedades químicas y microbiológicas de ambos materiales en un solo compuesto surge la necesidad de analizar las propiedades químicas y microbiológicas de las membranas de quitosano/propóleo con posible utilidad en la regeneración de tejidos blandos en cavidad bucal. En este sentido, se realizó un estudio con nivel descriptivo y diseño pre-experimental, con una muestra de 9 fracciones de 3 membranas de quitosano/propóleo elaboradas en el Departamento de Electroquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, estableciendo valores de pKa, identificando velocidad de liberación de propóleo y determinando la susceptibilidad de *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella neumonie* frente a las membranas elaboradas. Los resultados fueron analizados a través de la elaboración de una curva de calibración y de concentración para el componente químico y para el componente microbiológico se describió la presencia o ausencia de halos de inhibición. Pudiendo concluir, que las membranas de quitosano/propóleo podrían ser una alternativa viable en la práctica clínica, en vista de la propiedad mucoadhesiva (determinada a través del pKa), liberación de propóleo controlada y susceptibilidad de *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, ante las membranas analizadas.

Palabras Clave: Regeneración tisular, regeneración, cicatrización quitosano, propóleo.

INTRODUCCIÓN

Ante los procedimientos que involucren lesiones tisulares en cavidad bucal, los tejidos blandos siempre reaccionan con inflamación (entre otros signos y síntomas) que pueden exacerbarse por factores propios de la técnica quirúrgica o del paciente. Así, la regeneración o reparación busca restablecer las condiciones del tejido afectado.

Por esta razón, se han incorporado materiales y técnicas que involucran los principios de regeneración tisular guiada (RTG), buscando restaurar forma y función del tejido afectado, resultando de estas técnicas el empleo de biomateriales que promueven una bioestimulación tisular, tal como lo es el uso de membranas, lipoomas, esponjas, entre otros.

Entre estos materiales, se propone el uso de quitosano y propóleo. El quitosano, es un biopolímero, biocompatible, biodegradable y no tóxico, que se obtiene del exoesqueleto de crustáceos a partir de la desacetilación de la quitina y es empleado en odontología en la curación de heridas en varias aplicaciones clínicas. Por otro lado, la tintura de propóleo, es un biopolímero, material resinoso, pegajoso de color oscuro que producen las abejas, y posee propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antitumorales y antioxidantes con amplio uso en el área odontológica.

A pesar de las potencialidades de estos biomateriales, existe un vacío en la investigación acerca de las propiedades fisicoquímicas de membranas compuestas por quitosano/propóleo. Por lo tanto, el propósito de éste estudio es analizar las propiedades químicas y microbiológicas de las membranas de quitosano/propóleo de posible utilidad en la regeneración de tejidos blandos en cavidad bucal.

De este modo, para el cumplimiento del objetivo del presente estudio, se describirá el proceso de obtención en laboratorio de membranas de quitosano/propóleo con propiedades fisicoquímicas adecuadas para la aplicación en colgajos resultantes en cirugía bucal, se determinará el valor pKa del quitosano, se identificará la velocidad de liberación de propóleo de las membranas en agua destilada mediante pruebas de espectroscopia UV-visible y finalmente se determinará

la actividad antimicrobiana de las membranas de quitosano-propóleo en cultivos de *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.

En este sentido, el presente proyecto de investigación estará estructurado de la siguiente manera: Capítulo I: planteamiento del problema, objetivos de la investigación y justificación. Capítulo II: antecedentes y bases teóricas, capítulo III: Nivel y diseño de investigación, población, muestra, sistemas de variables, técnicas e instrumentos de recolección de datos, procedimientos, materiales, equipos e instrumentos, principios bioético y análisis de resultados. Capítulo IV: Resultados y discusión de resultados. Capítulo V: Conclusiones y recomendaciones.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Definición y contextualización del problema

El avance de la especialidad odontológica, ha traído consigo el desarrollo de nuevas técnicas y el empleo de nuevos materiales que han ayudado a incrementar el conocimiento científico y a mejorar el diagnóstico y plan de tratamiento en el área de la salud bucal. Ante los procedimientos y entidades patológicas que involucren lesiones tisulares en cavidad bucal, los tejidos blandos siempre reaccionan con inflamación (entre otros signos y síntomas) que pueden exacerbarse por factores propios del paciente^{1, 2,4}.

Por ésta razón, existen técnicas que incorporan los principios de regeneración tisular guiada (RTG) y la expansión de tejidos blandos⁵ que han sido desarrollados para ayudar a la reconstrucción del tejido afectado⁶ buscando la reproducción y reconstrucción de una parte perdida o lesionada para restaurar la arquitectura y función del tejido lesionado⁸, para la rehabilitación funcional de los maxilares⁹.

En este sentido, diversos investigadores han mostrado un gran interés hacia nuevos materiales que favorecen la regeneración tisular^{4,10,11} como una de las estrategias más prometedoras para reparar y regenerar tipos específicos de tejidos¹². Tal es el caso de biopolímeros naturales, entre ellos, el biopolímero de quitosano, un compuesto obtenido del exoesqueleto de crustáceos a partir de la desacetilación de la quitina^{4,13}, cuya principal fuente de obtención son los desechos de los crustáceos¹⁴, es biocompatible, biodegradable¹⁵⁻¹⁹ y no tóxico^{17,20}.

Éste mismo, presenta propiedades hemostáticas, aumenta la actividad osteoblástica por lo que ha sido utilizado en regeneración ósea guiada y gracias a la buena adaptación celular que posee también se ha empleado en la regeneración tisular guiada^{4,21}, pues hallazgos histológicos a las 8 semanas muestran una proliferación de fibroblastos no organizada, rodeada de una capa de colonias formadoras de hueso²².

Asimismo, ejerce una función antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, cicatrizante^{23,24}, analgésica²⁵, antifúngica²⁶, además posee un efecto antiviral, antitumoral e inmunoadyuvante, propiedades por las cuales el quitosano ha sido ampliamente utilizado en la ingeniería de tejido óseo²⁷.

Este biopolímero se ha utilizado como membrana de hemodiálisis, sutura biodegradable, sustituyente artificial de la piel, agente cicatrizante en quemaduras²⁸, sistema liberador de fármacos, para la liberación de insulina, transporte de agentes anticancerígenos, tratamiento de tumores (leucemia), control del virus del SIDA, entre otros usos en el área médica²⁹.

En odontología el quitosano se ha utilizado en la curación de heridas, promoción de crecimiento óseo, incremento de la proliferación salival, inhibición del crecimiento de bacterias cariogénicas, potenciación de la respuesta antiinflamatoria; además del reclutamiento de agentes bioactivos como factores de crecimiento¹¹.

Adicionalmente, el quitosano puede ser usado en varias formas físicas como membranas, hidrogeles, xerogeles, nanofibras, liposomas, microsferas, esponjas poroso, entre otras con diferentes propósitos, entre los cuales se destacan para el transporte de fármacos, transporte de factores de crecimiento y proteínas, síntesis de colágeno y diferenciación de células osteogénicas³⁰.

Por otro lado, entre los elementos terapéuticos utilizados en odontología como cicatrizante está el propóleo³¹⁻³³, biomaterial resinoso de color oscuro que recolectan las abejas^{32,34-38} de las plantas para sellar herméticamente su colmena e impedir infecciones dentro de ella^{39,40} es antiséptico^{41,42} y sus efectos en la aplicación tópica sobre el curso de la cicatrización gingival ha sido comprobado⁴³.

El propóleo es un producto natural con propiedades benéficas para la salud humana, tales como: antimicrobiano⁴², antiinflamatorio^{32,44-48}, antitumoral y antioxidante^{44,46,49}, su actividad antimicrobiana se da por sus componentes cinámicos y flavónicos⁵⁰, es un compuesto bioactivo de grandes potencialidades para el tratamiento como anticaries^{36,39,47}, antimicótico⁴⁷, antiviral, analgésico⁵¹, anestésico⁵², sedante⁵³, e inmunomodulador^{54,55}.

Este compuesto ha sido y es usado en odontología actualmente en una gran variedad de entidades como úlceras bucales, heridas sépticas faciales, gingivitis, periodontitis y alveolitis, ayudando también al proceso de reparación y cicatrización⁵⁶ de las fibras colágenas y fibroblastos^{39,57}, contribuyendo con la cicatrización^{54,58,59}, porque estimula la regeneración epitelial^{59,60}.

Diversas investigaciones en odontología ponen de manifiesto las propiedades del quitosano⁴ y del propóleo³¹, en el caso del quitosano se ha demostrado a través de la evidencia clínica la regeneración osteomucosa producida por membrana de quitosano²⁷, la efectividad de los liposomas de quitosano en la regeneración ósea alveolar postextracción dental⁴, de las esponjas de quitosano como materiales de andamiaje para crecimiento osteoblástico³⁰ y el quitosano como coadyuvante en el tratamiento de la periodontitis crónica⁶¹.

Por otro lado, sobre el propóleo, se ha evidenciado que tiene acción antimicrobiana y de medicación intraconducto a corto plazo frente a cepas estandarizadas de *E. faecalis*⁶². El propóleo puede ser usado con éxito en el tratamiento de la enfermedad periodontal, como medio de protección, en epitelización de heridas y aceleración de la cicatrización⁶³, en pacientes con alveolitis⁶⁴, contra algunas bacterias anaerobias estandarizadas que causan infecciones en cavidad bucal⁶⁵.

En conjunto el quitosano y el propóleo se han empleado como barniz de liberación sostenida a base de quitosano, para prevención de la caries³⁷, así como en la elaboración de un gel de quitosano/propóleo para comparar la eficacia de este sobre las cepas *Enterococcus faecalis*⁴².

A pesar de las propiedades antes expuestas, no se han encontrado estudios previos acerca de las propiedades químicas y microbiológicas de membranas de quitosano/ propóleo con posible utilidad en la regeneración de tejidos blandos en cavidad bucal. Por este motivo se ha decidido emprender la siguiente investigación, a fin de analizar las propiedades químicas y microbiológicas de éste compuesto de posible utilidad en la regeneración de tejidos blandos en cavidad bucal.

Lo cual se logrará determinando el valor pKa del gel de quitosano a través de una titulación ácido base, identificando velocidad de liberación de propóleo de las membranas en agua destilada mediante pruebas de espectroscopia UV-visible y determinando la susceptibilidad de *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, frente a las membranas de quitosano-propóleo. Empleando para dar cumplimiento a tales objetivos, métodos que resultan ideales por motivos de economía, tiempo y precisión de resultados⁶⁶. Datos que resultarán de interés, pues las propiedades químicas y biológicas de los compuestos influyen sobre la funcionalidad de estos materiales, debido a que sobre éstos es donde se realizan las condiciones de reacción⁹.

1.2 Objetivos de la investigación

1.2.1 Objetivo general

Analizar las propiedades químicas y microbiológicas de las membranas de quitosano/propóleo de posible utilidad en la regeneración de tejidos blandos en cavidad bucal.

1.2.2 Objetivos específicos

- Establecer el valor pKa de las membranas de quitosano/propóleo elaboradas a diferentes concentraciones.
- Identificar la velocidad de liberación de propóleo de las membranas en agua destilada, así como la homogeneidad en su composición, mediante espectroscopia UV-visible, en intervalos de tiempo constantes.
- Determinar la elaboradas susceptibilidad de *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* frente a membrana de quitosano-propóleo con 0.5 ml de propóleo.

1.3 Justificación

La investigación sobre elementos empleados en la terapia de recuperación de tejidos post cirugía bucal pone de manifiesto al propóleo como compuesto bioactivo de grandes potencialidades para el tratamiento como antiséptico, cicatrizante de heridas y antiinflamatorio e incluso anticaries^{45,60,67} y por otro lado, al quitosano útil

para reducir la inflamación, controlar la proliferación microbiana, proteger, ayudar reparar las encía y la mucosa oral en tratamientos periodontales y periimplantarios⁸.

Sin embargo, a pesar de las potencialidades de ambos materiales existe un vacío en el área del conocimiento en relación a las propiedades químicas y microbiológicas de membranas de quitosano/propóleo de posible utilidad en la regeneración de tejidos blandos en cavidad bucal. Razón por la cual surge la presente investigación, buscando proporcionar a la práctica clínica una alternativa simple, estándar y reproducible para la regeneración de tejidos blandos a través del uso de éste compuesto, acelerando la cicatrización de tejidos blandos y potenciando la actividad antimicrobiana de ambos, beneficiando de ésta manera a pacientes que se enfrenten a técnicas quirúrgicas.

Es por esta razón que surge la imperiosa necesidad de analizar las propiedades químicas y microbiológicas de membranas de quitosano/propóleo de posible utilidad en la regeneración de tejidos blandos en cavidad bucal, a través de la determinación del valor pKa del gel de quitosano que condicionará la capacidad bioadhesiva de las membranas, dicho valor será obtenido a través de una titulación ácido-base por potenciometría, a ser conveniente por razones de economía de tiempo y de la precisión de resultados^{66,68}.

Igualmente para el cumplimiento del propósito de este estudio se identificará la velocidad de liberación del propóleo, que resulta relevante, pues al implementar tecnologías de liberación controlada se presentan ventajas de dosificación con respecto a otras presentaciones, entre ellas se encuentran la disminución de los efectos colaterales secundarios, el tiempo de actividad prolongado y la protección a fármacos sensibles de ataques enzimáticos o degradación ácida debido al pH local, entre otros⁶⁹. Éste objetivo será cumplido empleando la espectroscopia UV-visible, por ser un método con simplicidad operacional, elevada velocidad analítica, bajo costo y posibilidades de uso en sistemas de control on-line⁶⁸.

Así mismo, se determinará la susceptibilidad de *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* frente a la membrana de quitosano-propóleo con concentración de 0,5 ml, es decir, aquella que hayan sido elaborada con la mayor cantidad de propóleo (estudio realizado solo en una membrana por motivos de

economía, y a fin de alcanzar una concentración más rápida en la totalidad del medio de cultivo) y mantengan adecuadas propiedades físicas, cepas seleccionadas, por ser microorganismos exógenos, que no producen afección típica bucal, pero que, en base a la gran cantidad de factores de virulencia y a que son patógenos en otros sitios orgánicos, dificultan el tratamiento de estas afecciones⁴³.

De este modo, el presente estudio tiene su fundamento en la en búsqueda de tratamientos en el área de cirugía bucal, que sean capaces de inducir la regeneración a través de la estimulación osteoblástica y fibroblástica, proporcionando así, un mayor volumen del tejido en el proceso de cicatrización, logrando un efectivo control de la inflamación y dolor, siendo una alternativa accesible económicamente en contraste con otras técnicas^{2, 31}.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

En la presente sección, se consideran aspectos teóricos fundamentales del estudio. En este sentido, se incluyen una serie de estudios previos en relación a la presente investigación, ordenados de forma temática en relación a los objetivos planteados: Membranas tridimensionales de hidroxiapatita y quitosano como terapéutica en regeneración ósea guiada, velocidad de liberación de sustancias en membranas de quitosano, quitosano y propóleo en tratamientos dentales, efectividad del quitosano en el proceso de regeneración ósea y tisular posterior a la extracción dental, efectividad del propóleo en los procesos de regeneración tisular de alvéolos dentales post exodoncia, quitosano en otros procesos de regeneración en boca, propóleo en otros procesos de regeneración en boca, quitosano en Odontología, propóleo en Odontología, propiedades del Propóleo en tratamientos no bucales y finalmente propiedades del Quitosano en tratamientos no bucales.

2.1.1 Membranas tridimensionales de hidroxiapatita y quitosano como terapéutica en regeneración ósea guiada

Velazco et al⁹ en el 2014, diseñaron membranas tridimensionales a base de materiales biocompatibles quitosano e hidroxiapatita para ser utilizadas en la regeneración ósea guiada. Las membranas fueron empleadas en paciente masculino, posterior a la realización de apicectomia de pieza dental 22 (motivado a quiste

periapical), el primer registro radiográfico se realizó al mes, observando una disminución de la circunferencia del defecto, aumento de la radio opacidad característica del tejido y a los tres meses, se evidenciaron islotes óseos típicos de proliferación celular. Logrando demostrar que el desarrollo andamiajes tridimensionales a base de hidroxiapatita y quitosano proporcionan una adecuada proliferación celular, percibiéndose como la respuesta a una más rápida eficiente mineralización del tejido óseo dañado.

Dicho estudio resulta de interés a la presente investigación por presentar una metodología reproducible y práctica para la elaboración de la solución de quitosano. Asimismo, arrojando resultados que aseveran las razones que justifican este estudio, como lo es la importancia de la morfología final de los compuestos sobre la funcionalidad de los materiales.

2.1.2 **Velocidad de liberación de sustancias en membranas de quitosano**

Arias, Ortiz y Velasco⁷⁰ en el año 2017, realizaron un estudio en el cual se determinó la velocidad de liberación de Metronidazol (MTZ) incorporado en películas de quitosano, usarlo como medio para la liberación salivaria artificial. Se prepararon películas de quitosano mezclado con metronidazol y se estudió la interacción polímero-fármaco a través de espectroscopia infrarroja, mostrando la incorporación del principio activo en la matriz polimérica. Encontrándose diferentes mecanismos de liberación dependiendo del grosor de la película de quitosano.

Siendo útil para la presente investigación pues demuestra la efectividad de técnicas electroquímicas para la determinación de velocidad de liberación en un medio que simule las condiciones bucales como saliva artificial a temperatura de 37°C y pH 5-7⁷⁰.

2.1.3 **Quitosano y propóleo en tratamientos dentales**

Luaces⁴² en el año 2017, comparó la eficacia antibacteriana del chitosan/propóleo en gel, con la del hidróxido de calcio (Calcifar-P), la clorhexidina en gel al 2%, el extracto de propóleo al 30% y el gel de chitosan sobre el *Enterococcus faecalis*, con la finalidad de implementar el uso de medicamentos intraconducto, de origen natural. Este proyecto fue ejecutado a través de un estudio in

vitro, obteniendo como resultado mayor halo de inhibición del microorganismo por el gel de quitosano/propóleo. Pudiendo concluir que el gel de quitosano/propóleo tiene mejor eficacia antimicrobiana con respecto a los demás.

Franca et al³⁷ en el 2014, produjeron tres formulaciones de barniz de quitosano a base de propóleo (PCV) por disolución de propóleo con quitosano en vehículo hidroalcohólico, estos con diferentes concentraciones (5% 10% y 15%), con la finalidad de crear un barniz útil en la prevención de placa cariogénica, empleando dientes bovinos para comprobar en éstos la adherencia de revestimientos y la liberación controlada de propóleos asociados con barniz. Resultando formulaciones con adhesión superficial al diente, capaces de formar películas muy rápidas sobre la superficie del diente bovino y llegando a la conclusión de que los barnices de quitosano a base de propóleo mostraron una actividad antimicrobiana similar o mejor que el barniz de clorhexidina contra todas las bacterias patógenas orales, demostrándose que todas las formulaciones desarrolladas transformaron el barniz de 5% 10% y 15% en productos adecuados para la aplicación clínica en el campo de la prevención de caries dental.

2.1.4 Efectividad del quitosano en el proceso de regeneración ósea y tisular posterior a la extracción dental.

En este apartado se establece un estudio basado en el uso de quitosano, biomaterial objeto de estudio en la presente investigación y su efectividad en la regeneración ósea alveolar y de tejidos blandos, posterior a la extracción dental.

Quiroz et al⁴ en el año 2016, determinaron la efectividad de los liposomas de quitosano en la regeneración ósea alveolar postextracción dental, implicando este procedimiento una pérdida ósea importante producto de la osteotomía necesaria para liberar al diente de su alvéolo e igualmente conllevando a un proceso de reabsorción ósea progresiva durante la cicatrización alveolar, por la falta de estimulación ósea debido a la ausencia de la articulación alvéolo dentaria, dicho estudio fue realizado en pacientes que asistieron al Curso de Perfeccionamiento en Cirugía Bucal, trabajando con un grupo control y uno experimental a los cuales se les aplicó los liposomas de quitosano, los resultados arrojaron una regeneración tisular mayor en el grupo

experimental y diferencias no significativas en densidad ósea. Concluyendo que los liposomas de quitosano son coadyuvantes para disminuir el edema del área y el dolor postoperatorio.

2.1.5 Efectividad del propóleo en los procesos de regeneración tisular de alvéolos dentales post exodoncia.

Azua y Chumi⁵⁶ en el 2016 realizaron un estudio para comprobar la eficacia del Propóleo al 10% en la cicatrización del alvéolo dental post exodoncia, con la finalidad de conocer los beneficios y propiedades del propóleo al 10% en el proceso de cicatrización y regeneración tisular del alveolo dental tras realizar una exodoncia, para ello realizaron un estudio experimental, aplicando al grupo experimental propóleo por siete días y solo evaluando al grupo control semanalmente. Resultando en una regeneración tisular más rápida en el grupo experimental. Determinando lo beneficioso del propóleo en la cicatrización alveolar.

2.1.6 Quitosano en otros procesos de regeneración en boca.

Gómez et al²² en el 2013, analizaron las capacidades regenerativas y de cicatrización del quitosano a través de una revisión de la literatura, con la finalidad de encontrar opciones de biomateriales en el tratamiento médico-odontológico, resultando de esta investigación que el uso de quitosano favorece la regeneración ósea y la cicatrización de tejidos blandos e igualmente puede ser empleado como vehículo liberador de sustancias como clorhexidina para el control de placa y membrana de barrera para regeneración tisular guiada. Concluyendo de esta forma que el Quitosano ofrece una oportunidad para desarrollar nuevos métodos de terapia periodontal; recomendando realizar más investigaciones que amplíen su gama de aplicaciones orales.

Velazco et al⁹ en el 2014, diseñaron membranas tridimensionales a base de materiales biocompatibles quitosano e hidroxiapatita para ser utilizadas en la regeneración ósea guiada, para ello se realizó a un paciente masculino de 42 años de edad, con diagnóstico de quiste periapical en el 22, apicetomía de ésta pieza y

colocación de la barrera, resultando evidente en los registros radiográficos islotes óseos típicos de proliferación celular. Concluyendo que el desarrollo andamiajes tridimensionales a base de hidroxiapatita y quitosano permite una óptima proliferación celular, vislumbrándose como la respuesta a una más rápida eficiente mineralización del tejido óseo dañado.

Leo et al² en el año 2014, estudiaron biomateriales (hidroxiapatita, tejido conectivo, quitosano, tejido óseo y plasma rico en factores de crecimiento) para la regeneración del reborde alveolar, con el fin de sintetizar los resultados obtenidos en los últimos quince años con el fin de informar a la comunidad odontológica la efectividad de los mismos ante una extracción dental traumática, destrucción periodontal avanzada, fractura radicular con pérdida de hueso adyacente. Este estudio fue realizado a través de una revisión sistemática, en el cual reportan la efectividad del quitosano frente a la extracción dental, resultado una mejor cicatrización y escasa acumulación de placa.

Yang Jo et al³⁰ en el año 2004, realizan un estudio para demostrar la formación ósea y las propiedades como andamios en ingeniería tisular de las esponjas de quitosano. A través de un diseño experimental, en el cual se hicieron crecer osteoblastos de calota de rata en esponjas de quitosano. Los resultados corroboraron que ocurrió formación ósea dentro de las esponjas. Demostrando que las esponjas de quitosano pueden ser utilizadas como materiales eficaces de andamiaje para la formación de hueso y en ingeniería tisular.

Ortega et al¹¹ en el año 2012, comparan la regeneración ósea obtenida con quitosano y plasma rico en fibrina (PRF) sobre alveolos dentales postextracción, aplicando un diseño experimental a través de la selección de 5 pacientes que acudieron al Centro de Investigaciones Odontológicas, presentando cordales inferiores bilaterales con indicación de extracción, en un alveolo se aplicó quitosano y en el otro PRF. Resultando que ambos biomateriales regeneraron los tejidos, con diferencia, que el PRF en menor tiempo y el quitosano con mejor organización estructural. Así, concluyeron que ambos biomateriales pueden ser opciones de tratamiento en la regeneración ósea guiada de tejidos.

Kekhasharú et al²³ en el año 2013 realizan un estudio acerca de las aplicaciones del quitosano en el área odontológica, en la búsqueda de nuevos materiales que permitan de forma cada vez más eficaz, controlar o prevenir el apareamiento de infecciones. Evidenciando este estudio las propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, cicatrizante del quitosano y pudiendo concluir que es de gran interés su aplicación en la odontología

2.1.7 Propóleo en otros procesos de regeneración en boca

Azua y Chumi⁵⁶ en el 2016 realizaron un estudio para comprobar la eficacia del Propóleo al 10% en la cicatrización del alvéolo dental post exodoncia, con la finalidad de conocer los beneficios y propiedades del propóleo al 10% en el proceso de cicatrización y regeneración tisular del alveolo dental tras realizar una exodoncia, para ello realizaron un estudio experimental, aplicando al grupo experimental propóleo por siete días y solo evaluando al grupo control semanalmente. Resultando en una regeneración tisular más rápida en el grupo experimental. Determinando lo beneficioso del propóleo en la cicatrización y regeneración

Anuniri et al⁴⁵ en el 2012 estudiaron el efecto del propóleo sobre la regeneración de la dentina y el papel potencial de la célula madre de la pulpa dental en conejillos de Indias, para evaluar del efecto del éste material bioactivo sobre dentina y pulpa dental. Para la realización de este estudio experimental, se seleccionaron un total de 48 incisivos maxilares y mandibulares de conejillos machos, cuyas coronas fueron cortadas y divididos al azar en un grupo experimental con propoleo y un grupo control de hidróxido de calcio. Arrojando como resultados que el propóleo tiene ventajas sobre el hidróxido de calcio como un agente de cobertura en la terapia de pulpa vital; concluyendo que puede usarse como material de recubrimiento directo pulpar para conserva la salud y función de ésta.

2.1.8 Quitosano en Odontología

Araujo et al²⁵ en el 2015, realizaron un estudio comparativo histológico de la eficiencia del xerogel y liposoma a base de Quitosano para el tratamiento de la osteítis alveolar en ratas Wistar, con la finalidad de buscar tratamientos alternativos que no genere efectos adversos como en ocasiones los generan algunas terapias

convencionales. Para ello se realizó un estudio experimental preclínico descriptivo, realizado en 15 ratas Wistar machos, adultas, a los cuales se les extrajo el incisivo superior derecho y se indujo la osteítis alveolar, dividiendo la muestra en tres grupos, grupo control, grupo xerogel y grupo liposoma. Resultando que la regeneración del alvéolo es semejante con el liposoma y el xerogel. Concluyendo que tanto el liposoma como el xerogel a base de quitosano representan una excelente terapéutica para la osteítis alveolar, siendo más eficiente el liposoma.

Suarez et al²⁹ elaboraron un gel de quitosano como propuesta terapéutica para la estomatitis subprotésica (ESP), a fin de producir nuevos biomateriales, previniendo y tratando enfermedades bucales catalogadas como problemas de salud pública aún no erradicados, obteniendo el quitosano por desacetilación termoalcalina de exoesqueletos de camarones con su posterior transformación en gel vía templado ácido en medio acuoso. Resultando esta formulación útil en procesos de regeneración de queratocitos, fibroblastos, y estimulador de otras células mediadores de la inflamación, así como de acción antibiótica, biocompatibilidad y escasa citotoxicidad. Lo cual permite perfilar este gel como el candidato de elección para el tratamiento de la ESP y de otras patologías inflamatorias en Odontología.

Paz et al⁶¹ en el año 2012 determinaron la efectividad del quitosano como coadyuvante en el tratamiento de la periodontitis crónica. Al ser esta, una patología infecciosa, de origen multifactorial cuya terapia mecánica no es suficiente para eliminar los microorganismos en su totalidad se realizó este estudio, en busca de tratamientos locales efectivos, por medio de un estudio experimental, en el que participaron 12 pacientes diagnosticados con periodontitis crónica, a los cuales se les realizó: al grupo control raspado y alisado radicular y al grupo experimental raspado y alisado radicular más aplicación de quitosano. Resultando ser el quitosano estimulador de las células mediadoras de la inflamación, antimicrobiano, además de ser biocompatible, permitiendo concluir entonces que, la mejoría de la enfermedad, está asociada significativamente a la aplicación de quitosano como tratamiento complementario al raspado y alisado radicular.

Trepiana²⁰ en el año 2015, sintetizó suspensiones basadas en nanopartículas de cobre y quitosano, y evaluó sus propiedades antimicrobianas sobre el patógeno *Streptococcus mutans*, para la búsqueda de un agente químico antimicrobiano ideal. Este estudio fue realizado a través de la caracterización de partículas de carácter nanométrico, utilizando reactivos biocompatibles, presentando mejores resultados sobre el biofilm aquellas partículas que tenían quitosano. Concluyendo que tanto las nanopartículas de cobre, de quitosano y sus combinaciones presentaron actividad antimicrobiana frente al patógeno *Streptococcus mutans*.

2.1.9 Propóleo en Odontología

Premoli et al³¹ en el año 2008 realizan un estudio para proporcionar una visión actualizada sobre el uso del propóleo en el área de odontología, en la búsqueda de nuevas alternativas de la medicina, a través de una revisión de la literatura. Resultando que la utilización de este compuesto bioactivo tiene importantes efectos antimicrobianos, antiinflamatorios y anticariogénicos, así como otros usos en odontología como es la estimulación de la generación de la dentina, impedimento tanto de la formación de caries como de placa dental sin ninguna contraindicación, reacciones alérgicas, ni toxicidad por sobredosis. Evidenciando entonces, que el propóleo es una sustancia compatible y complementaria de otras prácticas terapéuticas, por la cual debe ser considerado como agente terapéutico en la práctica odontológica.

Felitti⁶³ en el año 2014 realiza un estudio con el fin de actualizar los usos que se le pueden dar al propóleo en las diferentes patologías bucales, a través de una revisión de la literatura. Resultando ser el propóleo una sustancia empleada en patologías como enfermedades periodontales, caries, tratamientos endodónticos, prótesis, etc, resaltando sus cualidades antioxidantes en el tratamiento del individuo como paciente en general. En consecuencia este biomaterial es utilizado en múltiples investigaciones relacionado al tratamiento de patologías bucales.

Kumar³² en el año 2014, realizó un estudio con la finalidad de revisar el propóleo y sus aplicaciones en odontología incluyendo el cáncer oral, ello por la escasa información sobre el propóleo. El estudio fue realizado a través de una revisión

bibliográfica. Resultando ser eficaz como producto de higiene bucal y tratamiento de la candidiasis oral, estomatitis dentaria, infecciones virales, estomatitis aftosa, cirugía oral, endodoncia y ortodoncia. El uso de sustancias naturales como el propóleo busca la quimioprevención con menos efectos secundarios. Así pues, el propóleo es un biomaterial con múltiples aplicaciones en odontología.

Vaculik et al⁵² en el 2014, estudiaron los efectos antimicrobianos del propóleo sobre los *Streptococos mutans*, para ello se emplearon cepas tomadas de pacientes con actividad de caries, a las cuales colocaron la solución de propóleo (EEP) utilizando como diluyente una solución alcohólica al 55%v/v, arrojando como resultados un efecto inhibitorio a concentraciones del 10% sobre *Streptococos mutans*, concluyendo así, que el propóleo tiene propiedades beneficiosas aportando una alternativa de significancia para nuevos tratamientos.

Gómez et al⁶⁴ en el 2008, determinaron la efectividad del uso del propóleo al 5% en el tratamiento de la alveolitis, a través de un estudio observacional descriptivo de carácter retrospectivo, para ello se contó con una muestra de 10 pacientes con alveolitis pertenecientes a los Consultorios Médicos de la Familia (CMF) 3 y 9 en el período comprendido desde febrero del año 2005 a marzo del año 2006, demostrando como resultados las propiedades antibióticas, antioxidantes y antiinflamatorias del propóleo al 5%. Concluyendo que este producto es efectivo en el tratamiento de la patología que se analizó.

Cujano⁴³ en el 2016 realizaron un estudio in vivo encaminado a conocer el efecto antimicrobiano del propóleo sobre los microorganismos causantes de la gingivitis. La investigación se llevó a cabo en la “Unidad de Atención Odontológica UNIANDES” en donde se realizó la toma de muestras en 8 pacientes antes y después de la aplicación del propóleo. Resultando en las muestras tomadas posteriormente a la aplicación la inexistencia de crecimiento de mohos y levaduras. Pudiendo concluir que el propóleo es efectivo en las afecciones gingivales de la cavidad bucal.

Dodwad y Kukreja⁴⁷ en el año 2017 realizan un estudio para investigar la efectividad de un enjuague bucal con propóleo en la inhibición de la formación de placa y el mejoramiento de la salud gingival. Este estudio fue desarrollado sobre

treinta sujetos asignados al azar, divididos en tres grupos de diez sujetos cada uno, un grupo recibió enjuague bucal con propóleo, un grupo control negativo (Salina) y un control positivo (Chlorhexidine 0,2%). El enjuague bucal con clorhexidina resultó ser mejor que el propóleo y la solución salina para inhibir la formación de placa. El presente estudio sugiere entonces que el propóleo podría ser utilizado como enjuague bucal natural, siendo una alternativa a los enjuagues bucales químicos, por ejemplo, la clorhexidina.

Reyes³⁹ en el 2010 determinó la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano (EEPP) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica, tomando como control positivo a la clorhexidina 0,12 %. Para lo cual se seleccionaron 15 pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica, tomando muestras de estos e incubándolas en soluciones experimentales. Comprobando que existe una mayor actividad antibacteriana del EEPP que la clorhexidina 0,12 % sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica. Pudiendo concluir que, EEPP presenta actividad antibacteriana in vitro sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.

Awawdeh et al⁶² en el año 2009, investigaron la eficacia del propóleo e hidróxido de calcio como un medicamento intracanal a corto plazo contra Enterococcus faecalis. A través de un estudio de laboratorio, empleando modelos de dentina infectados y comparando su eficacia antimicrobiana con la de la pasta de hidróxido de calcio cuando se utiliza como medicamento a corto plazo. Los resultados demostraron que el propóleo era significativamente más eficaz que el hidróxido de calcio no fijado contra E. faecalis después de la aplicación a corto plazo. Concluyendo que el propóleo es muy eficaz como medicamento intracanal en la eliminación rápida de E. faecalis in vivo.

Cerda⁵¹ en el año 2017 compararon el efecto de propóleo ecuatoriano al 50%, el gluconato de clorhexidina al 2% y el hipoclorito de sodio al 1% en la inhibición del Enterococcus faecalis, con el fin de contribuir con los estudios que determinan que al utilizar una solución irrigante en la terapia pulpar a base de compuestos naturales se

logra una actividad antimicrobiana contra una amplia gama de microorganismos patógenos, demostrando que existen productos alternativos dentro de la fitoterapia, como el propóleo que se podría potencializar su uso para la terapia pulpar en dientes primarios, en comparación con otras soluciones irrigantes.

Bravo et al⁵³ en el año 2012 compararon la efectividad entre el tratamiento con tintura de propóleos al 5 % y el tratamiento farmacológico convencional en pacientes diagnosticados con alveolitis dental, a través de un estudio descriptivo, prospectivo, de corte longitudinal de casos y controles, como resultado se obtuvo en el grupo experimental la remisión de síntomas entre el segundo y tercer día, mientras que el grupo control requirió más tiempo. Concluyendo que el tratamiento con tintura de propóleos al 5 % resultó altamente efectivo, pues aportó una remisión más notoria de los síntomas.

2.1.10 Propiedades del Propóleo en tratamientos no bucales

Castaldo y Capasso³³ en el año 2002, estudiaron el propóleo como remedio utilizado en medicina moderna, a través de una revisión de la literatura. Evidenciando como principal uso externo, el ser una sustancia antiséptica y cicatrizante; el segundo uso interno en el tratamiento de las úlceras gastroduodenales, igualmente el propóleo parece también ofrecer beneficios a pacientes con enfermedades inflamatorias. Siendo así empleado durante siglos en multiplicidad de dolencias humanas.

Farré et al⁵⁰ en el 2004, revisaron las pruebas disponibles en la literatura sobre las propiedades del propóleo en el tratamiento y prevención de distintos tipos de trastornos, a través de la búsqueda de información bibliográfica, arrojando como resultado de dicha búsqueda que el propóleo posee eficacia, especialmente, como antioxidante, antiinflamatorio y antimicrobiano.

Noriega⁵⁴ en el año 2014 revisan diversos estudios, enfocados a demostrar las propiedades farmacológicas del propóleo y sus aplicaciones como agente terapéutico en el tratamiento de patologías. De este modo, la presente revisión se lleva a cabo a través de documentos realizados en su mayoría en humanos por medio de ensayos clínicos y estudios experimentales. Resultando ser el propóleo una sustancia con propiedades antioxidantes, antibacterianas, antivirales, fungicidas, cicatrizantes,

antiinflamatorias, anestésicas, inmunomoduladoras y antitumorales. Siendo este un agente terapéutico en el tratamiento de patologías.

2.1.11 Propiedades del Quitosano en tratamientos no bucales

Lemus et al²⁸ realizan una investigación acerca de la obtención y uso de quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueleto de camarón, logrando generar un aporte a la industria farmacéutica de un biomaterial aplicable en el tratamiento de todo tipo de heridas, quemaduras, úlceras, entre otros. Para ello fabricaron el quitosano a partir del exoesqueleto de camaron y utilizaron el quitosano para la reconstrucción dérmica en seres humanos. Resultando ser el quitosano un biopolímero, cuyas propiedades encajan perfectamente con aquellas cualidades necesarias para ser un injerto en cualquier tipo de heridas.

2.2 Bases conceptuales

2.2.1 Microbiología en cavidad bucal

La microbiota bucal es uno de los ecosistemas microbianos más antiguos en ser reconocido y con una amplia diversidad que hace que sea importante comprender cómo están constituidas estas comunidades de microorganismos, cómo interactúan y mantienen su homeóstasis en el ser humano, teniendo en cuenta que esta cavidad es la puerta de entrada de posibles infecciones del sistema gastrointestinal y respiratorio. Entender la microbiota bucal es una tarea compleja⁷¹, debido a la gran variedad de hábitats, que dependen de las concentraciones de oxígeno, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, la exposición a factores inmunológicos y las características anatómicas de los seres humanos⁷².

Se estima que alrededor de 400 especies diferentes son capaces de colonizar la boca y que cualquier persona puede albergar 150 o más especies diferentes. Los recuentos en zonas subgingivales oscilan desde 103 y 108 en las bolsas periodontales profundas⁷³.

Estudios poblacionales han utilizado técnicas genómicas basadas en microarrays del gen 16S rRNA y han confirmado que los principales phylum aislados en la

cavidad bucal son: Firmicutes, Proteobacteria, Bacteriodes, Actinobacteria y Fusobacteria. También se ha determinado que los géneros bacterianos presentes en ella son: Streptococcus, Actinomyces, Veillonella, Fusobacterium, Porphyromonas, Prevotella, Treponema, Neisseria, Haemophilus, Eubacterias, Lactobacterium, Capnocytophaga, Eikenella, Leptotrichia, Peptostreptococcus, Staphylococcus y Propionibacterium⁷².

La función de la microbiota oral es impedir la implantación de patógenos oportunistas, colaborando con los mecanismos de defensa del hospedador para controlar el crecimiento y reproducción del micro-ecosistema que habitan en la cavidad bucal. Cuidar la composición de estos microsistemas bióticos permite prevenir enfermedades locales y disminuir las consecuencias asociadas a problemas que tengan relación con su permanencia en la boca⁴³.

Además de la microbiota bucal antes reflejada y considerada habitual, es importante tener en cuenta las bacterias causantes de sobreinfecciones, donde se aíslan enterobacterias como la *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, y otras. Estos son también microorganismos exógenos, que no producen afección típica bucal, pero se supone, en base a la gran cantidad de factores de virulencia y a que son patógenos en otros sitios orgánicos, dificulten el tratamiento de estas afecciones⁴³.

Algunos patógenos humanos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Acanthamoeba* spp. pueden alojarse en la biopelícula. Entre ellos, *P. aeruginosa* representa entre 75 y 100% de la flora recuperada de las líneas de agua de las unidades odontológicas. Dicha bacteria puede causar enfermedad en individuos con defensas reducidas cuando se aloja en zonas como la mucosa y piel lesionada, generando cuadros de fiebre, shock, oliguria, leucocitosis o leucopenia, coagulación intravascular diseminada e inclusive síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto⁷⁴.

Por otro lado, se ha evidenciado la presencia de *Klebsiella pneumoniae* en clínicas dentales, enterobacteria y patógeno oportunista que suele colonizar a pacientes hospitalizados. Ésta es la especie de mayor relevancia clínica dentro del

género *Klebsiella*. Diversos estudios mencionan que estos patógenos hospitalarios son persistentes debido a su resistencia a múltiples antimicrobianos y desinfectantes⁷⁵.

2.2.2 Generalidades sobre regeneración tisular post cirugía bucal.

Dentro de los procedimientos quirúrgicos bucales que se lleva a cabo con más frecuencia en cirugía bucal, se encuentra la extracción dentaria⁷⁶. Éste a pesar de ser un procedimiento rutinario y usualmente electivo, ha reportado complicaciones entre 2,6% hasta 30,9%⁷⁷, produciendo en la mayoría de los casos malestar leve, y reparando rápidamente⁷⁸.

Dentro de las complicaciones más comunes reportadas están la parestesia del nervio alveolar inferior, alveolitis, hemorragia, dolor e infección⁷⁷. La infección tiene su razón en las condiciones idóneas que ofrece la cavidad bucal para que la flora bacteriana genere las biopelículas. Por un lado, facilitando la multiplicación con condiciones favorables de temperatura, humedad y aporte de nutrientes por parte de la saliva y del líquido gingival pre icular originado en el epitelio libre de la encía; y por otro lado, ofreciendo una amplia superficie dental a la cual adherirse⁷⁹.

Así pues, la cirugía bucal no complicada tiene un bajo riesgo de infección. Sin embargo, existen factores que podrían incrementar dicho riesgo como el tiempo de intervención, si la cirugía es invasiva (en el caso de unidades dentales incluidas) y si ha habido una infección previa o si se coloca un cuerpo extraño⁷⁹. Por esta razón, resulta primordial el uso de un antimicrobiano bactericida de amplio espectro por la naturaleza polimicrobiana y mixta de cavidad bucal, buscando así una correcta reparación⁸⁰.

Las cirugías bucales producen una serie de cambios dimensionales que afectan tanto a los tejidos duros como a los tejidos blandos ocasionando frecuentemente defectos en el reborde alveolar⁸¹ y un proceso inflamatorio en las siguientes 24 a 72 horas⁷⁸. La cicatrización es un fenómeno que se genera posterior a un evento traumático o quirúrgico que afecta la integridad de los tejidos, logrando la activación

progresiva de procesos biológicos para restablecer las condiciones del tejido lesionado, por medio de la regeneración⁵.

La prevención y el tratamiento de dichos defectos, tiene como objetivo la preservación o el aumento de los tejidos duros y/o blandos para mejorar las condiciones del reborde para una futura restauración protésica. Existen diversas técnicas quirúrgicas encaminadas a prevenir o minimizar los cambios dimensionales en alveolos postextracción (técnicas de preservación de alvéolo) y otras destinadas a la reconstrucción de dichas alteraciones anatómicas.

En general, en defectos pequeños o moderados una técnica de aumento de tejidos blandos puede ser suficiente. A pesar de ello, en defectos más severos o en aquellas zonas con localizaciones en las que se planifique la posterior colocación de implantes, el empleo de un enfoque combinado (aumento de tejidos duros y blandos) y/o en distintas fases puede ser necesario⁸¹.

En este sentido, a fin de combatir la serie de síntomas y signos propios de técnicas quirúrgicas en cavidad bucal, surge la regeneración tisular guiada (RTG) concepto basado no solo en la reparación de los defectos periodontales, sino también en la regeneración de los tejidos de soporte perdidos, cuyo principio biológico básico es el hecho de evitar de algún modo la colonización del coágulo por parte de las células epitelio-conectivas, mediante una barrera. Este será repoblado entonces solo por células mesenquimáticas pluripotenciales indiferenciadas^{82,83}.

Uno de los objetivos más importantes de la técnica de preservación alveolar es el mantenimiento o el mejoramiento de la arquitectura gingival vestibular y del nivel de las papilas interproximales, manteniendo las características morfológicas del reborde óseo de manera que se pueda obtenerla rehabilitación de la zona preservada con resultados estéticos ideales⁸⁴.

2.2.3 Biomateriales empleados en la regeneración de tejidos blandos post cirugía bucal.

Se denomina biomaterial a los productos empleados para reproducir la función de tejidos vivos en los sistemas biológicos de forma segura, mecánicamente funcional

y aceptable fisiológicamente, que son temporal o permanentemente implantados en el cuerpo y que tratan de restaurar el defecto existente y, en algún caso, conseguir la regeneración tisular².

Con la finalidad de encontrar opciones de biomateriales en la terapéutica médica-odontológica, se han estudiado distintos materiales tanto en modelos animales como en humanos²². Dentro de los materiales empleados en la regeneración de tejidos blandos han destacado el PRP, PRGF, hidroxiapatita, tejido conectivo, propóleo y quitosano².

En este sentido, el PRP ha demostrado ser un biomaterial autólogo, de obtención rápida que puede inducir y mejorar los procesos de cicatrización, así que puede ser empleado para inducir la cicatrización del tejido blando y la regeneración ósea en el caso de problemas de retardada cicatrización luego de la extracción de terceros molares incluidos¹. El PRGF se obtiene de la sangre del paciente, realizando un concentrado de plaquetas de segunda generación que mejora la cicatrización de los tejidos duros y blandos⁸⁵.

La hidroxiapatita, según las evidencias encontradas, demuestra la cicatrización de tejidos blandos y progresiva regeneración ósea, ya que es el principal componente mineral del hueso². El aloinjerto de tejido conectivo provee una matriz para el crecimiento de células y vasos sanguíneos derivados del ligamento periodontal y del conectivo adyacente logrando así la regeneración del reborde alveolar por el aumento de tejidos blandos en anchura y altura⁸⁶.

El *propóleo*, ha demostrado poseer múltiples beneficios que ayudan durante el proceso de hemostasia y cicatrización del alveolo dental, dentro de los cuales se tienen el poder hemostático, antiinflamatorio, anestésico, cicatrizante, todas éstas, propiedades observadas durante los controles realizados por una semana⁵⁶. Por su parte, el *quitosano* ha resultado ser un biomaterial ideal en la regeneración tisular post cirugías en cavidad bucal, ello gracias a sus propiedades⁴: antimicrobiana, antiinflamatoria, cicatrizante^{23,24}, analgésica²⁵, antifúngica²⁶.

2.2.4 Quitosano

2.2.4.1 Historia del Quitosano

La quitina fue descubierta y aislada por Henry Braconnot en 1811, mientras que en 1823 el científico E. Odier encontró la misma sustancia, formando parte de la estructura de las plantas y en algunos insectos nombrándola quitina. Odier también identificó quitina en el caparazón desmineralizado del cangrejo y sugirió que es el material base del exoesqueleto de todos los insectos y posiblemente de los arácnidos⁸⁷.

El avance científico de la época cuando se realizó el descubrimiento de la quitina, no permitió que los científicos proyectaran el uso potencial de la misma. Sin embargo, debido al avance tecnológico de ese entonces, ambos científicos no se imaginaron las sorprendentes propiedades del polisacárido y sus derivados ni el enorme espectro de sus aplicaciones⁸⁷.

2.2.4.2 Descripción general.

El quitosano es un polímero derivado de quitina, cuando el grado de desacetilación (DD) de la quitina alcanza valores de alrededor de 50% y se vuelve soluble en medios ácidos acuosos¹⁶. Estos productos bioquímicos se pueden obtener a partir del tratamiento químico de exoesqueleto de crustáceos entre ellos el camarón (también se encuentra en insectos, moluscos y hongos).

2.2.4.3 Composición química.

Como se describió anteriormente el quitosano es un polímero de quitina, se obtiene por modificación química de la quitina, la cual es tratada con una solución alcalina concentrada y caliente, el polímero que se obtiene posee ciertas características químicas y físicas de gran interés industrial²⁸. Comprende copolímeros de glucosamina y N- acetilglucosamina⁴².

La quitina es fácil de obtener del exoesqueleto de camarones o cangrejos, para ello se requiere un tratamiento químico con el fin de remover los pigmentos, las sales tales como el carbonato de calcio y las proteínas que se encuentran asociadas con ella. La obtención de quitosano se realiza por medio de un tratamiento con álcali concentrado y caliente²⁸.

El proceso químico suele llevarse a cabo mediante procesos homogéneos y heterogéneos. La desacetilación homogénea comienza con una eventual disolución de

la quitina en frío mediante la utilización de una relación de quitina a hidróxido de sodio. La desacetilación heterogénea se lleva a cabo en soluciones acuosas de hidróxido de sodio o de potasio bajo condiciones severas de calor². El grado de deacetilación (%DA) puede ser determinado por espectroscopia NMR y el % DA en quitosano está en el rango de 60-100 %.

2.2.4.4 Propiedades biológicas del quitosano.

Este biopolímero, es biodegradable, biocompatible y no tóxico, además de presentar inmunogenicidad, actividad fungicida, antiviral⁴², efecto hemostático, antitumoral e inmunoadyuvante, características que unidas a su naturaleza policationica, han estimulado su empleo en diversas aplicaciones biomédicas¹¹.

Posee propiedades mucoadhesivas, que facilitan la liberación de los principios activos directamente al tracto nasal o peri oral, contribuyendo a que la asimilación del principio sea más rápida y efectiva, de igual forma es efectivo en la neutralización de los lipopolisacáridos bacterianos. Siendo útil para el tratamiento de reconstrucción de la piel, convirtiéndolo en una película súper delgada que sirve como soporte para las células epiteliales, por medio de sus características hurectantes y bactericidas²⁸.

2.2.4.5 Mecanismos de acción.

El mecanismo de acción del quitosano en su función como agente cicatrizante es a través de la estimulación e incremento de las funciones de las células inflamatorias como los leucocitos, polimorfonucleares y macrófagos, promoviendo la organización celular⁴, e igualmente combatiendo la inflamación, a través de su capacidad para regular la liberación de agentes bioactivos, como factores de crecimiento, antibióticos y antiinflamatorios⁸⁸.

2.2.4.6 Reacciones adversas.

El Quitosano, ha demostrado propiedades regenerativas en diversos tejidos; siendo un producto de origen animal relativamente fácil de obtener y posiblemente también de menor costo que los materiales usados tradicionalmente, ya que por sus características de biocompatibilidad y factibilidad biológica es usado en medicina como estimulante en la cicatrización de lesiones extensas, presentando muy escasos

efectos adversos se ha aplicado en la regeneración de defectos óseos en odontología^{89, 90}.

Son numerosos los estudios desarrollados en relación con la aplicación de este biomaterial en cirugía ósea reconstructiva ortopédica y cráneo facial buscando siempre la menor invasión de los tejidos y la facilidad para transportar el material, ello sin presentar efectos adversos. Como se ha expresado este biomaterial puede usarse en variados formas y también puede servir de carrier a otros materiales en cirugía ósea reconstructiva tanto en Medicina como en Odontología⁸⁸.

2.2.4.7 Uso del quitosano en medicina.

En el campo de la medicina, los efectos de la quitina y el quitosano en la cicatrización de heridas han sido el foco de una gran atención, se han descrito propiedades antibacteriales y antifúngicas que impiden la proliferación de microorganismos durante el proceso de cicatrización²². Promueve el control del colesterol, la recuperación de úlceras y lesiones, posee acción antibacterial, así como antiácida²⁸. Asimismo se ha empleado en la producción de suturas quirúrgicas, como apósito de protección de heridas por su actividad hemostática y antiféctica¹¹.

Este biopolímero se ha utilizado como membrana de hemodiálisis, sutura biodegradable, sustituyente artificial de la piel, agente cicatrizante en quemaduras, sistema liberador de fármacos, para la liberación de insulina, transporte de agentes anticancerígenos, tratamiento de tumores (leucemia), control del virus del SIDA, entre otros usos en el área médica. Igualmente se ha demostrado la utilidad del quitosano en el desarrollo de sistemas mucoadhesivos para la liberación controlada de fármacos (nifedipina, propranolol e insulina) a nivel de la mucosa gástrica y bucal²⁹.

2.2.4.8 Uso del quitosano en Odontología.

En odontología el quitosano se ha utilizado posterior a procedimientos quirúrgicos como apiceptomías en fracasos endodónticos, regeneración periodontal, estomatitis sub-protésica, entre otros. Adicionalmente, el quitosano puede ser usado en varias formas físicas como membranas, hidrogeles, xerogeles, nanofibras, liposomas, microesferas, esponjas, polvo, entre otras, con diferentes propósitos,

dentro de los cuales destacan para el transporte de fármacos, transporte de factores de crecimiento y proteínas, favorecer la síntesis de colágeno y facilitar la diferenciación de células osteogénicas⁴.

El quitosano refiere ser un biopolímero altamente útil para combatir entes patógenos y lesiones inflamatorias y ulcerosas en cavidad bucal²⁹. Asimismo, estudios previos han demostrado la viabilidad del quitosano como medio de cultivo de osteoblastos; por ello es un biomaterial utilizado para la regeneración del reborde alveolar ya que una de las cualidades requeridas en los materiales a este fin es su capacidad de producir la osteoinducción a través de una adecuada proliferación celular².

2.2.5 Propóleo

2.2.5.1 Historia del propóleo.

El uso del propóleo remota desde hace tiempo atrás donde los sacerdotes del antiguo Egipto lo utilizaban para elaborar medicinas, ungüentos y cremas de embalsamar. Luego en el siglo XI, Avicena manifestó que esta sustancia posee características benéficas sobre heridas al facilitar su curación. También estudios de chinos, hindúes, romanos, persas, árabes señalaron actividad frente a infecciones febriles y los franceses en los siglos XVIII lo usaron para el tratamiento de llagas⁵¹.

Así pues, al propóleo se le ha usado para embalsamar cadáveres, como calmante y para tratamientos de infecciones, para tratar las maderas de instrumentos musicales y para cicatrizar heridas por sus propiedades antisépticas⁴³.

Posterior al descubrimiento de antibióticos como la penicilina al evidenciar sus efectos negativos, renace la iniciativa de utilizar productos alternativos naturales como el propóleo en diferentes tratamientos de salud. Así, su utilización se ha mantenido en la actualidad, realizando varias investigaciones científicas sobre el empleo de preparados a base de propóleos en los campos de la medicina y odontología^{51, 39}.

2.2.5.2 Descripción general.

El propóleo es una sustancia natural parecida a una resina pegajosa que las abejas obtienen de las resinas de la corteza de ciertos árboles. Ellas lo mezclan con

saliva y cera de abejas⁶³, es de consistencia pegajosa y color oscuro⁶⁰, con una propiedad altamente bactericida⁵⁴.

Las características morfológicas del propóleo varían según la disponibilidad de las variedades vegetales y las condiciones ambientales. Es por esta razón, que su color puede variar del pardo rojizo al amarillo verdoso y oscurecerse hasta el negro dependiendo de su origen y la edad. Posee un olor aromático característico y agradable, y de sabor fuerte y picante⁵⁴.

2.2.5.3 Características organolépticas.

En cuanto a sus características físicas, el propóleo se presenta como un producto sólido, su punto de fusión oscila desde 590°C hasta 700 u 800°C. Presenta una baja solubilidad en agua pero puede ser diluido en solventes como alcohol etílico, acetona, propilenglicol, benceno y soda cáustica; siendo el alcohol etílico el solvente más recomendado ya que permite extraer con más eficiencia los principios activos y bajas concentraciones de cera³⁹.

El propóleo suele ser aromático y en función del lugar de recolección y del clima de origen cambia la coloración, el sabor y la consistencia. Las principales características son^{39, 60, 31}.

- Aspecto: Se puede recolectar en forma de esferas, granos.
- Color: Hay variedad desde verde oscuro, amarillo, pardo, pardo oscuro, hasta negro.
- Consistencia: Suele ser espesa, presenta algunas impurezas. Blando cuando se encuentra a temperaturas superiores a 300°C, y temperatura menor de 150°C duro y quebradizo.
- Olor: Existen propóleos inodoros, aromático.
- Sabor: Por lo general amargo, picante, insípido en raras ocasiones.
- Solubilidad: Tiene baja solubilidad en agua se le puede disolver con alcohol etílico ya que es más recomendado porque permite extraer con más eficiencia los principios activos y bajas concentraciones de cera.

2.2.5.4 Composición química.

Con el fin de conocer a las posibles aplicaciones y usos del propóleo en los últimos años se ha profundizado su estudio y se ha registrado un gran progreso en establecer su composición química. Al igual que sus características organolépticas, de acuerdo a la región geográfica, sobre todo según la fuente vegetal de donde provenga esta resina, la composición química es variable y compleja⁴³.

Más de 300 compuestos químicos se han descrito en los propóleos de diversos orígenes. En general, los propóleos en bruto se componen de^{63, 54}:

- 50-55% de Resina
- 30-40% Ceras
- 5-10% de aceites volátiles
- 5% de Polen
- 5% de sustancias orgánicas y minerales.

La composición química del propóleo incluye elementos orgánicos, entre estos el mayor componente del propóleo lo representan los flavonoides, tales como ácido cafeico, quercetin, baicalina, nioocemarina, carungin y la gálica y crisina. Estos son responsables de las propiedades del propóleo, tales como la acción antimicrobiana, antioxidante y antiinflamatoria del propóleo^{42, 39, 63}.

2.2.5.5 Propiedades biológicas del propóleo.

Se han realizado numerosos trabajos con el fin de definir la actividad farmacológica de los constituyentes del propóleo y, de establecer si esos componentes son responsables, total o parcialmente, de dicha actividad. Del carácter biológico del propóleo destacan sus propiedades antioxidantes, antibacterianas, antivirales, fungicidas, cicatrizante y antiinflamatorio, anestésicas, inmunomodulador, y antitumoral⁵⁴.

Las siguientes propiedades son las más importantes⁶⁰:

- Antibacteriano: Principales responsables los flavonoides actúa sobre Gram positivos, Gram negativos, en particular con *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*. Así, la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de propóleo (EEP) es de 0.93 mg mL⁻¹ para las Gram

positivas y 7.5 mg mL⁻¹ para las Gram negativas, como *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*, demostrando que posee actividad bacteriostática parcial pero no total a 4% y actividad bactericida a 8%^{91, 92}. En relación a la concentración mínima inhibitoria (CMI), se han conseguido valores de 0,25µg/ml, y de 12µg/ml para un grupo de bacterias aerobias y anaerobias³¹.

- Antiviral: El propóleo inactiva los virus de herpes simple tipo 1 y 2. Gracias a los flavonoides.
- Antiinflamatoria: Por la presencia de flavonoides.
- Analgésica: Se debe a la presencia de flavonoides.
- Antioxidante: Se le atribuye a los compuestos fenólicos y los flavonoides que posee.
- Actividad cicatrizante: favorece la cicatrización, ya que estimula la regeneración epitelial y la microcirculación, por ello, desde la antigüedad se utiliza junto con la miel y en forma de apósitos o vendajes oclusivos, en el tratamiento de heridas y lesiones ulcerosas de diferente etiología, incluso para la lepra³⁹.

2.2.5.6 Mecanismos de acción.

El mecanismo de la actividad antimicrobiana del propóleo es complejo y puede ser atribuido al sinergismo entre algunos de sus compuestos, tales como flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos grasos, ésteres, hidroxiácidos, sesquiterpenos y otros compuestos fenólicos presentes en su composición³¹.

La actividad antimicrobiana del propóleo es mayor contra las bacterias Gram-positivas que las gram negativas. También el mecanismo de acción consiste en degradar la membrana citoplasmática de las bacterias, haciendo que las bacterias pierdan su capacidad de motilidad, transporte de membrana y síntesis de ATP, ello por la acción de la quercetina⁶⁰. Se apunta que esta capacidad bactericida se debe a la acción de flavonoides como: pinocembrina (flavonone) y galangina (flavonoles), así como también del fenil éster del ácido cafeico, cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la RNA polimerasa bacteriana. Por su parte, el mecanismo de acción

de la galangina, se basa en degradar la membrana citoplasmática de las bacterias, lo que conduce a una pérdida de iones de potasio, provocando autólisis de la célula³⁹.

2.2.5.7 Reacciones adversas.

El propóleo es relativamente atóxico⁵⁰. Las personas que han hecho uso del propóleo como medicina durante los últimos 300 años, no han dejado reflejado en la literatura ninguna mención sobre efectos secundarios serios y/o tóxicos. Sin embargo, en los últimos años, la contaminación medioambiental ha introducido algunas nuevas preocupaciones sobre el consumo de productos naturales⁵⁴.

Las reacciones adversas a la aplicación local de propóleo son escasas y se refieren generalmente a reacciones alérgicas de hipersensibilidad de tipo dermatitis de contacto. La respuesta alérgica se puede observar como un enrojecimiento de la propia piel y una quemazón o prurito de la misma⁵⁴. El principal agente sensibilizante descubierto en la composición de propóleo corresponde a 3-metil-2-butenil cafeato y feniletil cafeato. Posiblemente existan otros alérgenos no descubiertos a la fecha³⁹.

2.2.5.8 Uso del propóleo en medicina.

En Medicina humana se han obtenido resultados positivos al usar propóleos en el tratamiento de procesos tales como catarros de las vías respiratorias altas, gripe, sinusitis, otitis, laringitis, bronquitis, asma bronquial, neumonía crónica, tuberculosis pulmonar. Promueve la reconstrucción de colágeno y elastina, pro-oxidante. En el aparato digestivo: insuficiencias hepáticas de etiologías diversas, actúa como espasmolítico. Aparato genito-urinario: infecciones e inflamaciones en general. En alergología para tratar asma bronquial y rinofaringitis- laringitis alérgicas.

En ginecología en micosis vaginal y parasitosis. En oftalmología, en glaucoma y cataratas incipientes y tiene gran efecto en casos de queratitis herpética y conjuntivitis de distintos tipos. En el área dermatológica es donde más aplicaciones encuentran principalmente para procesos tales como abscesos, forúnculos, supuraciones diversas, sabañones, grietas, verrugas, callosidades, eczemas y psoriasis, entre otros⁵⁴. Por sus propiedades regenerativas y antioxidantes es comercializado en la industria cosmética para ser incluido en formulaciones de cremas regenerativas para piel madura o dañada, cremas antiarrugas, cremas para piel

grasa propensa al acné, en productos para contorno de ojos, productos solares, para el cuidado del cabello en general y sobre todo para cabellos finos que tienden a quebrarse³⁹.

2.2.5.9 Uso del propóleo en Odontología.

Es interesante y a la vez importante resolver estos problemas con productos naturales. Basado en los resultados favorables obtenidos en estudios clínicos e histológicos de la aplicación del propóleo, su uso en el campo de la Odontología está siendo cada vez más difundida. Su uso principal es como cicatrizante. Se han comprobado los efectos en la aplicación tópica sobre el curso de la cicatrización gingival, asimismo, la aplicación de pastas compuestas en el manejo de la sintomatología de la gingivitis induciendo también a la eliminación de bacterias y la reparación de tejido gingival⁴³.

Algunos autores plantean la utilización del propóleo en la odontología como agente antibacteriano para el control de la placa o en el tratamiento de diversas infecciones que se puedan presentar en la cavidad oral, ya que se ha comprobado su capacidad bactericida y bacterostática frente a bacterias orales⁵³. El extracto de propóleo contiene gran variedad de componentes como los flavonoides y ácido fenólico. De los flavonoides presentes en el propóleo la pinocembina, se considera la responsable del efecto inhibitorio sobre la *Cándida* spp, asociada con la causa de estomatitis⁵⁴.

El própolis o propóleo es capaz de reducir la sensibilidad dental y la permeabilidad de la dentina ha mostrado ser beneficioso en diversos aspectos, que incluyen, la prevención de la caries, la reducción de la mucosidad oral tras quimioterapia, el cáncer oral, en casos de enfermedades gingivales y periodontales, inhibición de la placa bacteriana y antiinflamatorio, en ayudar a prevenir la microbiota oral y como analgésico entre otras capacidades⁴³.

2.2.5 Propiedades Químicas de compuestos.

2.2.5.1 Potencial de disociación (pKa).

El pKa o potencial de disociación⁹³ es el representante de la fuerza que tienen las moléculas al disociarse. El concepto relacionado a la constante de disociación ácida (pKa) como propiedad de una sustancia se reconoce como uno de los parámetros más utilizados en la química moderna. Así pues, tanto el pH como el pKa son esenciales para comprender el comportamiento de las sustancias químicas en la vida cotidiana⁹⁴.

2.2.5.2 Métodos de determinación de pKa.

En vista de la necesidad de comprender el comportamiento de las sustancias químicas, se han creado diversos métodos para la determinación de pKa, entre los cuales se destacan:

- Método Potenciométrico/ Titulación ácido-base:

En una titulación potenciométrica, un volumen conocido de reactivo se agrega gradualmente a una solución de analito. El cambio en el potencial (E) tras la reacción se mide en consecuencia con el uso de dos electrodos, un indicador y un electrodo de referencia. Estos a menudo se integran en lo que ahora se denomina comúnmente electrodo de pH combinado^{94,95}. El método potenciométrico para la determinación del pKa es, dentro de los métodos conocidos, el más conveniente por razones de economía de tiempo y de la precisión de resultados⁶⁶.

- Voltimetría:

En voltimetría, para conocer el pKa de una solución se aplica un potencial cambiante sobre una solución de muestra y se registra la corriente resultante. De forma que cuando el potencial alcance el potencial de reducción del analito, se dará un aumento de la corriente, seguido de una disminución debido al agotamiento de la molécula⁹⁴.

- Calorimetría:

Otra técnica empleada para la medición de los valores de pKa, es la llamada Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC). En ésta, se realiza una titulación regular ácido-base dentro del calorímetro mientras se mide la energía necesaria para mantener la temperatura constante⁹⁴.

- Resonancia Magnética Nuclear:

Es una técnica empleada desde 1957, en la cual el valor de pKa se puede determinar tomando en cuenta el valor de pH. En lugar de realizar una titulación continúa, se agrega una cantidad conocida de un ácido o base fuerte a diferentes muestras (titulación a volumen constante), a partir de las cuales se calcula el pH en consecuencia. Esto produce una curva sigmoidea familiar donde el pKa se encuentra en el punto de inflexión⁹⁴.

- Electroforesis:

En la electroforesis, las especies cargadas se separan bajo la influencia de un campo eléctrico, migrando con una velocidad proporcional a su relación tamaño-carga. La relación de la velocidad lineal v_i y la intensidad de campo E se define como la movilidad electroforética. El uso de la electroforesis para la determinación del valor de pKa depende entonces de las diferentes movilidades de las formas protonadas y desprotonadas del analito. Como las dos formas existen en equilibrio rápido, se mide una movilidad neta que puede relacionarse con el grado de disociación (α) de analito⁹⁴.

- Espectrometría UV/Vis

Empleada mucho antes de 1900, pues en esta época ya era conocido que un cambio en la acidez podría conducir a cambios de color de sustancias naturales. La espectrometría con luz visible permite medir los valores de pKa de los indicadores de ácido / base y esto, a su vez, se extendió al uso de luz UV para medir los pKa de otros componentes⁹⁴.

- Polarimetría:

La determinación de una constante de disociación ácida por polarimetría implica la medición de la rotación óptica de la luz polarizada plana por la solución de muestra en función del pH⁹⁴.

- Método cinético:

El método cinético para determinar los valores de pKa depende de la medición de la velocidad de una reacción de control que está influenciada por el pH de su medio de reacción⁹⁴.

- Método computacional:

Finalmente, el método de la química computacional, es inusual en comparación con los descritos anteriormente, ya que es un método matemático en lugar de uno experimental. El cálculo no requiere muestra y, en principio, no está restringido en términos de condiciones físicas, pero la precisión de los valores obtenidos depende completamente del modelo utilizado para realizar los cálculos⁸⁶.

2.2.5.3 Implicación del valor de pKa en la aplicación clínica de quitosano en tejidos blandos de cavidad bucal.

El grupo amino del Quitosano tiene un valor pKa que ronda los 6,5 razón por la cual el quitosano posee una ligera carga positiva y es soluble en medios ácidos o en soluciones neutras. Es decir, dichos valores ponen de manifiesto las propiedades bioadhesivas de poder ligarse a las superficies cargadas negativamente tales como las membranas mucosas. Debido a estas propiedades físicas, el quitosano permite el transporte de drogas a través de las superficies epiteliales, siendo además biocompatible y biodegradable, pudiendo ser hidrolizado por lisosomas presentes en los flucos corporales⁸⁷.

2.2.6 Velocidad de liberación de sustancias.

En la mayor parte de los sistemas de liberación controlada, el fármaco, pesticida o cualquier otro agente biológico, se introduce en el interior de lo que se denomina transportador, siendo éste normalmente un material polímero. La velocidad de liberación de la sustancia deseada está prácticamente controlada por las propiedades del polímero, aunque por otra parte, existen otros factores de menor influencia, tales como el pH del medio en el que se va a realizar la liberación. Teniendo en cuenta estos todos estos factores, es posible conseguir sistemas de liberación que actúen lentamente y de forma continua durante largos periodos de tiempo⁹⁶.

Así pues, el presente estudio empleará como transportador membranas de quitosano, un polisacárido natural, biodegradable y biocompatible, cuya estructura corresponde a un copolímero de N-acetilglucosaminas y glucosaminas, cuya naturaleza catiónica permite formar complejos con fármacos o excipientes de carga

opuesta, con lo cual se modifican algunas de sus características físico- químicas. El quitosano se ha estudiado por su posible papel en la liberación controlada de principios activos por su habilidad para formar geles, pero también, se le ha visto utilidad en formas de dosificación de liberación rápida⁷⁰.

2.2.6.1 Métodos químicos de determinación de velocidad de liberación de sustancias.

Entre los métodos con mayor frecuencia empleados para la determinación de la velocidad de liberación de una sustancia destacan:

- Voltimetría de pulso diferencial y Voltimetría cíclica: Para lograr conocer la liberación controlada de fármacos existen diferentes técnicas electroanalíticas las cuales reflejan la cantidad de compuesto liberado hacia el medio, la voltimetría de pulso diferencial envía en forma de onda la señal de excitación, donde en una serie de pulsos a manera de escalera, el potencial de base aumenta gradualmente en pequeños intervalos entre 10 y 100 mili voltios, de tal modo que a medida de que transurre el tiempo se registran los picos máximos de liberación en pulsos eléctricos⁶⁹. Representando este método un medio más sensible y con menores límites de detección, en relación a la voltimetría cíclica, en la cual se conocerá el contenido de sustancia liberada midiéndose mediante la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración sencilla⁷⁰.

- Espectroscopia UV-vis: Consiste en la representación de la variación de la absorbancia en función de la longitud de onda. Esta técnica ofrece varias ventajas en relación a los métodos convencionales ya que distingue características espectrales que sobresalen de las bandas registradas en el espectro aumentando la resolución en solapamientos de espectros. Igualmente, presenta una serie de características que favorecen su uso en análisis químicos rutinarios entre las cuales se pueden mencionar: simplicidad operacional, elevada velocidad analítica, bajo costo y posibilidades de uso en sistemas de control on-line⁶⁸.

2.2.6.2 Implicación del valor de velocidad de liberación de sustancias en agudestilada para aplicación clínica.

Resulta fundamental implementar tecnologías de liberación controlada en el área farmacéutica y odontológica, pues la liberación controlada presenta ventajas de dosificación con respecto a otras presentaciones, entre ellas se encuentran la disminución de los efectos colaterales secundarios, el tiempo de actividad prolongado, y el brindar protección a fármacos sensibles a ataques enzimáticos o degradación ácida debido al pH local, entre otros⁶⁹. Así pues, dependiendo de la velocidad de la liberación se obtendrá la concentración de sustancia capaz de lograr el efecto que se desea, tal como lo reflejan los estudios publicados por Arias et al⁷⁰ y Leonardi et al⁶⁹.

Por su parte Arias et al⁷⁰, determinaron la velocidad de liberación de Metronidazol (MTZ), incorporado en películas de quitosano, usando como medio para la liberación, agua destilada. Realizando un estudio mediante espectroscopia infrarroja (IR) sin y con la incorporación de MTZ, con la finalidad de comprobar que el MTZ incorporado en el quitosano, mantiene su estructura química y por ende sus propiedades farmacéuticas. Reflejando que la velocidad de liberación de sustancias tales como el MTZ desde una película de quitosano puede ser determinada utilizando técnicas electroquímicas.

La evaluación de las membranas fue por intervalos de tiempo cada media hora y cada 24 horas por 4 días. Determinando que el desprendimiento del metronidazol en el tiempo es sostenido y controlado hasta 96 horas (ya que la concentración en el seno de la solución aumenta gradualmente, liberándose aproximadamente la misma cantidad de fármaco por unidad de tiempo), alcanzando a los 30 minutos una concentración de metronidazol en la agua destilada por encima del valor mínimo terapéutico y por debajo del valor tóxico. Demostrando así, que este tipo de liberación, presenta una cinética de orden cero, y es el mecanismo de liberación ideal cuando se quiere conseguir una acción farmacológica prolongada⁷⁰.

2.2.7 Actividad antimicrobiana

2.2.7.1 Determinación de actividad antimicrobiana de un compuesto.

Las condiciones específicas empleadas durante el desarrollo del método aseguran la reproducibilidad de los resultados, que son de gran importancia para evaluar la actividad antimicrobiana. Sin embargo, hay que considerar algunos factores que son decisivos para obtener resultados reproducibles y exactos, desde el método de extracción, solventes utilizados, medios de cultivo, cantidad de inóculo, uso correcto de controles; esto permitirá descartar algunos errores sistemáticos durante la realización de las evaluaciones que pudieran arrojar falsos positivos o negativos⁹⁷.

- Difusión en agar: Prueba que permite medir *in vitro* la susceptibilidad de patógenos y fitopatógenos, frente a una sustancia desconocida⁹⁸. En este método, existen dos formas de identificar la difusión. En la primera, en Disco (Kirby-Bauer), el agar solidificado se inocula con la suspensión requerida del microorganismo; un papel filtro es impregnado con una solución de concentración conocida a evaluar, el cual es colocado en la superficie del agar. En la segunda, inoculación de pozos en agar, se perfora el agar solidificado y previamente inoculado, usando un perforador estéril, y se vierte una solución de cierta concentración del agente a evaluar en las perforaciones⁹⁹.

Posteriormente, las cajas Petri son incubadas a la temperatura y tiempo óptimos. El principio es la difusión del agente a evaluar hacia todo el agar, lo que conduce a la inhibición del crecimiento bacteriano mediante la formación de zonas de inhibición. Lo cual supone que el diámetro de las zonas aumentará al incrementar la concentración agente. Los resultados de la prueba de difusión en agar son generalmente cualitativos. La susceptibilidad del microorganismo en prueba está relacionada con el tamaño de la zona de inhibición en milímetros⁹⁹.

Un estudio realizado para determinar la susceptibilidad bacteriana en el caso de aceites esenciales, establece para éste caso: susceptibilidad microbiana cuando el diámetro de la zona es mayor a 30-35 mm, intermedios cuando el diámetro de la zona

varía entre 20 y 30 mm, o resistentes con una zona cuyo diámetro es menor a 15-20 mm⁹⁹.

Otros estudios han reflejado la efectividad de ciertas sustancias sobre el sobre el *Enterococcus faecalis*, entre las que el gel de quitosan/propóleo, presentó la mayor media en segundo lugar, estuvo el provocado por el gel de quitosan, seguido por el halo inhibitorio de la clorhexidina en gel al 2% (Maquira-Brasil). Teniendo como control positivo un disco de sensibilidad de Ampicilina⁴².

- Dilución en agar: El método de dilución y microdilución seriada se lleva a cabo en tubos (dilución) o pocillos (microdilución) con medios líquidos (caldos), los cuales contienen concentraciones crecientes (serie de dilución doble) del agente a evaluar diluido en el caldo, en el cual se inocula un número definido de células bacterianas. Posterior a la incubación (16-24 h dependiendo del microorganismo), la presencia de turbidez o sedimentación indica crecimiento del microorganismo. Finalmente, para rectificar la inhibición, se toman alícuotas de los tubos o pocillos sin turbidez y se hace un sembrado en agar. La CMI en esta técnica se determina de acuerdo a la concentración más baja que impide el crecimiento visible del microorganismo. Estos métodos son mayormente utilizados en estudios con bacterias⁹⁹.

Esta técnica permite determinar si el efecto del extracto o compuesto en cuestión es bacteriostático o bactericida, para lo cual se toma en cuenta el conteo en placa obtenido. Para considerarse bactericida, no debe haber crecimiento en el cultivo, mientras que al obtener un crecimiento igual al inóculo inicial, se considera bacteriostático⁹⁷.

- Bioautografía: Es una variante del de difusión en agar, con la premisa de que el extracto crudo al que se le evaluarán las propiedades antimicrobianas, es colocado sobre una placa de cromatografía en capa fina (CCF), posteriormente es eluido con una mezcla apropiada de solventes, permitiendo la separación de los diferentes componentes del extracto. La CCF es un método ideal para la separación de compuestos naturales debido a que después de eluir la cromatografía se evapora el solvente, evitando así la posible actividad del mismo⁹⁷.

- Bioautografía por contacto: La placa cromatográfica previamente eluída y sin restos de solventes, se coloca «cara abajo» sobre el agar inoculado con la cepa de interés. Transcurrido el tiempo de incubación, la actividad antimicrobiana se evidencia mediante la aparición una zona de inhibición del crecimiento sobre la superficie del agar en el lugar donde el o los compuestos antimicrobianos estuvieron en contacto con la capa de agar⁹⁷.
- Bioautografía directa: la cromatografía en capa delgada previamente eluída y sin restos de solventes, es sumergida en una suspensión del microorganismo de interés, el cual se encuentra en crecimiento activo y en un caldo de cultivo apropiado. Después del tiempo de incubación se observan las zonas donde no hay crecimiento, las cuales corresponden a los compuestos antimicrobianos buscados⁹⁷.
- Bioautografía por inmersión o por superposición de agar: el cromatograma es cubierto con una capa de agar previamente inoculado, hay que considerar que el agar debe estar aproximadamente a 45 °C al momento de inocularlo para evitar inactivar al microorganismo en cuestión. Posteriormente, la placa cubierta con agar es incubada en cámara húmeda durante el tiempo y la temperatura apropiada, después de esto, zonas claras sobre la placa de CCF indican la actividad antimicrobiana de los componentes⁹⁷.
- Sembrado en espiral: Este método se basa en dispensar continuamente un volumen decreciente de una concentración (de la cual se desea conocer propiedades antimicrobianas) en un medio sólido (agar) por medio del patrón de espiral de Arquímedes. Lo cual resulta en un gradiente del compuesto a evaluar con una alta concentración cerca del centro de la caja Petri; el inóculo es sembrado radialmente sobre la superficie de la caja desde el borde exterior hasta el centro de la placa. Posterior a la incubación, se mide y registra la distancia desde el final del crecimiento del microorganismo hasta donde comenzó. La CMI se puede calcular a partir del radio en el que se detiene el crecimiento⁹⁹.

- Caja Petri invertida: Consiste en colocar los agares inoculados de forma separada de los compuestos a evaluar. Para ello, papel filtro impregnado con el agente a evaluar previamente disuelto en acetato de etilo o en otro solvente, es colocado sobre la tapa de una caja Petri; posteriormente, la caja Petri que contiene en la base el agar solidificado e inoculado y en la tapa el papel filtro, se coloca de manera invertida. Con esto se espera una volatilización de los agentes del compuesto a evaluar con dirección al microorganismo en prueba⁹⁹.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

En esta sección se establecen el conjunto de métodos bajo los cuales se obtuvo el conocimiento para la realización de la presente investigación. Así, se detallan en esta sección, nivel de investigación, diseño, enfoque, población del presente estudio, sistema de variables, técnica e instrumento de recolección de datos, procedimientos, equipos e instrumentos, principios bioéticos y análisis de resultados.

3.1 Nivel y diseño de investigación

De acuerdo al problema planteado y a los objetivos alcanzados, según los criterios de Arias la presente investigación posee un nivel descriptivo¹⁰⁰, pues a través de la ejecución de la misma se caracterizarán las propiedades químicas y microbiológicas de las membranas de quitosano/propóleo.

En relación al diseño de investigación, según estos mismos autores el estudio se desarrollará bajo un diseño pre-experimental¹⁰⁰, pues no existirá una manipulación deliberada de las variables, ni un grupo control. Así, en el presente estudio los investigadores analizarán las propiedades químicas y microbiológicas de las membranas de quitosano/propóleo elaboradas, como primer acercamiento al problema de investigación planteado.

Por otra parte, con respecto al enfoque de la investigación según el criterio de Hernández, Fernández y Baptista, la presente investigación posee un enfoque mixto, pues para el componente químico predominan las determinaciones numéricas de la caracterización de las membranas, por su parte para el componente microbiológico el enfoque es cualitativo, pues no se efectúa una medición numérica. Así pues, se recaban datos expresados a través del lenguaje escrito, verbal y no verbal, así como visual, los cuales describen y analizan¹⁰¹.

3.2 Muestra

La muestra estará constituida por 3 grupos de membranas (P1, P2 y P3) con concentraciones de 0,3 ml, 0,4 ml y 0,5 ml respectivamente, cada uno constituido por 3 fracciones (P1a, P1b, P1c, P2a, P2b, P2c y P3a, P3b y P3c) para una muestra total de 9 fracciones de membranas quitosano/propóleo elaboradas en el Departamento de Electroquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes (ULA), bajo el procedimiento estandarizado del Centro de Investigaciones Odontológicas de la Facultad de Odontología (ULA), procedimiento descrito en la sección de Procedimientos, materiales, equipos e instrumentos. Todo ello, tal como se evidencia en la *Tabla 1*.

Grupo 1 (0,3 ml)	Grupo 2 (0,4 ml)	Grupo 3 (0,5 ml)
P1	P2	P3
P1a	P2a	P3a
P1b	P2b	P3b
P1c	P2c	P3c

Tabla 1. Distribución de los grupos muestrales.

3.3 Sistemas de variables

Una variable es una cualidad apta de sufrir cambios¹⁰², las variables presentes en este estudio son de tipo independiente y dependiente:

- Variable independiente: representada por el proceso de elaboración de las membranas de quitosano/ propóleo en sus diferentes concentraciones.
- Variable dependiente: Será el comportamiento químico y microbiológico de las membranas de quitosano/propóleo:
 - Valor pKa de las membranas de quitosano/propóleo, cuyo indicador estará representado por los valores arrojados por la titulación ácido-base, en los

cuales menor a 6 resultará inadecuado y mayor o igual a 6-6,5 será adecuado.

- Velocidad de liberación de propóleo de las membranas en agua destilada, variable que poseerá como indicador la respuesta espectroscópica de los componentes del propóleo, identificando la presencia de liberación sostenida y proporcional en el tiempo.
- Susceptibilidad de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC23357 frente a las membranas de quitosano/propóleo, ésta variable poseerá como indicador la presencia o ausencia de halos de inhibición.

3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

En la presente investigación se utilizará como técnica de recolección de datos la observación directa y asistida por un monitor. Los instrumentos empleados para la recolección de datos e información relevante serán ficha de registro (Apéndice A) realizada por el investigador y validada por tres expertos (en materiales dentales, microbiología y química), instrumento que será empleado para evaluar estructura química y comportamiento en agua destilada.

3.5 Procedimientos, materiales, equipos e instrumentos

Los procedimientos químicos para la obtención del compuesto de quitosano/propóleo, se llevaron a cabo a través del procedimiento estandarizado del Centro de Investigaciones Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes (ULA). Para ello se preparó una solución de quitosano pesando 5 gr quitosano, Quitosan®, GUINAMA certificado para uso médico, colocándolo en 2 ml de ácido acético al 99%, y luego enrasando en un matraz aforado de 100 ml y dejándolo en agitación constante por 12 horas obteniendo un gel de quitosano ácido. El volumen total de la solución de quitosano fue doblemente filtrado para eliminar las impurezas que pudieran contaminar la solución.

Luego de obtenida la solución ácida de quitosano al 5% se procedió a dispersar la solución ácida de quitosano en cápsulas de plástico. Se realizaron ensayos en la elaboración de las membranas a fin de escoger la menos quebradiza. De esta forma se realizaron 3 membranas de quitosano/propóleo, agregando 2 cc de quitosano como medida estándar para todas las membranas y variando solo la cantidad de propóleo al 4%, así la membrana nro 1, fue elaborada con 1 cc de propóleo, la nro 2 con 1,5 cc y la nro 3 con 2 cc, incubándose en una estufa de calor seco a 40° C durante 16 horas con la finalidad de evaporar completamente la fase líquida, obteniendo la deshidratación del compuesto, en una fina película.



Imagen 1 Membranas de quitosano/propóleo.

Fuente: Propia.

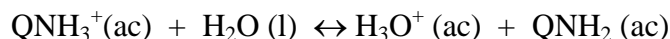
Las membranas en envases plásticos fueron sometidas finalmente a una esterilización con luz ultravioleta, en equipo Beautytech®. Para la obtención del compuesto objeto de estudio se contó con el apoyo del Dr. Reinaldo Ortíz, profesor de la Facultad de Ciencias (ULA) y de la Lic. Anajulia Gónzales, Jefe del Laboratorio Investigaciones Odontológicas de la Facultad de Odontología (ULA).

Al escoger la membrana que resultase con mayor facilidad de manipulación se realizaron 3 membranas, que representaron 3 grupos (P1, P2, P3), éstos grupos poseían concentraciones de propóleo por debajo de la concentración seleccionada. Cada membrana, representante de cada grupo, se fraccionó para obtener 9 muestras

(P1a,P1b, P1c, P2a, P2b, P2c, P3a, P3b y P3c) con el fin de comprobar la homogeneidad de las mismas.

Una vez elaboradas las membranas de quitosano/propóleo, se analizó el **componente químico**. Así se determinó el pKa de éstas, ello posterior a la determinación del pKa de la solución ácida de quitosano, para el cumplimiento de éste objetivo se empleó un método de análisis químico, denominado método potenciométrico- titulación ácido-base, el cual permite determinar la concentración de una disolución ácida o básica desconocida, mediante una neutralización controlada.

El quitosano protonado es un ácido débil y sólo se disocia parcialmente en disolución acuosa^{103, 104}:



Cuando se establece el equilibrio la relación de las concentraciones de los iones a la concentración de las moléculas sin disociar del ácido débil es igual a una constante cuando la temperatura permanece invariable. Expresado matemáticamente^{103, 104}:

$$K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{QNH}_2]}{[\text{QNH}_3^+]}$$

Replantando la expresión anterior, y aplicando logaritmo decimal a ambos lados se obtiene^{103, 104}:

$$-\log[\text{H}_3\text{O}^+] = -\log \frac{[\text{QNH}_2]}{[\text{QNH}_3^+]} - \log K_a$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{QNH}_2]}{[\text{QNH}_3^+]}$$

En una titulación ácido-base, cuando han sido consumidos la mitad de los moles de quitosano colocados inicialmente (punto de semiequivalencia) ocurre que $[\text{QNH}_2] = [\text{QNH}_3^+]$, y por tanto, en ese punto el $\text{p}K_a = \text{pH}$ ^{103, 104}.

La titulación se llevó a cabo disolviendo cada membrana de quitosano (con y sin propóleo respectivamente) en 40 mL de una solución ligeramente acidificada con HCl, para posteriormente se titulas con una solución de NaOH 0,05 M.

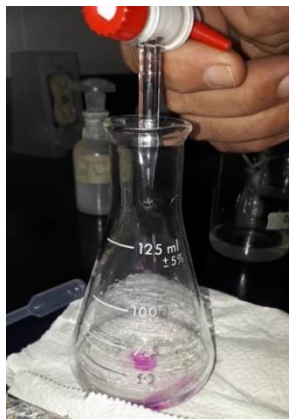


Imagen 2 Titulación con una solución de NaOH.
Fuente: Propia.

Por lo tanto el procedimiento para calcular el pKa de las películas, es disolver la película en la cantidad mínima de ácido fuerte posible y luego realizar una curva de titulación que en nuestro caso se realizó mediante potenciometría, utilizando un pHmetro SperScientific, modelo Benchtop Water Quality Meter 860035 (imagen3).



Imagen 3 Medición de índice de refracción durante la titulación.
Fuente: Propia.

Este experimento se repitió para las películas de quitosano cargadas con propóleo y se obtuvieron resultados similares.

Para continuar con el análisis de las propiedades químicas de las membranas elaboradas, se realizó un espectro patrón del propóleo, para obtener una señal que identifique la liberación de propóleo de las membranas en agua destilada, objetivo que fue cumplido mediante espectroscopia UV-visible para conocer el nivel de absorbancia máxima que demostrará la cantidad de sustancia liberada en el tiempo y en consecuencia la velocidad.

Para el análisis por medio de la técnica de espectroscopia UV-Visible, se utilizó un espectrofotómetro Marca Perkin-Elmer modelo lambda 25 de doble haz, acoplado a un sistema computarizado y controlado mediante el software *UV WinLab* (Imagen4)

y celdas de cuarzo de 1 mm de camino óptico, dentro de las cuales se llevó a cabo el proceso de liberación en agua destilada.

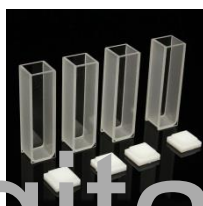


Imagen 4 Espectrofotómetro UV-visible Perkin Elmer modelo Lambda 25 y celdas empleadas en las medidas.

Fuente: Propia.

Inicialmente se procedió a determinar las condiciones instrumentales y experimentales de análisis, para lo cual se procedió a tomar medidas espectrales de quitosano disuelto en agua destilada y película de quitosano cargada con propóleo, también disuelta en agua destilada. De esta manera, siguiendo todos los protocolos de la técnica, como son, primero tomar espectros del medio de liberación, del vehículo de liberación y de la sustancia liberada, para detectar una señal espectral que se pueda atribuir exclusivamente a la sustancia liberada, en este caso el propóleo.

Por último, se analizó el **componente microbiológico**, a través de la determinación de la susceptibilidad de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC23357 frente a membranas de quitosano-propóleo, empleando aquella membrana con mayor cantidad de propóleo (0,5 ml) que mantenga

las mejores propiedades físicas, a fin de alcanzar una más rápida concentración de propóleo en la totalidad del medio de cultivo. Este estudio fue realizado a través de un método de difusión en agar, mediante el uso de la técnica Kirby-Bauer, prueba que permite medir *in vitro* la susceptibilidad de patógenos y fitopatógenos, frente a una sustancia desconocida. Dicha prueba para fines del presente estudio fue modificada al emplear membranas cortadas de forma rectangular.

Para la realización de ésta prueba, se prepararon los medios de cultivo Agar Muller Hinton, tal como se observa en las *imágenes 5 y 6*. Posteriormente se inoculó al 2% el medio, fundido y temperado a 45°C con una suspensión 0,5 Mac farland de la bacteria patógena a evaluar y se dejó solidificar.



Imagen 5 Preparación de Agar Muller Hinton.
Fuente: Propia.



Imagen 6 Preparación de medios de cultivo.
Fuente: Propia.

Por último, dos membranas con una concentración de 0,5 ml fueron recortadas con forma rectangular en tres porciones cada una, y colocadas sobre los medios preparados, como se puede observar en la *Imagen 7*. Al colocar las porciones de membrana en el agar se hizo ligera presión para garantizar un contacto adecuado.

Estas se situaron a 15 mm o más del borde de la caja Petri a fin de que no se produjera ninguna interferencia entre los halos de inhibición, colocando solo tres membranas por caja dejando incubarse a 37°C por 24 horas para realizar después del periodo de incubación la lectura de los halos de inhibición al reverso de la caja Petri observando los resultados para su posterior interpretación.

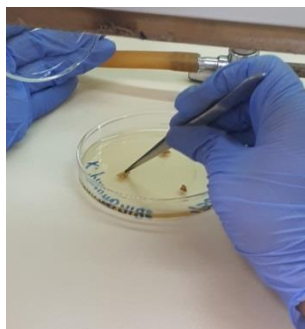


Imagen 7 Colocación de membranas en medios de cultivo.
Fuente: Propia.

La susceptibilidad del microorganismo en prueba estuvo relacionada con la presencia de la zona de inhibición, la cual fue observada con un instrumento llamado contador de colonias observado en la Imagen 8. En el caso de presentarse crecimientos totalmente asimétricos éstos fueron excluidos de la medición^{9º}.



Imagen 8 Observación de halos de inhibición con el contador de colonias.
Fuente: Propia.

3.6 Principios bioéticos

Tal como se establece en la declaración de Helsinki¹⁰⁵, para la ejecución de cualquier investigación médica, se tomarán en cuenta principios básicos, como el amparo científico que justifique la investigación y que presente una posibilidad

concreta de responder preguntas que resulten de interés a la comunidad en general. Es así como en la presente investigación ha quedado justificada, en vista de los resultados evidenciados en la práctica clínica con cada biomaterial (quitosano-propóleo) de forma independiente. Igualmente, el presente estudio, siguió una metodología adecuada y estuvo sometida a la supervisión de profesionales competentes y calificados apropiadamente en sus respectivas áreas. Esta investigación tomó en cuenta que en cada proceso siempre prevalezcan los beneficios esperados sobre los posibles riesgos, demostrando en estudios previos que los materiales objetos de estudio no resultan tóxicos para el paciente^{29, 31}.

3.7 Análisis de resultados

Para determinar el valor pKa e identificar la velocidad de liberación de propóleo de las membranas en agua destilada se elaborará una curva de calibración y curva de concentración respectivamente, finalmente para determinar la susceptibilidad de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 frente a las membranas elaboradas se realizará el análisis de halo en la presencia o ausencia de halos de inhibición.

Se elaboraran los siguientes gráficos:

- Valor pKa de membranas elaboradas.
- Velocidad de liberación de propóleo de las membranas sobre agua destilada, durante intervalos de tiempo constantes (0,5, 30, 60, 90,120 min).

El análisis de los datos se realizará a través de la elaboración de una base de datos con un el software Microsoft Office Professional Excel 2013, para el caso del componente químico será por medio de una curva de calibración y concentración arrojada por el programa *Origin Pro 8 de OriginLab Corporation*, para el componente microbiológico el análisis será realizado por descripción de presencia o ausencia de halos de inhibición.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente capítulo, se describen de forma organizada, los resultados obtenidos y la discusión del trabajo pre-experimental realizado. Estos se presentan siguiendo una secuencia lógica, para analizarlos y luego compararlos con los antecedentes encontrados.

4.1 Resultados

4.1.1 Componente Químico

Para determinar el valor pKa de las membranas de quitosano/propóleo en borlas se realizó una curva de titulación potenciométrica obtenida para una película de quitosano en ausencia de propóleo, usando la ecuación¹⁰³:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{QNH}_2]}{[\text{QNH}_3^+]}$$

La presencia de propóleo en las películas no afectó la forma de la curva y los valores de pKa obtenidos en ambos casos fueron los mismos, lo cual implica que el propóleo en estas condiciones carece de actividad ácido-base y no influye sobre el valor del pKa del quitosano.

A continuación, en la siguientes tabla (1), se presentan los resultados de pKa de los fragmentos de membrana estudiados.

Película	Valor de pKa de membrana
P0cbc (sólo quitosano)	6,3
P1a	6,4
P1b	6,3
P1c	6,5
P2a	6,4
P2b	6,2
P2c	6,3
P3a	6,3
P3b	6,4
P3c	6,3

**Tabla 2 Valores de pKa de los grupos estudiados.
Fuente: Propia.**

Como puede evidenciarse éste experimento se repitió para las películas de quitosano cargadas con propóleo, y se obtuvieron resultados de pKa similares en todas las muestras estudiadas, lo cual se evidencia *Figura 1*, que muestra una curva de titulación potenciométrica representativa de los grupos de estudio, en función del pH y el volumen de NaOH 0,05 M agregado y se observan dos puntos de inflexión, el primer punto corresponde a la neutralización del exceso de HCl de la solución y el segundo punto a la deprotonación completa del quitosano.

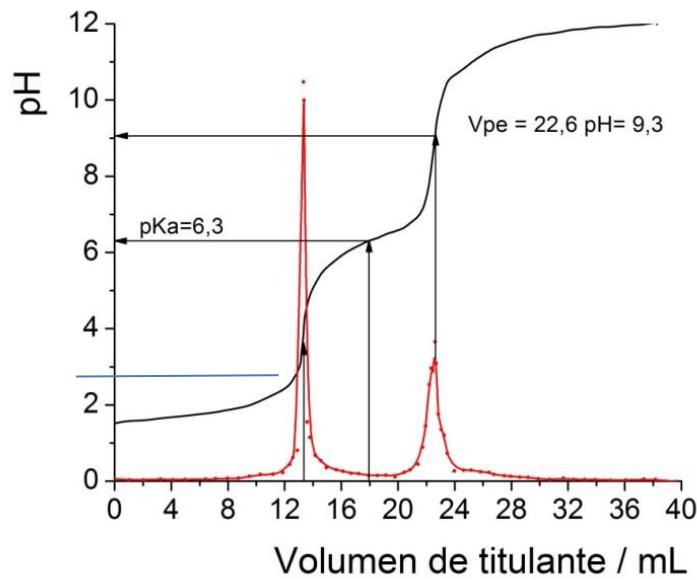


Figura 1. Curva de titulación potenciométrica de muestra representativa de los grupos de estudio, una vez disuelta en HCL.

Fuente: Propia.

www.bdigital.ula.ve

El volumen gastado de NaOH entre el primer punto de inflexión, es la cantidad de NaOH que se requiere para deprotonar todo el quitosano, la mitad de ese volumen (17,9 mL de NaOH, es el volumen para deprotonar la mitad del quitosano, por lo tanto en este punto y según la ecuación 3 el $pH = pKa = 6,3$. Este mismo procedimiento se siguió para las películas de propóleo obteniéndose con mayor frecuencia un valor de pKa de 6,3; lo cual implica que el propóleo no afecta la actividad ácido-base del quitosano.

En relación a la velocidad de liberación de propóleo de las membranas en agua destilada, objetivo cumplido mediante espectroscopia UV-visible, en la *Figura 2-A* se evidencia para el espectro obtenido de una película de quitosano/propóleo disuelta en agua destilada, un pico de absorbancia a 280 nm, el cual se atribuye a alguna de las diversas sustancias de componen al propóleo, esta señal se empleó para medir la absorbancia de propóleo liberado en la celda UV.

En las *figura 2*(B,C y D) se observan los espectros obtenidos para películas sumergidas en agua destilada durante 30s (línea negra) y 60s (línea roja) para películas con 0,3 ; 0,4 y 0,5 ml de propóleo respectivamente, en los cuales ya se evidencia el paso de propóleo al agua de la celda, debido al aumento de absorbancia que se presenta a 280 nm.

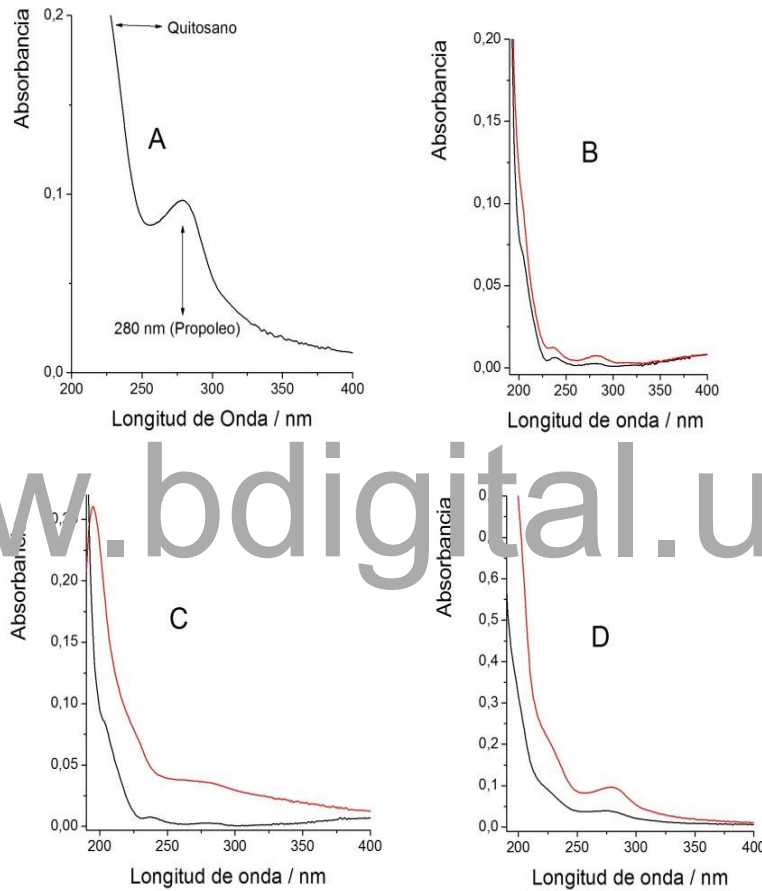


Figura 2 Uv-visible de: (A) película de quitosano/propóleo disuelta en agua destilada. (B,C,D): Película de quitosano/propóleo a los 30 seg (línea negra) y 60 seg (línea roja).

Fuente: Propia.

Para conocer la cinética de liberación se grafica la absorbancia en función del tiempo. A continuación en la *tabla 3* siguiente se presentan los resultados de

absorbancia de los 9 fragmentos (P1a, P1b, P1c, P2a, P2b, P2c, P3a, P3b y P3c) de membrana estudiados a los 0,5, 30, 60, 90, 120 min.

Tiempo	P1a	P1b	P1c	P2a	P2b	P2c	P3a	P3b	P3c
0,5	1,25E-4	5,5E-5	9,5E-5	6,6E-4	8,55E-4	7,8E-4	0,00147	0,00185	6,1E-4
30	0,0075	0,0033	0,0057	0,0396	0,0513	0,0468	0,08802	0,1107	0,0956
60	0,015	0,0066	0,0114	0,0792	0,1026	0,0936	0,17604	0,2214	0,1922
90	0,0225	0,0099	0,0171	0,1188	0,1539	0,1404	0,26406	0,3321	0,2888
120	0,03	0,0132	0,0228	0,1584	0,2052	0,1872	0,35208	0,4428	0,3854

Tabla 3 Valores de absorbancia de los fragmentos de membrana.

En la *figura 3* se observa que el desprendimiento del propoleo en el tiempo es lineal, lo que implica que la concentración en el seno de la solución aumenta gradualmente, liberándose aproximadamente la misma cantidad de fármaco por unidad de tiempo, observándose que al aumentar la cantidad de propoleo la velocidad de liberación también aumenta en forma proporcional, pues la pendiente de la recta aumenta.

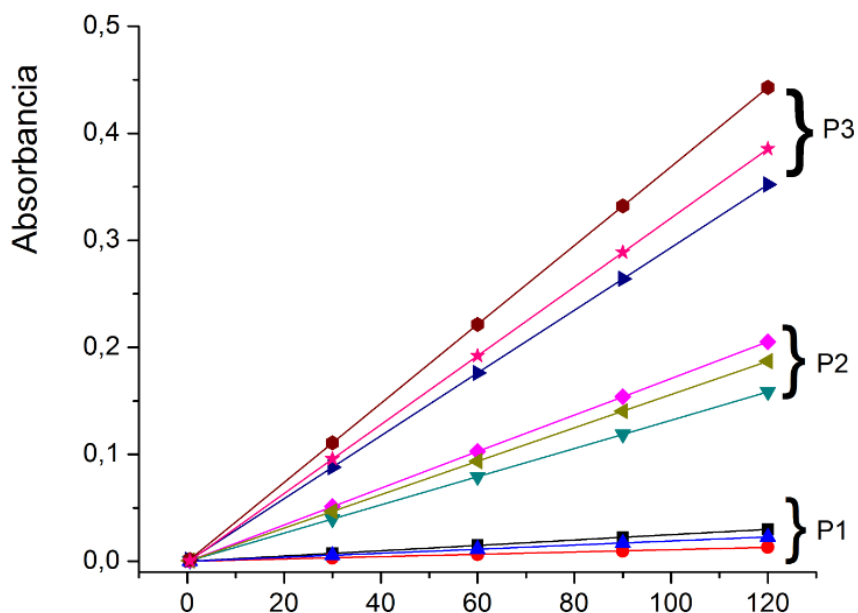


Figura 3 Curvas de concentración de grupos estudiados P1 (0,3 ml), P2 (0,4 ml) y P3 (0,5 ml), en función de intervalos de tiempo constantes.

www.bdigital.ula.ve

En este sentido, se evidencia que este sistema sigue una liberación de primer orden que se puede expresar según la Ec. 1¹⁰⁶:

$$\ln Q_t = \ln Q_0 - K_0 t \quad \text{Ec. 1}$$

Donde Q_t es la cantidad de fármaco liberado en el tiempo t , Q_0 es la cantidad de fármaco inicial en solución, que generalmente es cero y K_0 es la constante de velocidad en la cinética de primer orden¹⁰⁶.

En este caso solo se puede decir que la liberación del propóleo sigue una cinética de primer orden, pero no se puede estimar un valor de constante de velocidad, ya que el fabricante del producto no refiere una cantidad exacta de propóleo en el empaque y además por tratarse de un producto natural, está compuesto de diversidad de sustancias de las cuales se desconoce su estructura y proporciones⁵².

Para comprobar si las películas de quitosano/propóleo eran homogéneas, las mismas se dividieron en 3 porciones iguales y se procedió a realizar el estudio cinético de cada porción por separado. El parámetro de comparación fue la pendiente de la curva A vs t, la cual es una medida de la constante de velocidad de liberación.

En la *tabla 4* se muestran los resultados obtenidos para estas mediciones.

Película	Pendiente	Error (S)
P1a	0,00025	$1,7 \times 10^{-5}$
P1b	0,00011	$2,1 \times 10^{-5}$
P1c	0,00019	$2,4 \times 10^{-5}$
P2a	0,00132	$1,4 \times 10^{-5}$
P2b	0,00171	$1,6 \times 10^{-5}$
P2c	0,00116	$1,4 \times 10^{-5}$
P3a	0,002934	$2,3 \times 10^{-5}$
P3b	0,00369	$3,4 \times 10^{-5}$
P3c	0,00322	$3,3 \times 10^{-5}$

Tabla 4 Pendientes de las curvas de liberación para las distintas porciones de películas estudiadas
Fuente: Propia

Como se puede observar, el valor de la pendiente de las curvas no difiere de forma significativa para porciones iguales de la misma película, lo cual implica que la composición de las mismas es bastante homogénea.

4.1.2 Componente Microbiológico

En relación a los resultados obtenidos para determinar la susceptibilidad de *Pseudomona aeruginosa* ATCC27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC23357 frente a membranas de quitosano-propóleo con concentración de 0,5 ml, se empleó la prueba

de Kirby-Bauer. Observando la presencia de inhibición en ambos cultivos a las 24 horas de ser incubados (*Imagen 9*).

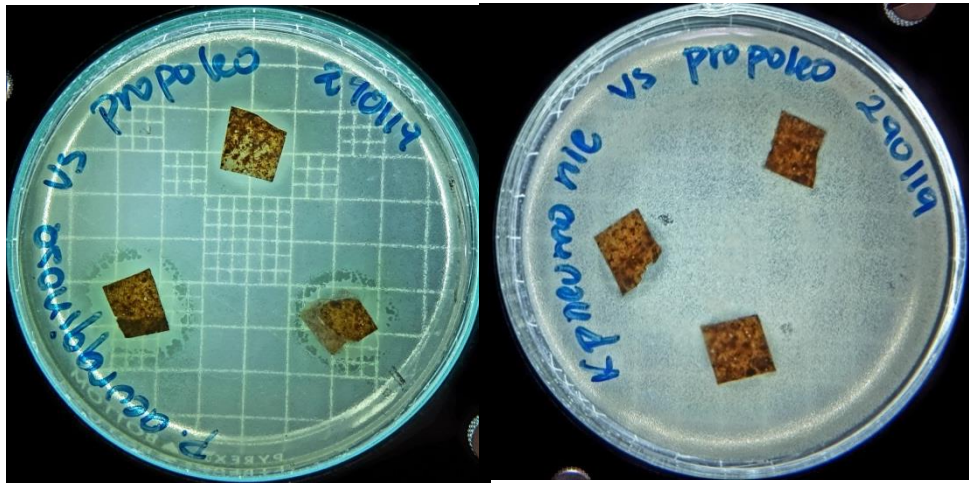
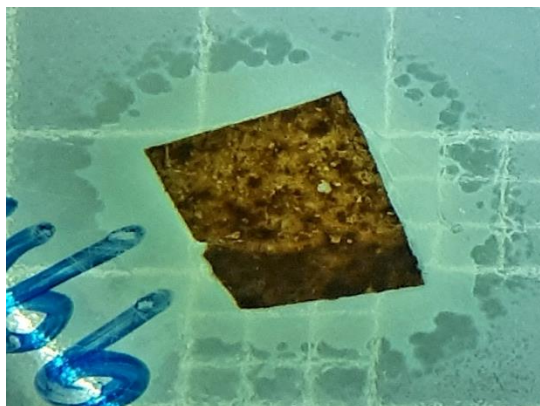


Imagen 9. Zonas de inhibición en el crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* (izquierda) y *K. pneumoniae* (derecha). Fuente: Propia.

Las zonas de inhibición, fueron aquellos espacios en los que no se produjo crecimiento bacteriano, en ese caso se evidenciaron uniformemente circulares con un desarrollo confluyente de las bacterias inoculadas. Lo cual denota la susceptibilidad de las cepas bacterianas empleadas frente a la prueba por triplicado realizada para cada bacteria, pues estos halos se observaron alrededor de cada porción rectangular de las membranas de quitosano/propóleo colocadas en los medios de cultivo.

Así, en la *Imagen 10*, se observa de forma detallada el halo de inhibición originado por la membrana de quitosano/propóleo, frente a un cultivo bacteriano de *P. aeruginosa*, por su parte la *Imagen 11*, muestra la presencia de halo inhibitorio frente a un crecimiento bacteriano de *K. pneumoniae*. Ambos halos con forma circular y regular.



**Imagen 10. Halo de inhibición observado en crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa*.
Fuente: Propia.**



**Imagen 11. Halo de inhibición observado frente a crecimiento de *K. neumonie*
Fuente: Propia.**

4.2 Análisis y Discusión de resultados.

Una vez obtenidos los resultados de los objetivos planteados en la presente investigación, tal como expresa Velazco et al en el año 2014, se destaca la importancia de las propiedades químicas y microbiológicas de los compuestos y su influencia sobre la funcionalidad de estos materiales, debido a que sobre éstos es donde se realizan las condiciones de reacción⁹. Sin embargo, son escasos los estudios que analizan las propiedades químicas y microbiológicas del quitosano y el propóleo en un solo compuesto.

En relación con los resultados evidenciados en la determinación del valor pKa (pKa o potencial de disociación⁹³ representante de la fuerza que tienen las moléculas al disociarse) de las membranas de quitosano/propóleo elaboradas, a través de una curva de titulación potenciométrica, se demuestra en concordancia con Cortés y Alvares, 2008⁸⁸ que la presencia de propóleo en las películas no afecta la forma de la curva ni los valores de pKa que caracterizan los grupos aminos del quitosano, es decir, se mantienen invariables las características y por tanto propiedades físicas del mismo.

Así pues, los valores de pKa encontrados a través del método ya descrito anteriormente, reflejan que las membranas de quitosano/propóleo poseen un potencial de disociación (pKa) que oscila entre 6,2 y 6,5, tal cual se refleja en los estudios de Barrios (2012)¹⁰⁷, James (2011)¹⁰⁸, Duarte et al (2016)²⁴ y Suárez et al(2011)²⁷, representando éstos, valores positivos, que según la literatura clínicamente justifican una propiedad mucoadhesiva de los compuestos estudiados a membranas corporales que poseen carga negativa, haciéndolos bioateriales ideales para transporte de drogas a través de las superficies epiteliales^{88, 99}.

Con respecto a la identificación de la velocidad de liberación de propóleo de las membranas en agua destilada, así como la homogeneidad en su composición, a través del uso de espectroscopia UV-visible, se observa que el desprendimiento del propóleo en el tiempo es lineal, es decir, la concentración en el seno de la solución aumenta gradualmente, y se libera aproximadamente la misma cantidad de fármaco por unidad de tiempo, lo cual se observa en el aumento de la pendiente de la recta graficada e indica que este sistema sigue una liberación de primer orden. Sin embargo el valor de velocidad no pudo ser calculado por el desconocimiento de la cantidad exacta de cada componente del propóleo por ser este una sustancia natural con gran diversidad de componentes.

Siendo este un mecanismo de liberación ideal, cuando se quiere conseguir una acción farmacológica prolongada, ya que al implementar tecnologías de liberación controlada se presentan ventajas de dosificación con respecto a otras presentaciones, entre ellas se encuentran la disminución de los efectos colaterales secundarios, el

tiempo de actividad prolongado, y el brindar protección a fármacos sensibles contra los ataques enzimáticos o degradación ácida debido al pH local, todo lo expuesto constatado por Leonardi et al (2015)⁶⁹ y por Arias et al (2012)⁷⁰.

En este sentido, dadas las propiedades del quitosano como polímero bioadhesivo, además de incrementador de la absorción, se evidencia que promueve el paso de fármacos a través de la barrera mucosa, este se convierte en un potencial sistema para aplicaciones en liberación controlada, prolongando el tiempo de contacto en el sitio de absorción, sosteniendo el perfil de liberación y mejorando la biodisponibilidad de fármacos ello en concordancia con Barrios (2012)¹⁰⁷, Leonardi et al (2015)⁶⁹, Arias et al (2012)⁷⁰ y Harris (2010)¹¹⁰.

Lo antes descrito refleja un análisis para el componente químico objeto de estudio en la presente investigación. En relación al componente microbiológico, destinado a la determinación de la susceptibilidad de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 frente a membranas de quitosano-propóleo, los resultados demostraron susceptibilidad de ambos microorganismos en presencia de la membrana elaborada, visto a través de la presencia de halos de inhibición. Poniéndose de nuevo en evidencia las propiedades antibacterianas del quitosano tal como lo expresan Leo et al (2014)², Partir et al (2007)²⁸, Cortés et al (2008)⁸⁸, y del propóleo en correspondencia con Premoli et al (2010)³¹, Gil et al (2010)⁹¹ y Carrillo et al (2011)⁹².

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este capítulo se expondrán las conclusiones y recomendaciones de este trabajo de investigación.

5.1 Conclusiones

- En relación al componente químico estudiado en la presente investigación los resultados sobre determinación de pKa de membranas de quitosano/propóleo, demuestran que la presencia de propóleo en las películas no afecta la forma de la curva y los valores de pKa de los grupos aminos del quitosano, por lo cual las membranas conservan las propiedades mucoadhesivas que caracterizan al quitosano, manteniendo esa capacidad de liberación de fármacos.
- Con respecto a la velocidad de liberación de propóleo de las membranas en agua destilada, objetivo cumplido mediante espectroscopia UV-visible, se evidencia que el desprendimiento del propóleo en el tiempo es lineal, lo que implica que la concentración en el seno de la solución aumenta gradualmente, siendo esta una liberación controlada, prolongando el tiempo de contacto en el sitio de absorción, sosteniendo el perfil de liberación y mejorando la biodisponibilidad. Sin embargo el valor de velocidad no pudo ser calculado por el desconocimiento de la cantidad exacta de cada componente del propóleo por ser este una sustancia natural con gran diversidad de componentes.
- El análisis del componente microbiológico, dado a través de la determinación de la susceptibilidad de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 frente a membranas de quitosano-propóleo, empleando la prueba de Kirby-Bauer, refleja un resultado positivo evidenciado por la presencia de halos de inhibición en ambos cultivos a las 24 horas de ser incubados.

- El quitosano por sus características de compatibilidad y como transportador de fármacos tanto en Medicina como en Odontología y el propóleo con propiedades antibióticas, bactericidas, anestésicas, antiinflamatorias y regeneradoras, representan materiales de utilidad y de posible aplicación en la regeneración de tejidos blandos en cavidad bucal.

5.2 Recomendaciones

- Para estudios posteriores, se recomienda practicar los estudios químicos y microbiológicos haciendo uso de diferentes técnicas reflejadas en la literatura.
- Se sugiere, realizar estudios evaluando la susceptibilidad de microbiota habitual en cavidad bucal con un enfoque cuantitativo para la obtención de datos que reflejen mayor precisión, así como evaluar la susceptibilidad microbiana ante diversas concentraciones de propóleo.
- Se recomienda realizar estudios con aplicación clínica de las membranas de quitosano/propóleo elaboradas.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castillo L, García C, Reyes G, Arteaga S, Dávina L, Molina M. Aplicación del plasma rico en plaquetas en el tratamiento de defectos de cicatrización posterior a la extracción del tercer molar incluido: reporte de un caso. 2010;2(2):51–7. Available from: <http://www.odontologia.uady.mx/revistas/rol/pdf/V02N2p51.pdf>
2. Leo M, Parra S, Peña M, Martínez L, Oballos M. Biomateriales Para La Regeneración Del Reborde Alveolar: Revisión. Acta Bioclínica [Internet]. 2014;77–100. Available from: <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/actabioclinica/article/view/4965/4787>
3. Golbano N, García F, García J. Estética de los tejidos blandos periimplantarios. Cient Dent [Internet]. 2005;2(1):17–30. Available from: <http://www.coem.org.es/sites/default/files/revista/cientifica/vol2-n1/Golbano.pdf>
4. Quiroz S, Suárez D, Mantilla A, Velazco G, González A, J. M. Efectividad de los liposomas de quitosano en la regeneración ósea alveolar de terceros molares mandibulares retenidos. Revista Europea de Odontostomatología. Rev Eur Odontostomatol [Internet]. 2016;14. Available from: <http://www.redoe.com/ver.php?id=237>
5. Garay A, Altuve C, Castillo L, Gonzalez A, Yepes J. Plasma Rico en Plaquetas en la cicatrización de tejidos blandos de la cavidad bucal. Acta Bioclínica [Internet]. 2014;4(7). Available from: <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/actabioclinica/article/viewFile/4730/4498>
6. Ramirez K. Regeneración ósea Guiada Para Preservación del Reborde Alveolar en la Zona Anterior. Rev científica Odontológica [Internet]. 2009;5(1). Available from: <http://colegiodentistas.org/revista/index.php/revistaodontologica/article/view/169/240>

7. Fernández J. Regeneración Tisular Guiada en efectos periodontales. Uso de BioOss + BioGide. Fundamentos y procedimiento. [Internet]. Available from: http://www.fundacioncarraro.org/descarga/revista29_art6.pdf
8. Bascones A, Ibero I, Castro J, Lizardo P. Revisión de los estudios comparativos entre regeneración tisular guiada V cirugía mucogingival en el tratamiento de recesiones gingivales. Av en Periodoncia e Implantol Oral [Internet]. 2000;12(1):9–27. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852000000100002
9. Velazco G, Gonzáles A, Ortíz R, Yépez J. Membranas tridimensionales de hidroxiapatita y quitosano como terapéutica en regeneración ósea guiada. Estudio de caso. Int Assotiation Dent Res [Internet]. 2014;2(1):27–34. Available from: <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/rvio/article/view/4838>
10. Macías E. “Cicatrización Fisiológica Vs Cicatrización con implantación de células madre en alveólos de terceros molares extraídos” [Internet]. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil; 2011. Available from: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:yaHChSRNRNkJ:repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/879/1/T-UCSG-PRE-MED-ODON-39.pdf+&cd=22&hl=es-419&ct=clnk&gl=ve>
11. Ortega O, Paredes A. Análisis comparativo de la regeneración ósea obtenida con Quitosano y plasma rico en Fibrina [Internet]. Universidad de Los Andes. Facultad de Odontología.; 2012. Available from: <http://www.actaodontologica.com/ediciones/2014/2/art-2/>
12. Morales D, Vila D. Regeneración ósea guiada en estomatología. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2016;53(1). Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072016000100008
13. Streit F, Koch F, Laranjeira M, J N. Production of fungal chitosan in liquid

- cultivation using apple pomace as substrate. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2009;40(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768493/>
14. Rodríguez A, Ramírez M, Rivero D, Bosquez E, Barrera L, Bautista S. Propiedades Químico-Estructurales Y Actividad Biológica De La Quitosana En Microorganismos Fitopatógenos. *Rev Chapingo Ser Hortic* [Internet]. 2009;15(3):307–17. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2009000500012
 15. Ying H, Wang W, Tang X, Liu X. Osteogenic induction of bone marrow mesenchymal cells on electrospun polycaprolactone/chitosan nanofibrous membrane. *Dent Mater J* [Internet]. 2017; Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmj/advpub/0/advpub_2016-203/_article
 16. García D. Materiales macroporosos biodegradables basados en quitosano para la ingeniería tisular [Internet]. Universidad Politécnica de Valencia; 2008. Available from: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/4327/tesisUPV2973.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 17. Perchyonok V, Zhang S, Grobler S, Oberholzer T. Insights into and relative effect of chitosan-H, chitosan-H-propolis, chitosan-H-propolis-nystatin and chitosan-H-nystatin on dentine bond strength. *Eur J Dent* [Internet]. 2013;7(4):412–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4053664/>
 18. Carvalho C, López R, Silva J, Silva J, Mano J, Silva T, et al. Investigation of cell adhesion in chitosan membranes for peripheral nerve regeneration. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2016; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116323487>
 19. Juin-Yih S, Chen S, Chen Y, Chen W. Evaluation of Magnetic Nanoparticle-

- Labeled Chondrocytes Cultivated on a Type II Collagen–Chitosan/Poly(Lactic-co-Glycolic) Acid Biphasic Scaffold. 2017;18(1):87. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/1/87/htm>
20. Trepiana D. Síntesis de suspensiones de nanopartículas de cobre y quitosano, y evaluación de sus propiedades antimicrobianas frente a *Streptococcus mutans* [Internet]. 2015. Available from: <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/131959>
 21. Wang M, Roy AK, Webster T. Development of Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Electrospun Nanofibers for Infection Related Wound Healing. *Front Physiol* [Internet]. 2017;7(January):2016–8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2016.00683/full>
 22. Gómez C, Padilla M, Martínez V, Vaca F. Quitosana: alternativa terapéutica. *Rev Mex Periodontol* [Internet]. 2013;4(3):120–2. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/periodontologia/mp-2013/mp133e.pdf>
 23. Kekhasharú F, Costa E, Pires F, Fontes M, Furtado M. A quitosana como biomaterial odontológico e sua arte. *Rev Bras Eng Biofísica* [Internet]. 2013;29(1). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-31512013000100011&script=sci_arttext&tlng=pt
 24. Duarte M, Mano J, Paiva M, Alves N. Chitosan nanocomposites based on distinct inorganic fillers for biomedical applications. *Sci Technol Adv Mater* [Internet]. 2016;17(1):626–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14686996.2016.1229104>
 25. Araujo J, Negrón E, Velasco G, Suárez D, González A, Florido R, et al. Estudio comparativo histológico de la eficiencia del xerogel y liposoma a base de Quitosano para el tratamiento de la osteítis alveolar en ratas Wistar. *Rev Eur Odontoestomatol* [Internet]. 2015;(1–4). Available from: <http://www.redoe.com/print.php?id=225>
 26. Darolt J, Cezar A, Marcelo R, Piero D. Effects of the protective , curative , and

- eradivative applications of chitosan against *Penicillium expansum* in apples. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2016;47(4):1014–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.007>
27. Suárez D, García C, Yépez J, González A, Velazco G. Regeneración Osteomucosa con Membrana de Quitosano: Reporte de un caso. *Rev Eur Odontoestomatol* [Internet]. 2011;18:33–9. Available from: <http://www.redoe.com/ver.php?id=122>
 28. Partir DA, Camarón DEEDE, Juan P, Lemus F, Alejandra L, Zimeri M, et al. Obtención y uso de Quitosano para tratamientos [Internet]. 2007. Available from: http://www.fsalazar.bizland.com/LANDIVAR/ING-PRIMERO/boletin07/URL_07_QUI01.pdf
 29. Suárez D, García C, Velazco G, Ortiz R, González A. Biogel de Quitosano a partir de la desacetilación termoalcalina de conchas de camarón propuesta para el tratamiento de la estomatitis subprotésica. *Rev Odontológica los Andes* [Internet]. 2009;4(2):5–12. Available from: <http://revistas.falzar.ula.ve/andehp://www.actaodontologica.com/ediciones/2014/2/art-2/odontoula/article/view/7199/7071>
 30. Seol Y-J, Lee J-Y, Park Y-J, Lee Y-M, Young-Ku, Rhyu I-C, et al. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnol Lett* [Internet]. 2004;26(13):1037–41. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/B:BILE.0000032962.79531.fd>
 31. Premoli G, Laguado P, Díaz N, Romero C, Villareal J, González A. Uso del propóleo en Odontología. *Acta Odontológica Venez* [Internet]. 2010;48(2):1–13. Available from: <http://www.actaodontologica.com/ediciones/2010/2/art22.asp>
 32. Vagish L. Propolis in dentistry and oral cancer management. *N Am J Med Sci* [Internet]. 2014;6(6):11–20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4083525/>

33. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* [Internet]. 2002;73(SUPPL. 1):1–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12495704>
34. Pileggi R, Antony K, Johnson K, Zuo J, Shannon L. Propolis inhibits osteoclast maturation. *Dent Traumatol* [Internet]. 2009;25(6):584–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843135>
35. Rezende G, Costa L, Pimenta F, Baroni D. In vitro antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: A preliminary study. *Braz Dent J*. 2008;19(4):301–5.
36. Libério S, Pereira A, Araújo M, Dutra R, Nascimento F, Monteiro-Neto V, et al. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2009;125(1):1–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19422903>
37. Franca J, Luca M, Ribeiro T, Castilho R, Moreira A, Santos V, et al. Propolis - based chitosan varnish : drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. *Eur J Med Cent* [Internet]. 2014;14:1–11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25495921>
38. Takzaree N, Hadjiakhondi A, Hassanzadeh G, Rouini M, Manayi A. Synergistic effect of honey and propolis on cutaneous wound healing in rats. *Acta Med Iran* [Internet]. 2016;54(4):233–9. Available from: <http://acta.tums.ac.ir/index.php/acta/article/view/5023>
39. Reyes V. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica [Internet]. Universidad Mayor de San Marcos.; 2010. Available from: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3273/1/Reyes_cc.pdf
40. Więckiewicz W, Miernik M, Więckiewicz M, Morawiec T. Does propolis help to maintain oral health? *Evidence-Based Complement Altern Med* [Internet].

- 2013; Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/351062/>
41. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* [Internet]. 1998;36(4):347–63. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691597001452>
 42. Luaces G. Actividad antimicrobiana in vitro del quitosan/propóleo en gel sobre el *Enterococcus faecalis* [Internet]. Universidad de Cuenca; 2017. Available from: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/28167/1/TESIS PDF.pdf>
 43. Cujano L. Estudio in vitro del efecto antimicrobiano del propóleo sobre los microorganismos causantes de la gingivitis. [Internet]. Universidad Regional Autónoma de Los Andes “UNIANDES”. Facultad de Ciencias Médicas, carrera Odontología; 2016. Available from: <http://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/4029/1/PIUAODONT004-2016.pdf>
 44. Hozzein W, Pedr C, Al Ghamdi A, Seyed A, Al-Waili N, Garrard O. Topical application of propolis enhances cutaneous wound healing by promoting TGF- β /smad-mediated collagen production in a streptozotocin-induced type I diabetic mouse model. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(3):940–54.
 45. Ahangari Z, Naseri M, Jalili M, Mansouri Y, Mashhadiabbas F, Torkaman A, et al. Effect of propolis on dentin regeneration and the potential role of dental pulp stem cell in guinea pigs. *Cell J* [Internet]. 2012;13(4):223–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3584482/>
 46. Vaculik P, Cardozo B, Pérez S, Rosende R, Juárez R. Divulgación Aplicaciones del Propóleo en Ciencias de la salud . *Rev Fac Odontol* [Internet]. 2011;4(1):43–7. Available from: <http://revistas.unne.edu.ar/index.php/rfo/article/view/984>
 47. Kukreja B, Dodwad V. Propolis mouthwash: A new beginning. *J Indian Soc Periodontol* [Internet]. 2011;15(2):121. Available from:

<http://www.jisponline.com/text.asp?2011/15/2/121/84379>

48. Martinotti S, Ranzato E. Propolis : a new frontier for wound healing ? *Burn Trauma* [Internet]. 2015;3(9):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s41038-015-0010-z>
49. Pereira R, Bártolo P. Traditional Therapies for Skin Wound Healing. *Adv Wound Care* [Internet]. 2014;0(0):208–29. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/wound.2013.0506>
50. Farré R, Frasquet I, Sánchez A. El própolis y la salud. *Ars Pharm* [Internet]. 2004;45(1):21–43. Available from: <http://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5105/4918>
51. Cerda E. Efecto inhibitorio de cepa enterococcus faecalis usando propóleos ecuatorianos , gluconato de clorhexidina e hiplocorito de sodio: In vitro. [Internet]. Universidad Central de Ecuador; 2017. Available from: <http://www.dspace.uce.edu.ec:8080/bitstream/25000/8278/1/T-UCE-0015-453.pdf>
52. Vacañik P, Rosende O, Carcozo J, Pérez S, Fernández C. Acción antimicrobiana de extracto etanólico de propóleos sobre estreptococos mutans. 2014;16:81–6. Available from: <http://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/ODONTOLOGIA/article/view/104/PDF>
53. Bravo A, Díaz L, Gónzales L. Tratamiento de la alveolitis dental con tintura de Treatment of dental alveolitis with 5 % propolis tincture. *Rev Cuba Farm* [Internet]. 2012;46(1):97–104. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v46n1/far12112.pdf>
54. Noriega V. El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica. Curso de adaptación al grado. 2014.
55. Miranda M, Panis C, Depieri A, Da Silva S, Kawakami N, Lopes L, et al. Nitric oxide and Brazilian propolis combined accelerates tissue repair by

- modulating cell migration, cytokine production and collagen deposition in experimental leishmaniasis. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(5):1–19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25973801>
56. Azúa P, Chumi R. Eficacia del Propóleo al 10% en la cicatrización del alvéolo dental post exodoncia. *Acta Odontológica Venez* [Internet]. 2015;53(3). Available from: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2015/3/art-4/>
 57. Kilicoglu S, Kilicoglu B, Erdemli E. Ultrastructural view of colon anastomosis under propolis effect by transmission electron microscopy. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2008;14(30):4763–70. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v14/i30/4763.htm>
 58. Olczyk P, Komosinska V, Wisowski G, Mencner L, Stojko J, Kozma E. Propolis modulates fibronectin expression in the matrix of thermal injury. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014;2014. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/748101/>
 59. Jacob A, Abhishek P, Allan P, Davarani F. The effects of Malaysian propolis and Brazilian tree propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2015;15(1):294. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/15/294>
 60. Tobar N. Acción antimicrobiana para inhibir el *Enterococcus faecalis*: Análisis in vitro de dos medicamentos de uso externo, Paramonoclorofenol y Propóleo. Tesis [Internet]. 2012;59. Available from: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/3755/1/T-UCE-0015-117.pdf>
 61. Paz D, Sosa M, Dávila L, Velazco G, Arteaga S, Morales O, et al. Efectividad del Quitosano como coadyuvante en el tratamiento local de periodontitis crónica. *Acta Bioclínica* [Internet]. 2012;2(4):53–71. Available from: <http://revistas.saber.ula.ve/index.php/actabioclinica/article/view/4184/3974>
 62. Awawdeh L, Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus*

faecalis: A laboratory study. Aust Endod J [Internet]. 2009;35(2):52–8. Available from: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1747-4477.2008.00125.x/epdf?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase_site_license=LICENSE_DENIED

63. Felitti R. Propóleo en Odontología . Usos y aplicaciones. Atas Odontológicas [Internet]. 2014;11(1):30–7. Available from: <http://revistas.ucu.edu.uy/index.php/actasodontologicas/article/viewFile/967/959>
64. Gómez Y, Pardillo L, Sánchez L, Diaz L. El uso del propóleos al 5% en el tratamiento de la alveolitis_. 2008;10(1). Available from: [http://bvs.sld.cu/revistas/gme/pub/vol.10.\(1\)_06/vol.10.1.06.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/gme/pub/vol.10.(1)_06/vol.10.1.06.pdf)
65. Ozen T, Kilic A, Bedir O, Koru O, Sorkun K, Tanyuksel M, et al. In vitro Activity of Turkish Propolis Samples Against Anaerobic Bacteria Causing Oral Cavity Infections. Kafkas Univ Vet Fak Derg [Internet]. 2009;16(2):293–8. Available from: http://vet.fak.kfkas.edu.tr/extdocs/2010_2/93_298.pdf
66. Rojas JH, Plourde R. Extracción de par de iones y diagramas de distribución. Sus aplicaciones a la extracción en cromatografía de partición III. Reserpina y Rescinamina. Rev Colomb Cienc Quím Farm,. 1985;4(2):35–42.
67. Counts M, Vivo IN. Effect of a propolis extract on Streptococcus mutans counts in vivo. J Appl oral Sci [Internet]. 2007;15:420–3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19089172>
68. Pérez-Portuondo I, Aguilera-Rodríguez I, Casals-Hung M, Ábalos- Rodríguez A, Pérez-Silva RM. Evaluación mediante espectrofotometría UV-VIS derivativa de la degradación del 2-clorofenol. Rev Cuba Química [Internet]. 2013;XXV(3):318–27. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543736008>
69. Rómulo Leonardi, José Páez, Lorena Bustillos, Reynaldo Ortiz, Gladys

- Velazco AG. Detección de la liberación del fluconazol cargado en un adhesivo protésico. ACTA BIOCLINICA. 2015;5(10):140–8.
70. Arias B, Ortiz R, Velazco G. Determinación de la velocidad de liberación de metronidazol incorporado en membranas de quitosano , utilizando voltametría de pulso diferencial. Acta Bioclínica. 2012;2(3).
71. Cruz Quintana SM, Díaz Sjöstrom P, Arias Socarrás D, Mazón Baldeón GM. Microbiota of oral cavity ecosystems. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2017;54(1):84–99. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85019844032&partnerID=40&md5=33fe8cbd1d5e75ed5a0284f96b2507f1>
72. Serrano HA, Sánchez M, Cardona N. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. Rev CES Odontol [Internet]. 2015;28(2):112–8. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v28n2/v28n2a09.pdf>
73. Rea N. Respuesta Inmune innata y tolerancia oral frente a periodontopatógenos [Internet]. Pontificia Universidad Javeriana; 2005. Available from: <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis08.pdf>
74. Chacón I, Yépez J, Castillo J, Urdaneta, Leonidas Chidiak S, Jarpa P, Ballester L. Aislamiento de especies de pseudomonas de las líneas de agua de las unidades odontológicas. Acta odontológica Venez. 2010;48(1).
75. Santos LP, Torres DM. Evaluación de la contaminación microbiológica en los equipos radiográficos de una clínica dental privada. 2014;24(2):73–81.
76. Vallejos B, Marino A. Frecuencia de complicaciones post exodoncia simple. 2012;13(42):906–12. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2012/ora1242h.pdf>
77. Bachmann H, Cáceres R, Muñoz C, Uribe S. Complicaciones en Cirugía de Terceros Molares entre los Años 2007-2010, en un Hospital Urbano, Chile. Int J Odontostomatol [Internet]. 2014;8(1):107–12. Available from:

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2014000100014&lng=es&nrm=iso&tlng=es

78. Felzani R. Cicatrización de los tejidos con interés en cirugía bucal: Revisión de la literatura. *Acta Odontológica Venez* [Internet]. 2005;43(3). Available from: http://www.actaodontologica.com/ediciones/2005/3/cicatrizacion_tejidos.asp
79. Purificación Robles Rayaa, Ana Pilar Javierre Mirandab NMM, Ariadna Mas Casalsa E de FE y MLMA. Manejo de las infecciones odontogénicas en las consultas de atención primaria: ¿antibiótico? *Aten Primaria* [Internet]. 2017;49((10)):611–8. Available from: https://ac.els-cdn.com/S0212656717301348/1-s2.0-S0212656717301348-main.pdf?_tid=59f00f4d-1133-4df3-bc0e-31080f20b80b&acdnat=1543366128_7716edfa293f6e77ec4d26739b57d45a
80. Guzman J. extracciones de terceros molares: Revisión de literatura . 2012;5:50–62.
81. García Garbello M, Yassin García S, Pascoles Martínez A. Técnicas de preservación de alveolo y aumento del reborde alveolar: Revisión de la literatura. *Av Periodon Implant* [Internet]. 2016;28:71–81. Available from: <http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v28n2/original2.pdf>
82. Francesena Bacallao Z, Bosch Pons M. Regeneración tisular guiada en pacientes portadores de periodontitis crónica del adulto^ies. *Medisur* [Internet]. 2017;15(5):623–8. Available from: <http://es>
83. Kao RT, Takei H, Cochran DL NM. Periodontal Regeneration and Reconstructive Surgery. *Carranza's Clin Periodontol*. 61((8)):610–20.
84. Vargas L. Preservación de alveólos postexodoncia mediante el uso de diferentes materiales de injerto. Universidad Nacional de Colombia; 2011.
85. Arenaz J, Luaces R S, S, Patiño B, García A, Martín R, Ferreras J, Lorenzo F, Vázquez I LJ. A comparative study of platelet-rich plasma, hydroxyapatite, demineralized bone to promote bone regeneration after mandibular impacted

- thrid molar extraction. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* [Internet]. 2010;1((15):):483–9. Available from: http://www.medicinaoral.com/pubmed/medoralv15_i3_p483.pdf 48
86. Zigdon H, Machtei E. Zigdon H ME. The dimensions of keratinized mucosa around implants affect clinical and immunological parameters. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2008;19((6):):387–392. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0501.2007.01492.x/abstract;jsessionid=110217ED96AEF8BF22ACE2DE1F4E46FC.d04t03?systemMessage=Pay+Per+View+will+be+unavailable+for+upto+3+hours+from+06%3A00+EST+March+23rd+on+Wiley+Online+Library.+We+>
87. Orellana N, Ricardo C. Aplicación del quitosano como promotor de floculación para disminuir la carga contaminante. Universidad Politécnica Salesiana; 2011.
88. Cortés RJ, Cortés OJ, Álvarez SR. Quitosano: un Material con Propiedades Regenerativas y su Aplicación Clínica. *Rev Eur Odontol*. 2003;7(1):47–55.
89. Orlando Jorquera Cortés, Sonia Rivera Álvarez B, Rodrigo Jorquera Cortés, Quitosano: un Material con Propiedades Regenerativas y su Aplicación Clínica. *Rev Eur Odontol*. 7((1):):47–55.
90. Eun-Kyoung Pang J-WP et al. “Effects of chitosan on human periodontal fibroblasts in vitro and on bone formation in rat calvarial defects”. *J Periodontol*. 2005;76:1526–33.
91. Gil M, Colarusso V, Ferreira J, Ochoa G, Perozo E. Efecto de un extracto etanólico de propóleos sobre *Pseudomonas aeruginosa* en estado planctónico y sésil. *Rev Salus*. 2016;20:27–33.
92. Carrillo ML, Castillo LN, Mauricio R. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Inf Tecnol*. 2011;22(5):21–8.

93. Ossowski T, Goulart MOF, De Abreu FC, Sant'Ana AEG, Miranda PRB, Costa CDO, et al. Determination of the pKa values of some biologically active and inactive hydroxyquinones. *J Braz Chem Soc.* 2008;19(1):175–83.
94. J R. Development of Methods for the Determination of pKa Values. *Anal Chem Insights* [Internet]. 8:53–71. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3747999/#__ffn_sectitle
95. Nuñez VG. *Curvas De Titulacion De Acidos & Bases.* 2010.
96. Pongpanich B, Bhanchet P, Phanichyakarn P, Valyasevi A. Studies on dengue hemorrhagic fever. Clinical study: an evaluation of steroids as a treatment. *J Med Assoc Thail.* 1973;56(1):6–14.
97. Sánchez-García E, Castillo-Hernández SL, García-Palencia P. Actividad antimicrobiana. *Investig en plantas importancia médica* [Internet]. 2016;77–100. Available from: <http://www.omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/issue/view/34>
98. Lizcano A. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatóge. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias; 2008.
99. F. Reyes-Jurado EP y AL-M. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Sel Ing.* 2014;8(1):68–78.
100. Sampieri. *Metodología de la investigación.* 2000;580.
101. Sampieri RH, Lucio PB. *Metodología de la investigación.* 2006.
102. Arias F. *El proyecto de investigación Guía para su elaboración.* Editorial. Caracas; 1999.
103. Veiga, MD.; Ruiz R. El quitosano: usos farmacéuticos y biológicos. *Rev la*

Organ Farm Ibero-Latinoamericanos. 2004;14(2):33–42.

104. Lemus D, Gutiérrez B, Regla Cuba M. Actuación Del Personal De Enfermería Para Enfrentar El Maltrato Infantil [Internet]. 1989. Available from: www.convencionsalud2015.sld.cu/index.php/convencionsalud/2015/paper/.../794%0A
105. Kong H. Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 2013;1–9.
106. Expósito R. Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistema de liberación controlada de fármacos. Memoria para optar por el grado de doctor. [Internet]. Universidad de Complutense de Madrid. Facultad de ciencias biológicas.; 2010. Available from: <http://eprints.ucm.es/11160/1/T32051.pdf>.
107. Lisbeth A, Barrios P. Diseño de una película de quitosán como sistema terapéutico farmacéutico alternativo para el tratamiento de úlceras cutáneas. Universidad Nacional de Colombia; 2012.
108. Elizabeth J, James A. Incorporación de nanopartículas en películas de Quitosano Quirba 2011.
109. Avila AJ, Costamagna V, Barramentos E, Pucci G, Strumia MC. Películas de quitosano con sorbato de potasio unido física y covalentemente. estudios de aplicación. 2010;11(2):73–87.
110. Harris RE. Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. Universidad Complutense de Madrid; 2010.

ANEXOS Y APÉNDICES

APÉNDICE A

Operacionalización de Variables

Objetivo	Variable	Def Conceptual	Def Operacional	Indicadores	Instrumento	Ítem
Determinar el valor pKa de las membranas de quitosano/propóleo elaboradas a diferentes concentraciones.	Valor pKa del grupo amino las membranas de quitosano/propóleo.	Fuerza que tienen las moléculas al disociarse (es el logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido débil).	Fuerza de disociación del grupo amino de las membranas de quitosano/propóleo elaboradas.	- Titulación ácido-base.	Ficha de registro.	1
Identificar la velocidad de liberación de propóleo de las membranas en agua destilada, así como	Velocidad de liberación de propóleo de las membranas de quitosano/propóleo.	Proceso mediante el cual una porción del principio activo contenido en una formulación, es liberado para su	Proceso en el cual es liberado el propóleo de las membranas de quitosano/propóleo.	Respuesta espectroscopica de los componentes del propóleo.	Ficha de registro.	2 y 3

<p>la homogeneidad en su composición, mediante espectroscopia UV-visible, en intervalos de tiempo constantes.</p>		<p>absorción como dosis inicial y la otra porción son liberadas lentamente</p>				
<p>Determinar la susceptibilidad de <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> frente a membrana de quitosano-propóleo elaboradas con 0.5 ml de propóleo.</p>	<p>Actividad bactericida de quitosano-propóleo</p>	<p>Representa un efecto en el cual se produce la muerte a una bacteria.</p>	<p>Proceso a través del cual ciertas sustancias son capaces de acabar con bacterias.</p>	<p>-Crecimiento de colonias de <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> en agar-agar.</p>	<p>- Ficha de registro.</p>	<p>4</p>

APÉNDICE B



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOPATOLOGÍA
MÉRIDA – VENEZUELA

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

TÍTULO DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO: ESTUDIO DE PROPIEDADES QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE MEMBRANAS DE QUITOSANO/PROPÓLEO DE POSIBLE UTILIDAD EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS BLANDOS EN CAVIDAD BUCAL.

Autores: Marisen Leo Montilla y Leonardo Martínez Castillo.

Ítem 1. Determinación de valor pKa del gel de quitosano.

Película	Cód	Escala de valores	Valor de pKa de membrana
P1a	Cod 1. Inadecuado	pKa < 6	
	Cod 2. Adecuado	pKa > 6 = 6 - 6,5	
P1b	Cod 1. Inadecuado	pKa < 6	
	Cod 2. Adecuado	pKa > 6 = 6 - 6,5	
P1c	Cod 1. Inadecuado	pKa < 6	
	Cod 2. Adecuado	pKa > 6 = 6 - 6,5	
P2a	Cod 1. Inadecuado	pKa < 6	
	Cod 2. Adecuado	pKa > 6 = 6 - 6,5	
P2b	Cod 1. Inadecuado	pKa < 6	
	Cod 2. Adecuado	pKa > 6 = 6 - 6,5	

P2c	Cod 1. Inadecuado	$pK_a < 6$	
	Cod 2. Adecuado	$pK_a > 6 - 6,5$	
P3a	Cod 1. Inadecuado	$pK_a < 6$	
	Cod 2. Adecuado	$pK_a > 6 - 6,5$	
P3b	Cod 1. Inadecuado	$pK_a < 6$	
	Cod 2. Adecuado	$pK_a > 6 - 6,5$	
P3c	Cod 1. Inadecuado	$pK_a < 6$	
	Cod 2. Adecuado	$pK_a > 6 - 6,5$	

Ítem 2. Liberación de propóleo de las membranas en agua destilada, mediante espectroscopia UV-visible.

Tiempo	P1a	P1b	P1c	P2a	P2b	P2c	P3a	P3b	P3c
0,5									
30									
60									
90									
120									

Ítem 3. Pendientes de las curvas de liberación para las distintas porciones de películas estudiadas

Película	Pendiente	Error (S)
P1a		
P1b		

P1a, P1b, P1c (películas de quitosano con 0,5 ml de propóleo).
P2a, P2b, P2c (películas de quitosano con 0,4 ml de propóleo).
P3a, P3b, P3c (películas de quitosano con 0,3 ml de propóleo).

P1c		
P2a		
P2b		
P2c		
P3a		
P3b		
P3c		

Ítem 4. Capacidad antimicrobiana en cultivos de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*

Codificación	Presencia de zona de inhibición (mm)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Cod. 1 Susceptible	Presente		
Cod.2 Resistente	Ausente		

www.bdigital.ula.ve

P1a, P1b, P1c (películas de quitosano con 0,5 ml de propóleo).
P2a, P2b, P2c (películas de quitosano con 0,4 ml de propóleo).
P3a, P3b, P3c (películas de quitosano con 0,3 ml de propóleo).



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOPATOLOGÍA
MÉRIDA – VENEZUELA

CONSTANCIA DE VALIDACIÓN DE CONTENIDO

Yo, CARLA LUCIA DAVID PENA, titular de la cédula de identidad N° 17.048.560, de profesión ODONTOLOGO, ejerciendo actualmente como Docente Universitario en Anatomía Humana y doctorante en Biomateriales dentales y biología oral por la Universidad Federal de Pelotas-Brasil, en la institución Dpto de Biopatología, Facultad de Odontología- Universidad de Los Andes.

Por medio de la presente hago constar que he revisado con fines de validación de contenido el instrumento (Ficha de recolección de datos), a los efectos de su aplicación en el trabajo final de grado titulado “ESTUDIO DE PROPIEDADES QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE MEMBRANAS DE QUITOSANO/PROPÓLEO DE POSIBLE UTILIDAD EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS BLANDOS EN CAVIDAD BUCAL”.

Los resultados pertinentes a la experiencia solicitada, se registraron en el instrumento suministrado por el interesado. El juicio predominante (aprobado, aprobado con observaciones y rechazado), acerca de la totalidad del instrumento validado se indica a continuación:

Juicio predominante:

Aprobado Aprobado con observaciones _____
Rechazado _____ Observaciones

(opcional): _____

CARLA DAVID. C.I 17.048.560



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOPATOLOGÍA
MÉRIDA – VENEZUELA

CONSTANCIA DE VALIDACIÓN DE CONTENIDO

Yo, Elaysa J. Salas Osorio, titular de la cédula de identidad N° 11461193, de profesión Farmacéutico, ejerciendo actualmente como Profesor Agregado de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Odontología, en la institución Universidad de los Andes.

Por medio de la presente hago constar que he revisado con fines de validación de contenido el instrumento (Ficha de recolección de datos), a los efectos de su aplicación en el trabajo final de grado titulado "PROPiedades QUÍMICAS Y MICROBIOLOGICAS DE MEMBRANAS DE QUITOSAN ICOPOLÍMERO DE POSIBLE UTILIDAD EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS BLANCO, EN CAVIDAD BUCAL".

Los resultados pertinentes a la experiencia solicitada, se registraron en el instrumento suministrado por el interesado. El juicio predominante (aprobado, aprobado con observaciones y rechazado), acerca de la totalidad del instrumento validado se indican a continuación:

Juicio predominante:

Aprobado Aprobado con observaciones _____

Rechazado _____

Elaysa J. Salas Osorio
Profesor Agregado
Cátedra Microbiología
FOULA