Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Odontología
Escuela Profesional de Odontología

Actividad antimicrobiana del ácido 4-aminocarmínico cargado en portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*

TESIS

Para optar el Título Profesional de Cirujana Dentista

AUTOR

Gina Adaliz FRANCO QUISPE

ASESOR

Cesar Ivanovish FRANCO QUINO

Lima, Perú

2026



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Franco G. Actividad antimicrobiana del ácido 4-aminocarmínico cargado en portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología, Escuela Profesional de Odontología; 2026.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Gina Adaliz Franco Quispe
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70223273
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-7977-3652
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Cesar Ivanovish Franco Quino
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70516067
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-1773-3019
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Elba Estefanía Martínez Cadillo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08621492
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Martha Cecilia Rodríguez Vargas
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25829295
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.5.0.8: Materiales dentales e innovación tecnológica considerando el medio ambiente
Grupo de investigación	INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS ESTOMATOLÓGICAS - ICBEST

Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Proyectos de Investigación Multidisciplinarios, Contrato N° C2407001m.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Ecología Microbiana, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Centro poblado: Ciudad Universitaria Urbanización: No aplica Manzana y lote: No aplica Calle: Calle Germán Amézaga N° 375 Latitud: -12.05603 Longitud: -77.08434
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2024 – 2026
URL de disciplinas OCDE	Odontología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.02.14 Nanomateriales https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.10.01 Nanotecnología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.10.00 Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ESCUELA PROFESIONAL

A C T A DE SUSTENTACIÓN PRESENCIAL N.° 044/FO-EPO/2026

Los Docentes que suscriben, reunidos el 21 de septiembre de 2026 en la ciudad de Lima, siendo las 11:00 horas, por encargo de la Señora Decana de la Facultad, con el objeto de constituir el Jurado de Sustentación para optar el Título Profesional de Cirujana Dentista de la Bachiller:

GINA ADALIZ FRANCO QUISPE

CERTIFICAN:

Que, luego de la Sustentación de la Tesis «**Actividad antimicrobiana del ácido 4-aminocarmínico cargado en portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.**"» y habiendo absuelto las preguntas formuladas, demostró un grado de aprovechamiento:

SOBRESALIENTE
(escala)

Siendo calificada con un promedio de: VEINTE (en letras) 20 (en números)

En tal virtud, firmamos en la Ciudad Universitaria, a los veintiún días del mes de septiembre del año dos mil veintiséis.

PRESIDENTE DEL JURADO

Blga. Elba Estefanía Martínez Cadillo

MIEMBRO SECRETARIO

Dra. Martha Cecilia Rodríguez Vargas

MIEMBRO VOCAL (ASESOR)

Mg. Cesar Ivanovish Franco Quino

Escala de calificación: Grado de Aprovechamiento:
Sobresaliente (18-20), Bueno (15-17), Regular (12-14), Desaprobado (11 o menos)
Criterios: Originalidad, Exposición, Dominio del Tema, Respuestas.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

Anexo 1
CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, CESAR IVANOVISH FRANCO QUINO en mi condición de asesor acreditado con el Dictamen de la EPO N° 00024-FO-EPO-2026 de la tesis, cuyo título es: **Actividad antimicrobiana del ácido 4-aminocarmínico cargado en portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) sobre *Streptococcus mutans y Porphyromonas gingivalis***

presentado por el bachiller GINA ADALIZ FRANCO QUISPE para optar el Título Profesional de Cirujana Dentista.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 3% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del Título Profesional de Cirujana Dentista.

Lima, 08 de Octubre de 2026

Firma del Asesor:

Nombres y Apellidos del asesor: Cesar Ivanovish Franco Quino

DNI: 70516067



* Según corresponda: bachiller, magíster, doctor; título profesional o título de segunda especialidad

La vigencia del presente certificado corresponde a un período de noventa (90) días desde la fecha de su emisión; siempre que no haya observaciones en el texto durante el proceso de revisión por el jurado informante o surja alguna contingencia.

DEDICATORIA

A mis padres, Teofilo Franco y Segundina Quispe, por su amor incondicional, su esfuerzo constante. Darme la oportunidad de formarme y superarme como profesional es el regalo más valioso que he recibido; su ejemplo es y seguirá siendo mi mayor inspiración.

A mis hermanos, y a Carlita, una hermana más para mí, por su cariño y por acompañarme en el inicio de este viaje.

A la familia Alcántara, por acogerme con tanto cariño todo este tiempo, por cuidar siempre de mí y celebrar cada uno de mis logros como propios. En especial a Jhostyn, por su cariño y apoyo incondicional, su paciencia frente a las jornadas largas y por ser un refugio constante de aliento en los momentos de mayor exigencia.

A Dios, por darme firmeza, convicción y la guía necesaria para superar cada desafío y transformar el esfuerzo de estos años en la meta cumplida de mi profesión.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a la Facultad de Odontología, por abrirme sus puertas y brindarme la formación profesional e integral en sus aulas.

Al financiamiento otorgado por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos mediante el Proyecto Multidisciplinario “Síntesis y caracterización de nuevos materiales nanoestructurados para aplicaciones odontológicas” (Código: C2407001m), cuya subvención hizo posible el desarrollo integral de esta investigación.

A mi asesor de tesis, el Mg. Cesar Franco, y a los miembros del jurado evaluador, por su valiosa orientación, constante guía metodológica y por compartir su conocimiento y tiempo para la culminación de esta investigación.

Al Dr. Jorge León Q., Dr. Julio Santiago C y mis compañeros de laboratorio de Ecología Microbiana Paula, Ciro, Moises y Eleazar de las Facultades de Ciencias Biológicas y Química, por su respaldo técnico, facilidades, aprendizaje compartido y apoyo mutuo durante la fase experimental de este estudio.

A mis amigas, por su amistad, por compartir conmigo los desvelos de la etapa universitaria, por su apoyo mutuo y por hacer de este proceso una experiencia inolvidable.

RESUMEN

Introducción: La resistencia bacteriana frente a antimicrobianos en Odontología exige desarrollar nuevas alternativas antisépticas basadas en principios activos puros y nanoestructurados.

Objetivo: Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana del ácido 4-aminocarmínico (4-AC) cargado en sistemas de portadores lipídicos nanoestructurados (NLC al 0,2 %) ante *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. **Metodología**: Analizamos seis grupos experimentales: Clorhexidina 0,12 % (control positivo), NLC vacías (control negativo), ácido carmínico libre al 20 % (AC), ácido 4-aminocarminico libre al 20 % (4-AC), NLC-AC al *0,2 %* y NLC-4-AC al *0,2 %* a pH 7.0. La susceptibilidad se midió mediante difusión profunda en pocillo y goteo superficial. El análisis de datos se procesó con ANOVA y pruebas post hoc de Tukey ($p < 0.05$).

Resultados: Frente *a P. gingivalis*, el AC libre al *20 %* obtuvo los mayores halos de inhibición (35.41 ± 2.45 mm en pocillo y 33.20 ± 1.68 mm en goteo), seguido por el 4-AC libre al *20 %* y el sistema nanoestructurado NLC-AC *0,2 %*. En cambio, NLC-4-AC *0,2 %* y el 4-AC libre mostraron una actividad nula (0.00 ± 0.00 mm) frente a *S. mutans*

Conclusión: 4AC- La nanoencapsulación en portadores lipídicos (NLC) mantiene la acción antimicrobiana del ácido carmínico frente a *Porphyromonas gingivalis* aún bajo concentraciones ultradiluidas, mientras que el ácido 4- aminocarmínico anula la respuesta biológica.

Palabras clave: Carmín – Antraquinonas - nanopartículas de lípidos - *Streptococcus mutans* - *Porphyromonas gingivalis*

ABSTRACT

Introduction: Bacterial resistance in dentistry requires the development of novel antiseptic options base don pure or nanoestructured active ingredients. **Objective**: To evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of 4-aminocarminic acid (4-AC) loaded into nanostructured lipid carriers (NLC at *0,2 %*) against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Methodology**: Six experimental groups were analyzed: a (*0,12 %* Chlorhexidine (positive control), a negative control (empty NLCs), 20 % free carminic acid (AC), *20 %* free 4-aminocarminic acid (4-AC), NLC-AC at *0,2 %*, and NLC-4-AC at *0,2 %* at pH 7.0. Susceptibility was determined by well diffusion and surface drop plate methods. Data were analyzed using ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$).

Results: Against *P. gingivalis*, free AC at *20 %* generated the largest inhibition zones (35.41 ± 2.45 mm in well and 33.20 ± 1.68 mm in drop), followed by free 4-AC at *20 %* and the NLC-AC *0,2 %* nanostructured system. In contrast, NLC-4-AC *0,2 %* and free 4-AC showed no activity (0.00 ± 0.00 mm) against *S. mutans*.

Conclusion: Incorporating into lipid carriers (NLC) manteins the antimicrobial action of carminic acid against *Porphyromonas gingivalis* using ultradiluted concentrations, whereas the 4-aminocarminic acid (4-AC).

Keywords: Carmine – Anthraquinones – Lipid nanoparticles – *Streptococcus mutans* – *Porphyromonas gingivalis*.

INDICE

I. INTRODUCCION

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN 3

2.1 ÁREA PROBLEMA 3

2.2 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA 6

2.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN: 9

2.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION: 9

2.4.1 **Objetivo General:** 9

2.4.2 Objetivos específicos. 9

2.5 JUSTIFICACION 10

2.6 LIMITACIONES 11

III. MARCO TEORICO 13

3.1 ANTECEDENTES 13

3.2 BASES TEORICAS 17

3.2.1 Productos naturales como fuente de nuevos antimicrobianos naturales 17

3.2.2 Acido 4-aminocarminico como nuevo antimicrobiano innovador 20

3.2.3 Nanoformulaciones para superar limitaciones de los productos Naturales 25

3.2.4 Microorganismos objeto de estudio. 30

3.3 Definición de términos 33

3.4 Hipótesis 35

3.4.1 Hipótesis del trabajo: 35

3.5 Operacionalización de variables 35

3.5.1 Variables: 35

IV: DISEÑO METODOLOGICO 37

4.1 Tipo y diseño de investigación: 37

4.2 Población y muestra: 37

4.2.1 Población: 37

4.2.2 Muestra: 37

4.2.3 El tamaño de la muestra: 38

4.3 CRITERIOS 38

4.3.1 Criterios de inclusión: 38

4.4 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS O MÉTODO 39

4.4.1 FASE QUÍMICA: PREPARACIÓN DE NANOMATERIALES 39

4.4.2 FASE MICROBIOLÓGICA: 42

4.5 RECOLECCIÓN DE DATOS 46

4.6 ANALISIS ESTADÍSTICO: 46

4.7 CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD 47

V. RESULTADOS 48

5.1 Ensayos microbiológicos frente a *Streptococcus mutans* 49

5.2 Ensayos microbiológicos frente a *Porphyromonas gingivalis* 52

VI. DISCUSIÓN 57

VII. CONCLUSIÓN 64

VIII. RECOMENDACIONES 65

X. ANEXOS..... 84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Mecanismos de acción antibacteriana de los productos naturales de origen vegetal 18

Tabla 2 Características generales de los péptidos antimicrobianos (AMP)..... 19

Tabla 3 Sustituyentes en los colorantes rojos de cochinilla que muestran los grupos variables 22

Tabla 4. Matriz de operacionalización de variables del diseño experimental 36

Tabla 5. Condiciones operacionales para el crecimiento y mantenimiento de las cepas estándares. 43

Tabla 6. Actividad antimicrobiana por el método de Difusión Profunda (Pocillo) frente a *Streptococcus mutans* 49

Tabla 7. Actividad antimicrobiana por el método de Goteo Superficial frente a *Streptococcus mutans* 50

Tabla 8. Actividad antimicrobiana por el método de Difusión Profunda (Pocillo) frente a *Porphyromonas gingivalis* 52

Tabla 9. Actividad antimicrobiana por el método de Difusión Superficial (Goteo) frente a *Porphyromonas gingivalis*. 54

Tabla 10. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los halos de inhibición neta según especie bacteriana y método de difusión. 92

Tabla 11. Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene para los grupos de tratamiento evaluados en *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*.... 94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los colorantes rojos de la cochinilla..... 21

Figura 2 Estructura química del ácido carmínico..... 23

Figura 3. Estructura química del ácido 4-aminocarmínico. 24

Figura 4. Tipos de portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) según el modelo de Muller..... 28

Figura 5. Comparación de los halos de inhibición neta entre las técnicas de difusión profunda y goteo superficial frente a *S. mutans* 51

Figura 6. Comparación de los halos de inhibición neta entre las técnicas de difusión profunda y goteo superficial frente a *Porphyromonas gingivalis*..... 55

Figura 7. Fases consecutivas del aislamiento, purificación y modificación estructural de las antraquinonas puras. 87

Figura 8. Actividad antimicrobiana sobre *P. gingivalis*. 95

Figura 9. Actividad antimicrobiana sobre *S. mutans*..... 96

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Matriz de tabla de consistencia. 84

Anexo 2: Hoja de recolección de datos. 86

Anexo 3: Evidencia fotográfica de las fases de obtención de los principios activos antraquinónicos 86

Anexo 4: Certificación y trazabilidad biológica de las cepas de referencia. 87

Anexo 5: Análisis estadístico de validación de supuestos (spss v.26) pruebas de normalidad e igualdad de varianzas..... 91

Anexo 6: Evidencia fotográfica del procedimiento..... 95

Anexo 7: Constancia de uso de laboratorios o guía de fabricación de las NLC... 97

INTRODUCCIÓN

Desarrollar nuevas estrategias farmacológicas orientadas al control de patologías prevalentes en la cavidad bucal constituye un reto para la odontología contemporánea. Históricamente, la caries dental y la enfermedad periodontal representan las afecciones bacterianas de mayor impacto debido a su carácter crónico y multifactorial (1). Ambos procesos patológicos inician con la organización de biopelículas complejas sobre las superficies dentarias, propiciando la destrucción progresiva de los tejidos de soporte(1). Entre los agentes etiológicos involucrados, *Streptococcus mutans* destaca por su capacidad acidogénica y acidúrica en el desarrollo de la lesión cariosa (2,3), mientras que *Porphyromonas gingivalis* se consolida como un patógeno clave en la destrucción de tejidos de soporte durante la periodontitis (4,5).

Ante el incremento global de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos convencionales, evaluar productos naturales puros se convierte en una prioridad científica sanitaria (6). En esta línea de compuestos bioactivos, el ácido carmínico (antraquinona purificada extraída de las hembras secas del insecto *Dactylopius coccus)* despertó un especial interés biológico (7). Investigaciones previas evidenciaron que este principio activo posee una acción bactericida directa frente a determinados patógenos(8). Sin embargo, las limitaciones propias de los compuestos naturales libres como su inestabilidad química, baja solubilidad y rápido aclaramiento en el medio salival, comprometen su eficacia clínica en el entorno oral.

Para optimizar estas propiedades farmacodinámicas, la nanomedicina aplicada introdujo sistemas de entrega coloidales avanzados (60). Los portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) de segunda generación, desarrollados a partir de matrices biocompatibles y estables, permiten la encapsulación eficiente de principios activos puros. Al incorporar el ácido carmínico dentro de estos transportadores nanométricos

neutralizados, logramos modular su liberación y favorecer la interacción interfacial directa con las envolturas celulares microbianas (9). Esto permite potenciar el efecto biológico con dosis mucho menores a las requeridas en su estado libre.

A pesar de estas ventajas coloidales, la literatura científica carecía de evaluaciones cuantitativas que contrastaran de forma simultánea el impacto de estas nanoformulaciones frente a la modificación estructural por aminación de la molécula nativa. El ácido 4-amino carmínico es una variante química que conserva propiedades bacteriostáticas específicas, presenta un comportamiento físico y una reactividad electroquímica distinta ante diferentes arquitecturas de la pared bacteriana (10–12). Determinar cómo responden las cepas Grampositivas y Gramnegativas ante el compuesto libre y nanoestructurado bajo condiciones de pH salival estandarizadas es indispensable para validar el desarrollo de futuras terapias tópicas dirigidas.

Por consiguiente, el objetivo general de esta investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del ácido carmínico y del ácido 4-amino carmínico, en estado libre al *20 %* y encapsulados en portadores lipídicos nanoestructurados al *0,2 %*, frente a cepas estándar de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. La justificación del estudio radica en la necesidad de proveer evidencia científica rigurosa respecto al principio de selectividad interfacial y los mecanismos de difusión de estos nuevos sistemas de entrega farmacológica (13), contribuyendo directamente al diseño de alternativas preventivas y terapéuticas eficientes para el manejo de la caries y enfermedad periodontal.

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1 ÁREA PROBLEMA

El panorama de salud estomatológica global enfrenta una crisis compleja, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2022, las patologías bucodentales de mayor prevalencia están encabezadas por la caries dental no tratada, afecciones periodontales crónicas, el edentulismo subsecuente y las neoplasias de la cavidad oral (14). Estas condiciones ejercen un impacto severo en la calidad de vida. Asi mismo, afectan negativamente la salud física, el bienestar emocional, mental y social de las personas(14).

La caries afecta a más de la mitad de población mundial. Su mayor prevalencia se concentra en comunidades con reducido acceso económico (14–16). Por su parte, la periodontitis continúa siendo un problema creciente. Esta afección daña aproximadamente al 60% de la población mundial entre la tercera y cuarta década de vida, su prevalencia aumenta proporcionalmente con la edad según estudios recientes(15,16).

En Perú, los estudios epidemiológicos de las Enfermedades bucodentales es escasa; sin embargo, algunos reportes sugieren que la periodontitis afecta a casi la mitad (48.5%) de la población adulta. La caries presenta una situación más crítica, alcanzando a casi al 80% de los individuos (17,18). Ambas patologías constituyen una carga económica al sistema de salud nacional. En el caso específico de la caries es tan prevalente que triplica el número de casos de otras enfermedades no transmisibles (ENT) como son los trastornos mentales, enfermedades

cardiovasculares, neurológicas, diabetes mellitus tipo 1 y 2, enfermedades respiratorias crónicas y cánceres, según datos de la OMS(19).

La caries es una enfermedad multifactorial que conduce a la degradación de material mineral y proteico del diente, donde participan muchas bacterias acidófilas, siendo el *Streptococcus mutans* un importante agente cariogénico responsable de iniciar la colonización microbiana en la cavidad oral; posee la capacidad de sintetizar glucanos solubles e insolubles de los azúcares provenientes de la dieta mediante las enzimas glucosiltransferasas, favorable para la formación de biopelículas estables en la superficie del diente, conocidas tambien como biofilm (20,21) el cual, es considerado como el factor etiológico primario para la mayoría de las enfermedades dentales y periodontales (22).

Asimismo, la periodontitis es una enfermedad asociada a la disbiosis microbiana y mediada por la respuesta inflamatoria del huésped, provoca la pérdida de la inserción periodontal (signo conocido como bolsa periodontal) que afecta al hueso alveolar (23). Está asociada a bacterias Gramnegativas y virulentas del complejo rojo / naranja de Socransky (24), como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Rothia spp. Bacteroides sp., Treponema sp., Fusobacterium sp., Prevotella sp.,Campylobacter s p. y Eikenella* , siendo la *Porphyromonas gingivalis*, la principal bacteria periodontopatógena (25,26).

Estas bacterias actúan induciendo la disbiosis del biofilm subgingival y permitiendo el desarrollo de algunas especies sobre otras, modulando la patogenicidad de la muy variada comunidad microbiana (27).

Por esta razón, la elección de tratar tanto a *Streptococcus mutans* como a *Porphyromonas gingivalis* responde al comportamiento de ambas bacterias en

etapas clave del desarrollo de la placa bacteriana. Mientras *S. mutans* promueve la formación del biofilm, *P. gingivalis* se incorpora en etapas avanzadas dentro del espacio subgingival para consolidar la enfermedad periodontal. Asi, al probar los sistemas nanoestructurados frente a ambas bacterias podemos medir su eficacia a lo largo del proceso infeccioso, abarcando desde la colonización inicial de la caries hasta el establecimiento de la enfermedad periodontal.

Debido a la alteración del biofilm y el efecto inflamatorio que representa la superficie de la bolsa periodontal, la periodontitis contribuye como factor de riesgo a enfermedades sistémicas como las cardiovasculares y otras ya mencionadas; por lo que la periodontitis requiere tratamiento oportuno y adecuado, siendo la remoción mecánica de la biopelícula subgingival es el Gold estándar; sin embargo, para mejorar la eficacia del tratamiento mecánico se ha introducido diferentes complementos, como el uso de antimicrobianos en diferentes dosis y vías de administración (22). Desde el punto de vista odontológico, la terapia periodontal enfrenta desafíos significativos debido a la complejidad estructural de la biopelícula dental, la cual dificulta la administración efectiva de antimicrobianos a bacterias individuales en protocolos ya establecidos, como amoxicilina, metronidazol, azitromicina y tetraciclina (28). El fácil acceso a antibióticos en algunos países provoca su uso excesivo, afectando a especies comensales beneficiosas que ayudan a controlar el crecimiento del biofilm patógeno y elevar la tasa de cepas bacterianas resistentes convirtiéndolo en una de las principales causas del desarrollo de resistencia a los antimicrobianos, causantes de la mayor tasa de morbilidad y mortalidad a nivel global (29–31). Para superarlas, están usando nanotransportadores como sistema innovador de administración de fármacos (32). En la medicina, la nanotecnología ha estudiado estos nanotransportadores donde partículas nanoestructuradas como la nano hidroxiapatita (nano-HAP) y

nanopartículas de plata (AgNPs) han mostrado propiedades antimicrobianas (33,34), algunos bioplásticos, como el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), son utilizados como nanofibras en dispositivos para administrar fármacos (35).

2.2 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

La resistencia bacteriana es definida como la capacidad de los microorganismos para evolucionar y resistir los efectos de los antibióticos, representa una de las diez principales amenazas para la salud mundial según la OMS (36). Múltiples usos inadecuados de los antibióticos en diversas áreas y en su forma de eliminación, además del impacto ambiental, aceleran la propagación de la resistencia bacteriana a nivel global (37–39). Para agravar el problema, algunos de los antibióticos utilizados comúnmente, no pueden contrarrestar especies altamente resistentes como *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes y Staphylococcus aureus*, incrementando la morbimortalidad cada año (22). A ello se suma la falta de investigación y creación de nuevos antibióticos desde 1980, en su lugar se han creado modificaciones o combinaciones de antibióticos clásicos (alrededor del 73 % de los nuevos antibióticos se basan en antibióticos más antiguos, como la penicilina y las quinolonas (6), que podrían ser superados por el rápido crecimiento de la resistencia bacteriana. Desafortunadamente, esta amenaza está provocando un incremento en la estancia hospitalaria, incremento en los costos médicos de tratamiento y una mayor tasa de mortalidad. Por ejemplo, solo en Perú (2021) se han encontrado especies resistentes a algunos antibióticos, como *Actinomyces naeslundii,* que es resistente a penicilina y tetraciclina; *Eikenella corrodens* resistente a dicloxacilina; *y Rothia dentocariosa*, la más común en las muestras, fue resistente

a amoxicilina más ácido clavulánico y metronidazol (26). A este escenario se suma la creciente perdida de susceptibilidad de P*orphyromonaas gingivalis* frente a los esquemas antimicrobianos de primera línea empleados como coadyuvantes en periodontitis. Investigaciones regionales reportan tasas de resistencia que oscilan entre el 21% y el 25% para amoxicilina, metronidazol y clindamicina (40,41), impulsadas por la expresión de determinantes genéticos de resistencia y la producción de β-lactamasas. Esta progresiva refractariedad compromete el control de cuadros severos o recurrentes, exigiendo la búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces.

Esta amenaza podría sobrecargar los sistemas de salud y la economía a nivel global. Por tanto, se ha desafiado a los investigadores a identificar productos naturales como fuentes de nuevos fármacos durante las últimas cuatro décadas (6,42,43).

Diversos estudios han investigado compuestos lipídicos a base de té, salvia, orégano, cola de caballo, llantén, arándanos, matico, extractos herbales, propóleos, acido carmínico, entre otros. (44–48). Estos compuestos, contienen metabolitos secundarios capaces de inhibir o ralentizar el crecimiento de bacterias, levaduras y hongos, a través de múltiples objetivos, induciendo cambios estructurales a nivel de la membrana celular, ADN y el citoplasma(49); esto ha sido evidenciado contra *Streptococcus mutans* (50–53)y *Porphyromonas gingivalis*(54–56). Aunque los productos naturales tienen beneficiosas propiedades farmacológicas, enfrentan limitaciones de biodisponibilidad y farmacocinética debido a los problemas de solubilidad, absorción e hidrofilicidad.

La necesidad de terapias antibacterianas accesibles y efectivas en Latinoamérica, hace que sea fundamental investigar y validar la eficacia antibacteriana de los componentes naturales; en este contexto, el ácido carmínico (con formula química

$C_2H_2O_3$), un compuesto hidroxiantraquinona natural derivado de la cochinilla (*Dactylopius coccus*) con predominio geográfico en América Latina(7,57), ha despertado interés en la comunidad científica debido a sus propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales y antivirales(8,58,59). Estudios recientes, como los de Galán Luna y col (8) y Méndez Gallegos y col.(60) , han demostrado el potencial del extracto de cochinilla (que contiene al ácido carmínico) como agente antibacteriano y también marcador del biofilm. Estos hallazgos sugieren que el ácido carmínico podría ser un componente valioso para el tratamiento y prevención de enfermedades orales en Latinoamérica; Sin embargo, se desconoce el efecto de sus derivados como el ácido 4-aminocarmínico, el cual podría tener efectos potencialmente superiores.

Por tanto, comprometidos en la búsqueda de alternativas naturales y sostenibles frente al aumento de la resistencia a antibióticos nos apoyamos en la nanotecnología y la actividad antimicrobiana de productos naturales como medio alternativo. La nanotecnología también ha incorporado el ácido carmínico, a través de las nanopartículas de sílice con ácido carmínico unido covalentemente para ser un nanoexcipiente pigmento-antioxidante bifuncional seguro y eficiente para estabilizar emulsiones farmacéuticas (58). En este contexto es de interés estudiar el principio activo y sus derivados en diferentes vehículos nanoestructurados, por lo que se pretende evaluar el efecto antibacteriano del ácido 4-amino carmínico como una alternativa para combatir infecciones orales; buscando encontrar soluciones efectivas, sencillas y seguras para prevenir, y tratar la caries y la enfermedad periodontal.

2.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:

¿Cuál será la actividad antimicrobiana del ácido 4-amino carmínico cargado en portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*?

2.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION:

2.4.1 **Objetivo General:**

Evaluar la actividad antimicrobiana del ácido 4-aminocarmínico cargado en portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*

2.4.2 Objetivos específicos.

- Determinar la actividad antimicrobiana del ácido 4-aminocarmínico en estado libre, en evaluación comparativa frente a su precursor basal “Ácido carmínico” sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del ácido 4-aminocarmínico y su precursor basal “ácido carmínico” cargados en portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* mediante técnicas de difusión biológica.

- Comparar la efectividad farmacodinámica de los portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) cargados frente a sus contrapartes en estado libre y los controles experimentales.

2.5 JUSTIFICACION

Los compuestos fenólicos constituyen una de las clases de compuestos más extendidas en la naturaleza. Estas moléculas destacan por sus efectos biológicos beneficiosos asociados a sus actividades antioxidantes y anticancerígenas(61). Se ha estudiado su aplicación en la prevención y el tratamiento de numerosas enfermedades crónicas. Sin embargo, una importante limitación sigue siendo su baja biodisponibilidad. Asi mismo, manifiestan inestabilidad frente al pH, la temperatura y, en algunos casos, la luz(61). Para superar estas limitaciones, la nanomedicina se ha consolidado como una alternativa viable. El uso de sistemas de encapsulación lipídica es una técnica prometedora para lograr una administración eficaz de fármacos, protegiendo las moléculas de factores externos y mejorando su biodisponibilidad.

Las antraquinonas son una clase de compuestos fenólicos que pueden actuar como antioxidantes naturales. Junto con los polifenoles, las vitaminas y los carotenoides, estos compuestos fortalecen el sistema de defensa de los organismos y son considerados antibióticos naturales(62). El principal mecanismo de acción de los compuestos fenólicos está relacionado con su capacidad para reducir la expresión de las bombas de eflujo, inhibiendo el crecimiento bacteriano. Al igual que las antroquinolonas cuyo objeto diana es atacar el ADN girasa en *Porphyromonas gingivalis* (63), ciertas moléculas como los taninos y las antraquinonas tambien inhiben la enzima ADN girasa, ralentizando el crecimiento microbiano(64).

En este contexto, la literatura científica solo registra el uso de la grana cochinilla como un extracto biológico complejo para el control bacteriano. El potencial antimicrobiano del ácido carmínico, como molécula libre y pura no ha sido evaluado previamente de forma aislada. No obstante, se conoce que cuando el ácido carmínico entra en contacto con el amoniaco, ocurre una reacción química no reversible. Este proceso hace que el color rojizo se torne violeta y origina un componente derivado significativamente más estable “acido-estable” a la foto degradación: el “Ácido 4-aminocarmínico”(7).

Al tratarse de un derivado con mayor estabilidad frente la degradación química, resulta relevante corroborar si la modificación estructural condiciona su comportamiento e ionización en el entorno biológico. Asi mismo, es necesario determinar si la variante modificada preserva o altera la eficacia antimicrobiana propia del núcleo antraquinónico basal. Por esta razón, la presente investigación evaluó el potencial antibacteriano del ácido 4-aminocarmínico dopado en portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) para optimizar la biodisponibilidad del principio activo modificado. Los resultados obtenidos aportan información científica inédita dirigida al desarrollo de nuevos biomateriales, posicionando a las nanoformulaciones cargadas con ácido 4-aminocarminico (4-AC) como candidatos prometedores para el diseño de terapias locales no quirúrgicas contra la periodontitis y antibiofilm para el control de la caries dental.

2.6 LIMITACIONES

La reactivación y el mantenimiento de las bacterias anaeróbicas ATCC representaron un reto técnico considerable debido a sus exigentes requerimientos nutricionales y

ambientales de cultivo. Lograr las condiciones óptimas de viabilidad y desarrollo exigió una calibración minuciosa estandarizada previamente en ensayos piloto.

Por otra parte, debe considerarse que el comportamiento *in vitro* difiere del modelo *in vivo*, donde la coexistencia polimicrobiana dentro de biopelículas altamente organizadas modifica la susceptibilidad frente a principios activos y nanoformulados. No obstante, los ensayos *in vitro* implementados constituyen la fase analítica esencial para validar la actividad biológica inicial y la viabilidad de estas nuevas plataformas coloidales.

Finalmente, la disponibilidad de recursos limito el alcance del estudio respecto al número de cepas evaluadas y la variedad de condiciones experimentales aplicadas. Por este motivo, el alcance de la investigación se priorizo estrictamente en dos especies bacterianas clave y representativas de la patogénesis de la caries dental y la enfermedad periodontal.

III. MARCO TEORICO

3.1 ANTECEDENTES

En 2019, Galán Luna et al. (8) evaluaron el efecto antibacteriano de compuestos de hidroxiapatita (HAp) combinados con extracto de grana cochinilla que contiene ácido carmínico (Ac) sobre la cepa *Staphylococcus aureus*. El ensayo se realizó a través de la medición de halos de inhibición de las sustancias frente a un control positivo de tetraciclina. Los resultados demostraron que la Hidroxiapatita potencia la inhibición bacteriana. Por su parte, el extracto de cochinilla exhibió una moderada capacidad antibiótica en concentraciones del 40% y 50%. La combinación de ambos elementos genero un halo de inhibición mayor en comparación con las sustancias evaluadas de forma individual.

En 2019, Meza-Siccha et al. (1) analizaron la adhesión y viabilidad bacteriana de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) , *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) y *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) en pilares de implantes dentales de titanio y circonio. La evaluación se ejecutó mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). Los análisis demostraron que ambas superficies permiten la colonización bacteriana. *Streptococcus mutans* registro la mayor tasa de adherencia en los pilares de titanio (190,90 UFC/mL) y de zirconio (331,82 UFC/mL). Sin embargo, los pilares de titanio mostraron una menor adherencia bacteriana general, aunque presentaron mayor viabilidad celular en comparación con los pilares de zirconio. Estos hallazgos evidencian que el tipo de material del pilar y la especie bacteriana influyen directamente en los procesos de fijación microbiana.

En 2022, BinShabaib et al. (4) evaluaron la efectividad antibacteriana *in vitro* de los extractos acuosos de *Saussurea costus (S. costus) y Melaleuca alternifolia (M. alternifolia) frente a Porphyromonas gingivalis, Streptococcus mutans y Enterococcus faecalis*. La evaluación se realizó mediante el método de microdilución para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los resultados estadísticos demostraron que el extracto de S. costus posee una potencia significativamente mayor en comparación con *M. alternifolia*. Sin embargo, se observaron variaciones en los valores de CMI entre las diferentes cepas evaluadas. El extracto *de M. alternifolia* exhibió una efectividad superior frente a *P. gingivalis* en comparación con su acción sobre *E. faecalis y S. mutans.*

.

En 2022, Gabriel et al. (65) analizaron la actividad antibacteriana del extracto de ajo obtenido por ultrasonido contra *Escherichia coli, Staphylococcus aureus sub. aureus, Streptococcus mutans y Porphyromonas gingivalis.* El estudio empleó métodos de difusión en disco, difusión en pocillos y recuento en placa. Los análisis mediante espectroscopía e inmunomicroscopía revelaron la presencia de compuestos organosulfurados y fenólicos como principios activos principales. Todas las cepas bacterianas mostraron sensibilidad al extracto sonicado. *Streptococcus mutans* se identificó como el microorganismo más susceptible, mientras que *Escherichia coli* presentó la mayor resistencia. Estos hallazgos confirman el potencial de los derivados del ajo como agentes antimicrobianos naturales.

En el 2023, Gan N et al. (5) evaluaron los efectos antibacterianos del trans-cinamaldehído (TC) de un compuesto bioactivo derivado de la corteza de *Cinnamomum cassia*, sobre *Porphyromonas gingivalis.* Los ensayos determinaron valores específicos de concentración mínima inhibitoria y bactericida. Asimismo, los análisis morfológicos demostraron que este compuesto suprime la formación y el

metabolismo de las biopelículas bacterianas. El trans-cinamaldehído reguló negativamente los genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno y del almidón en el patógeno. Esta evidencia posiciona al compuesto como una alternativa natural efectiva para el manejo de infecciones periodontales crónicas.

En 2023, C. Park et al.(66) examinaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Moringa oleifera* (MOEE) contra los patógenos orales *Streptococcus mutans y Porphyromonas gingivalis*. El estudio determinó la concentración mínima inhibitoria y evaluó el impacto sobre la síntesis de óxido nítrico en modelos celulares. El extracto demostró una mayor potencia inhibitoria frente a *P. gingivalis* en comparación con la susceptibilidad registrada para *S. mutans.* Además, el compuesto inhibió el crecimiento bacteriano de forma dependiente de la dosis sin evidenciar efectos de citotoxicidad. Estos resultados sugieren la viabilidad del extracto como material funcional para la prevención de patologías orales.

En 2023, Park C. y Yoon H (3) analizaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Actinidia polygama (APEE)* contra las principales cepas responsables de la caries dental y enfermedad periodontal, *Streptococcus mutans y Porphyromonas gingivalis*. Las pruebas de difusión en disco permitieron establecer los valores de concentración mínima inhibitoria y bactericida. El extracto inhibió el crecimiento microbiano y redujo la formación de biopelículas de manera dependiente de la concentración. Los autores concluyeron que el compuesto posee una actividad antibacteriana selectiva frente *a S. mutans y P. gingivalis*, validando su uso potencial para la mejora de la salud bucal.

En 2023, Amalia et al. (67) evaluaron la actividad antimicrobiana de nanopartículas de quitosano cargadas con tetraciclina al 0,7% frente a *Porphyromonas gingivalis*

(ATCC 33 277). Los soportes coloidales se desarrollaron mediante el método de gelificación iónica y fueron inoculados en medios de agar estándar. Los ensayos evidenciaron una notable eficiencia farmacodinámica al consolidar zonas de inhibición biológica amplias de 32.8 mm. El estudio demostró que la matriz polimérica previene la degradación prematura del fármaco y modula la entrega del principio activo. Esto confirma las ventajas de la vectorización nanométrica para el tratamiento de infecciones periodontales.

En 2023, Pang Q. et al(68)**.** resumieron los avances recientes en el uso de vendajes basados en nanomateriales para controlar infecciones tanto de bacterias Gram positivas *(Staphylococcus aureus)* y Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli).* La investigación evaluó la integración de nanopartículas metálicas, poliméricas y lipídicas como sistemas pasivos de entrega de fármacos. Estas plataformas liberan agentes antimicrobianos de forma controlada en respuesta a estímulos del microambiente bacteriano endógeno o externo. La revisión concluyó que los transportadores basados en nanomateriales alteran drásticamente su tasa de entrega y efectividad biológica en función de las características estructurales de la pared celular del microambiente microbiano específico.

En 2024, Shirai T et al. (69) realizaron un estudio enfocado en el aislamiento de compuestos bioactivos contra bacterias periodontopáticas a partir de hojas de morera *(Morus alba).* El proceso requirió la separación física mediante un sistema de reparto aceite/agua y la posterior purificación por cromatografía de columna. Se evaluó la concentración mínima inhibitoria del extracto crudo y de las fracciones purificadas contra *Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum, Prevotella intermedia y Streptococcus mutans*. Las fracciones purificadas mostraron una potencia antimicrobiana significativamente mayor que el extracto crudo. Los hallazgos

advierten que las condiciones de separación modifican radicalmente la efectividad biológica final al alterar el estado físico de difusión de los principios activos.

3.2 BASES TEORICAS

3.2.1 Productos naturales como fuente de nuevos antimicrobianos naturales

Los productos naturales (PN) son compuestos químicos con diversas actividades biológicas. Estas entidades interfaciales provienen del resultado del metabolismo secundario de animales, plantas, bacterias y hongos(70).

3.2.1.1 Plantas y sus metabolitos secundarios

Las plantas representan la principal fuente de PN antibacterianos, sus sistemas de defensa les han permitido prevalecer a lo largo de la evolución biológica. Numerosos registros reconocen a los compuestos fenólicos (50.7%), alcaloides (5.7%), saponinas y terpenoides(26.6%) y aceites esenciales (17%) como los mecanismos de acción antibacteriana que interactúan con la estructura celular bacteriana (42,44,45,47,70). Estos compuestos confieren propiedades antiinflamatorias, antivirales, antimicrobianas, anticancerígenas. Asi mismo, se excretan con un mínimo de efectos de efecto secundarios(71). En el caso de los extractos vegetales, estas propiedades dependen de la elección del solvente (etanol, metanol y acetona) para maximizar su actividad antibacteriana (72). Estudios previos demuestran que el uso de etanol, metanol y acetona influye en el rendimiento de la extracción el contenido fenólico total, el contenido de flavonoides y la capacidad antioxidante (72). La dinámica de estos metabolitos se detalla a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1 Mecanismos de acción antibacteriana de los productos naturales de origen vegetal (42,44,45,47,70)

METABOLITO SECUNDARIO	Mecanismo de acción	Acción contra Bacterias	Actividad biológica
Polifenoles	Reducen la expresión de bombas de flujo e Inhiben el ADN girasa (taninos y antraquinonas)	Gram positivas	En ausencia de una membrana externa (hidrofóbica) los polifenoles atraviesan fácilmente el peptidoglucano (hidrofílicos)
Alcaloides	Inhibe el transporte de ATP dependiente a través de la membrana celular bacteriana y erradican la biopelícula	Gram positivas y Gram negativas	Altera la integridad membrana bacteriana
Saponinas	Favorecen la Lisis celular y potencian el sistema inmune	Gram positivas y Gram negativas	Poseen propiedades surfactantes que alteran los complejos de la membrana y pared celular
Terpenoides	Inhiben y erradican la biopelícula	Gram positivas	Actúan mediante la estructura de Isoprenos C5,

Nota: Datos adaptados de las referencias citadas (42,44,45,47,70)

3.2.1.2 Animales como fuente de antimicrobianos naturales

Los agentes antimicrobianos de origen animal consisten principalmente en péptidos, denominados “péptidos antimicrobianos” (AMP). Estos compuestos se localizan en el sistema inmunológico innato de mamíferos, anfibios, insectos, serpientes, entre otros. Los AMP son efectivos a bajas concentraciones y resultan útiles bacterias que han desarrollado resistencia a los antibióticos convencionales (72). Su efecto biocida permite neutralizar la carga de las membranas celulares, facilitando su paso a través de ellas para destruir la estructura bacteriana. Este mecanismo reduce la probabilidad de desarrollo de resistencia a los fármacos (73).

Los AMP poseen propiedades antimicrobianas de amplio espectro. Estos agentes se caracterizan por una alta sensibilidad (Eficaces incluso en concentraciones

reducidas), actividad inmunomoduladora (Capacidad para influir en la respuesta inmunitaria del huésped) y una función multifuncional dirigida a múltiples objetivos dentro de la célula. Su limitada capacidad para inducir resistencia se atribuye a varios mecanismos de acción coordinados. Estos incluyen el bloqueo de la Síntesis de ARN o proteínas, la degradación del ADN, la inhibición de la síntesis de peptidoglucano y la creación de Poros en la Membrana Celular (Permiten la permeabilidad a iones) (73). Las características generales de estos componentes se sintetizan en la Tabla 2.

Tabla 2 Características generales de los péptidos antimicrobianos (AMP) (72,73).

CARACTERISTICAS	DESCRIPCION
Tipo	Péptidos antimicrobianos (AMP)
Origen	Sistema inmunológico innato de mamíferos, anfibios, insectos y serpientes
Efectividad	Eficaces a bajas concentraciones contra bacterias resistentes.
Propiedades	Amplio espectro antimicrobiano, alta sensibilidad y actividad inmunomoduladora.
Efecto	Biocida: Neutralizan la carga de membranas celulares y destruyen bacterias
Mecanismo de acción	Bloqueo de la Síntesis de ARN, degradación del ADN, creación de poros e inhibición de peptidoglicano.

Nota: Datos compilados por la autora a partir de las propiedades descritas en las referencias (72,73).

3.2.1.3 Bacterias como fuente de antimicrobianos naturales

Los agentes microbianos de origen bacteriano consisten principalmente bacteriocinas y bacteriófagos (72). Estos compuestos convierten fuentes de carbono y nitrógeno en biomoléculas activas. Cuando son producidas por bacterias patógenas, funcionan como factores de virulencia. Por el contrario, cuando son

producidas por bacterias no patógenas, se convierten en biomateriales o nanopartículas (74). Estas entidades poseen genes capaces de alterar las biopelículas y algunas producen naturalmente nanopartículas metálicas como método de desintoxicación de metales pesados. Por ejemplo, la mutacina es una bacteriocina del *S. mutans* utilizada como AMP en la defensa contra otros microorganismos orales(12,75).

3.2.1.4 Hongos como fuente de antimicrobianos naturales

Los hongos son preferidos para para la síntesis de NP debido a la gran biomasa que poseen. Estos microorganismos secretan una gran cantidad de proteínas extracelulares que estabilizan las nanopartículas. Dicha propiedad otorga facilidad de manejo y la alta tolerancia a los metales pesados (76).

3.2.2 Acido 4-aminocarminico como nuevo antimicrobiano innovador

3.2.2.1 Dactylopius coccus o "Cochinilla americana"

Dactylopius coccus es una de las cuatro principales especies de insectos que habitan en los nopales del continente americano. Estos organismos producen colorantes rojos, al igual que *Kermes vermilio; Kerria lacca; y Porphyrophora hamelii* (que habitan en el roble, ramas de árboles Indues y raíces de Gramíneas respectivamente). Geográficamente, el Perú lidera la cría selectiva de estos insectos en el mercado mundial debido a las condiciones climáticas de temperatura y humedad de las zonas de cultivo en un 85%, seguidas por México e Islas Canarias

(7). La estructura química base de los colorantes derivados de este espécimen se presenta a continuación en la Figura 1.

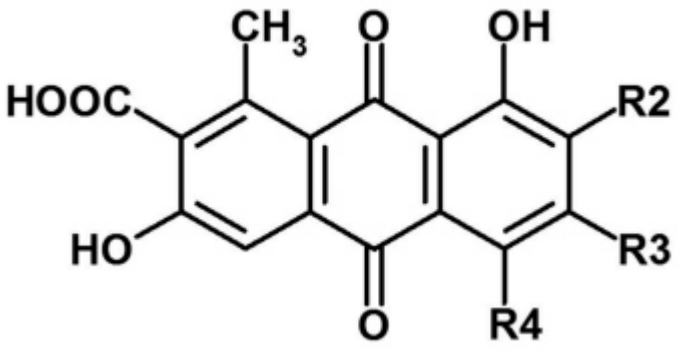


Figura 1. Estructura química de los colorantes rojos de la cochinilla (Fuente: C. J. Cooksey, 2018)

3.2.2.2 Componentes de la cochinilla

A través de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se evidenció que la cochinilla está compuesta principalmente por ácido carmínico (94–98%), ácido kermésico (0.1%) y ácido flavokermésico (0.4%)(77). A su vez, mediante resonancia magnética nuclear (NMR) y espectrometría de masas (MS) se identificaron cuatro variantes, nombradas “dc” según la posición de los radicales (77). Las sustituciones específicas de estos componentes se describen en la Tabla 3

Tabla 3 Sustituyentes en los colorantes rojos de cochinilla que muestran los grupos variables R2, R3 y R4 en la figura 5 (7).

COLORANTE	R2	R3	R4	INTERPRETACION
Ácido carmínico	C-α-D-glucopiranosil	OH	OH	Estructura básica con un anillo de antraquinona y un grupo glucósido
Ácido kermésico	H	OH	OH	Similar al ácido carmínico, pero sin el grupo glucósido
Ácido flavokermésico	H	OH	H	Variación del kermésico, con un grupo adicional en la posición R4.
dcII	C-α-D-glucopiranosil	OH	H	Contiene un grupo glucósido similar al ácido carmínico, pero con un hidrógeno en lugar de un grupo OH en R4.
dcIII (ácido 4-aminocarmínico)	C-α-D-glucopiranosil	OH	NH2	Variante del ácido carmínico con un grupo amino (NH2) en la posición R4
dcIV	C-α-D-glucopiranosil	OH	OH	Presenta un glucósido diferente en comparación con el ácido carmínico.
dcVII	C-β-D-glucofuranosil	OH	OH	Estructura similar al dcIV con un glucósido β.
dcOFK	H	O-glucopiranósido	H	Contiene un glucósido O en lugar de un grupo OH.

Nota: Datos compilados de la referencia (7).

3.2.2.3 Acido carmínico

El ácido carmínico (AC) es un compuesto antraquinónico extraído de las hembras secas del insecto *Dactylopius coccus*. Este compuesto se caracteriza por su alta solubilidad en agua, alcohol, éster, ácido y soluciones alcalinas, además de su estabilidad química en presencia de luz, calor y agentes oxidantes (78). Actualmente sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales y antivirales se mantienen bajo estudio biológico (8,58). Su estructura molecular especifica de detalla en la Figura 2.

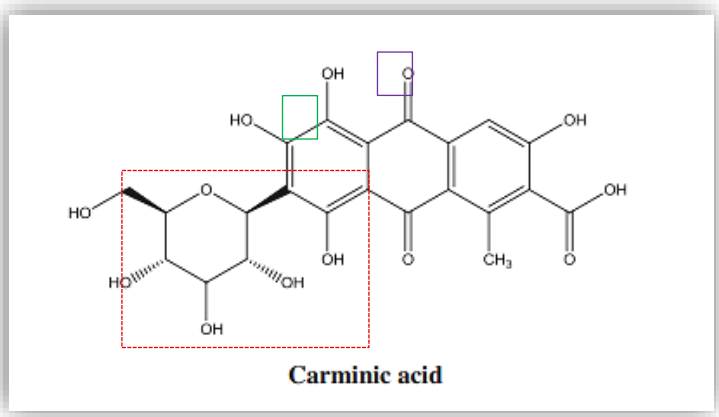
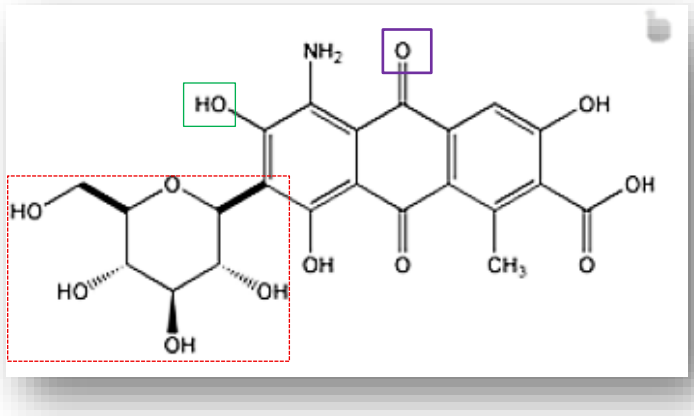


Figura 2 Estructura química del ácido carmínico. Los recuadros indican los radicales R2(rojo), R3 (verde), R4 (morado) mencionados en la Tabla 1.

3.2.2.4 Ácido 4-aminocarmínico

El ácido 4-aminocarmínico (4-AC) conocido también como “ácido estable” o “cochinilla amoniacal”, cambia de color de rojo a violeta al reaccionar químicamente con amoniaco (NH3). Este proceso irreversible genera una amida del ácido carmínico, en lugar de una sal de amonio (7). Esta modificación contrasta con el comportamiento del ácido del extracto crudo de cochinilla, el cual pierde su intensidad en condiciones de bajo PH. El compuesto modificado (4-AC) se identificó como el componente principal de la cochinilla amoniacal y muestra una fórmula química similar al carmín resistente al ácido (79). Debido a sus características estructurales, se considera más estable frente a la degradación que el ácido carmínico basal. Su configuración química se presenta en la Figura 3.



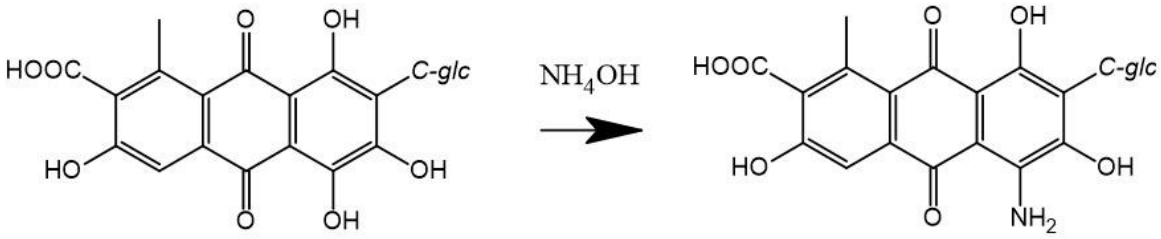


Figura 3. Estructura química del ácido 4-aminocarmínico. Los recuadros señalan los radicales R2(rojo), R3 (verde), R4 (morado) (Adaptado de Chieli A y colaboradores, 2016)

3.2.2.5 Aplicaciones de las antraquinonas.

Las antraquinonas (AQ) constituyen un grupo amplio de pigmentos naturales aislados de hongos, líquenes, plantas superiores. Estas moléculas poseen una alta actividad reductora en estados excitados debido a su capacidad para captar electrones y átomos de hidrogeno. Por este motivo, se emplean como catalizadores orgánicos en reacciones de fotoxidación para producir especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo (.OH) y oxígeno singlete ($^1O_2$) (58,80).

Las hidroxiantraquinonas despiertan el interés científico debido a su versatilidad en aplicaciones farmacológicas. Sus propiedades cromáticas y su actividad fotoantioxidante dependen de la posición y de la cantidad de grupos hidroxilo presentes en el núcleo central (81). Recientemente se ha evidenciado su actividad biológica como agente antitumoral, antimicrobiano. Asimismo, su comportamiento acido base, su fluorescencia y sus proceso de fotoenvejecimento molecular están han sido exploradas, resaltando su relevancia en diversos campos de estudio(80,82).

3.2.3 Nanoformulaciones para superar limitaciones de los productos Naturales

A pesar de que los productos naturales demuestran una actividad antimicrobiana, su aplicación clinica enfrenta limitaciones críticas. Estas desventajas incluyen procesos complejos de extracción, baja solubilidad en agua, escasa biodisponibilidad, inestabilidad química y propiedades farmacocinéticas desfavorables (83). Estos factores reducen su eficacia terapéutica y dificultan su uso directo en infecciones resistentes a antibióticos.

Las nanopartículas nacen como un enfoque emergente para enfrentar la resistencia bacteriana. Estas estructuras son lo suficientemente pequeñas para atravesar las membranas celulares e interferir con las vías moleculares esenciales(84). Actúan como vehículos de transporte para mejorar la farmacocinética, la estabilidad y la solubilidad de algunos fármacos. De este modo, permiten una administración dirigida y erradicación bacteriana eficaz debido a sus múltiples objetivos biológicos (71,72). Con el apoyo de la nanotecnología emergente se han desarrollado nanoformulaciones de liberación basadas en matrices metálicas, lipídicas y

poliméricas(85). En el caso de los polifenoles, estas estructuras mejoran la solubilidad en solución acuosa, reducen el riesgo de degradación por oxidación y proporcionan una liberación controlada y estable de la carga terapéutica del fármaco(83).

3.2.3.1 Portadores lipídicos nanoestructurados.

Son sistemas complejos que utilizan lípidos para formar estructuras a nanoescala (1 a 1000nanometros). Se usan en diversas aplicaciones médicas para la liberación de fármacos, la formulación de cosméticos y la mejora de la biodisponibilidad de nutrientes (85,86). De acuerdo con su evolución, se clasifican según su composición.

- **Liposomas**: Vesículas esféricas formadas por una o más bicapas lipídicas. Pueden encapsular fármacos tanto hidrofílicos como lipofílicos. Su estructura permite una liberación controlada y la modificación su superficie para mejorar la selectividad celular.
- **Niosoma**s: Estructuras similares a los liposomas, pero formadas por lípidos no iónicos. Ofrecen una mayor estabilidad y menores costos de producción.
- **Emulsiones lipídicas:** Sistemas que combinan lípidos en una fase acuosa inmiscibles, estabilizados por emulsificantes. Se utilizan para mejorar la absorción de compuestos bioactivos.
- **Nanopartículas lipídicas solidas (SNL):** Partículas formadas por lípidos sólidos a temperatura corporal. Se utilizan para encapsular fármacos lipofílicos, mejorando su solubilidad y estabilidad. Sin embargo, su estructura cristalina perfecta tiende a expulsar el fármaco durante el almacenamiento.

3.2.3.2 Portadores lipídicos nanoestructurados (NLC)

Los portadores lipídicos nanoestructurados representan la segunda generación de transportadores coloidales. Están compuestos por una mezcla de lípidos sólidos y líquidos (aceites), junto con surfactantes fisiológicamente compatibles que forman una matriz lipídica parcialmente cristalina(85). Se caracterizan por poseer una estructura cristalina desordenada debido a la combinación de lípidos con diferentes puntos de fusión. Al enfriarse, esta mezcla forma cristales imperfectos con espacios adicionales disponibles para encapsular una mayor cantidad de sustancias activas (87). En comparación con las nanopartículas lipídicas solidas tradicionales (SLN), las NLC evitan la expulsión prematura del fármaco durante el almacenamiento y ofrecen una excelente biocompatibilidad (86,88)

3.2.3.3 Métodos de preparación de las NLC

La diferencia principal entre los métodos de obtención reside en la composición del núcleo. En las SLN, el fármaco solubilizado o fundido en la mezcla desordenada de lípidos sólidos y líquidos, disperso en una fase acuosa con tensioactivos(88). La homogeneización a alta presión, la emulsificación-ultrasonido, la ultrasonicación de película representan los métodos más utilizados para la preparación de estos sistemas. Durante el almacenamiento, el núcleo de las SLN tiende a formar una estructura cristalina perfectamente ordenada. Este fenómeno se evita en la formulación de las NLC, asegurando una mayor estabilidad de carga (88).

3.2.3.4 Tipos de NLC

Las NLC se diseñaron para obtener una matriz con baja o nula cristalinidad. De este modo se superan limitaciones de expulsión de fármaco observadas en las SLN de primera generación. La presencia conjunta de lípidos líquidos y lípidos sólidos impide que la matriz forme una red cristalina perfecta. Esta estructura amorfa permite una mayor carga de principio activo y previene su liberación hacia la fase acuosa exterior. Dependiendo de la ubicación del principio activo incorporado, la literatura propone tres variaciones estructurales básicas expuestas por Muller et al en la Figura 4 (86,89).

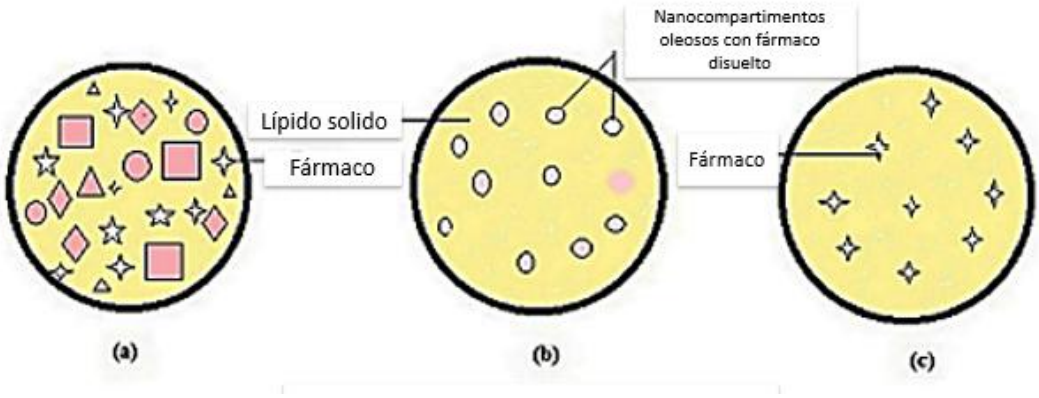


Figura 4. Tipos de portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) según el modelo de Muller *(86)*. Donde a, b, c corresponden a las NLC tipo I, II y III.

- **NLC tipo I "tipo cristal imperfecto":** El contenido de lípidos líquidos es bajo. Esto genera imperfecciones y huecos en la matriz del lípido solido donde se acomodan las moléculas del principio activo. Se utilizan mezclas de ácidos grasos para modificar la estructura cristalina y aumentar la incorporación de compuestos lipofílicos. Un aumento en la concentración de lípidos espacialmente diferentes resulta en una alta incorporación de fármacos.

- **NLC tipo II o "tipo múltiple":** Es un modelo de tipo aceite/lípido/agua. El principio activo es altamente soluble en el lípido líquido. Al superar el límite de solubilidad durante el enfriamiento, se forman pequeños nanocompartimentos de aceite rodeados por la matriz sólida. Este diseño minimiza la fuga del principio activo y optimiza la estabilidad en terapias locales contra *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*

- **NLC tipo III o "modelo amorfo":** Se elabora mediante la mezcla controlada de lípidos sólidos y líquidos para evitar la cristalización del núcleo durante el enfriamiento. La matriz lipídica resultante se mantiene en un estado amorfo homogéneo. Esta estructura amorfa permite una mejor retención de los fármacos que permite una alta retención del principio activo y mejora la biodisponibilidad de compuestos lipofílicos.

3.2.3.5 Características funcionales de las NLC

Las NLC ofrecen múltiples beneficios para proyectos de administración de fármacos y aplicaciones biomédicas gracias a sus propiedades interfaciales (90). Sus ventajas principales se enumeran a continuación:

- **Alta capacidad de carga de fármacos**: Su matriz parcialmente cristalina permite una mayor capacidad de encapsulación de moléculas lipofílicas.
- **Liberación controlada**: Proporcionan una liberación modulada y prolongada del principio activo, lo que mejora la eficacia terapéutica y reduce la frecuencia de dosificación.
- **Estabilidad mejorada:** Son más estables que otros sistemas de nanopartículas, protegiendo los ingredientes activos de la degradación hidrolítica.

- **Biocompatibilidad y no toxicidad**: Los excipientes utilizados son biodegradables, biocompatibles y reconocidos como seguros (GRAS).
- **Capacidad de cruzar barreras fisiológicas**: Debido a su liofilia y tamaño nanométrico pueden atravesar barreras biológicas complejas.
- **Aplicaciones versátiles:** Son adecuados para diversas rutas de administración, incluyendo tópica oral.
- **Escalabilidad y facilidad de producción**: Son fáciles de fabricar a nivel industrial mediante homogeneización a alta presión.
- **Eficiencia en la entrega dirigida**: Reducen los efectos secundarios sistémicos al concentrar la acción en el tejido Diana.
- **Protección del fármaco**: Protegen el principio activo frente cambios de pH, humedad y las enzimas del medio salival.
- **Aplicaciones en cosmética y farmacéutica**: Poseen un alto potencial para formulaciones terapéuticas tópicas.

En resumen, las NLC constituyen una tecnología prometedora para optimizar la administración de fármacos locales, aumentar la eficacia terapéutica y reducir los efectos secundarios(90).

3.2.4 Microorganismos objeto de estudio.

3.2.4.1 Streptococcus mutans

Streptococcus mutans es una bacteria Gram positiva anaerobia facultativa que presenta una forma esférica o de coco (75). Es considerado uno de los principales patógenos involucrados en la caries dental por tres atributos esenciales. En primer lugar, posee la capacidad de producir enzimas glucosiltransferasas, destacando la

glucosiltransferasa B (GtfB) responsable de sintetizar glucanos insolubles a partir de la sacarosa de la dieta para consolidar una matriz altamente adhesiva (91). Esta actividad facilita su adherencia y protección al generar una biopelícula estable en la superficie dental(45). En segundo lugar, se caracteriza por ser acidogénico, lo que le permite transportar y metabolizar una amplia gama de carbohidratos en ácidos orgánicos. Por último, es un agente acidúrico capaz de tolerar condiciones de estrés ambiental y bajos niveles de pH (75).

La mayoría de las cepas de *S. mutans* son susceptibles a la exposición de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y sus subproductos, pero expresan factores de virulencia como bacteriocinas y proteínas de unión para sobrevivir en medios adversos. Una de las bacteriocinas más estudiadas de esta especie en la mutacina, un péptido de 22 aminoácidos que inhibe la síntesis de peptidoglucano en otras especies bacterianas (12,75). En la actualidad, la remoción mecánica y el uso de antisépticos tópicos representan las estrategias Gold estándar para combatir este patógeno. Sin embargo, la investigación científica evalúa activamente el uso de péptidos antimicrobianos (AMP) y compuestos naturales para inhibir la formación de su biopelícula dental sin alterar el equilibrio del microbioma oral (92).

Adicionalmente, la matriz de exopolisacaridos (EPS) sintetizada por la GtfB no solo sostienen la arquitectura tridimensional del biofilm, sino que actúa como una barrera física de difusión (93). Esta red de glucanos insolubles restringe el transporte de agentes antimicrobianos en sus formas libres hacia las capas profundas de la placa madura, justificando el desarrollo de sistemas de transporte coloidal y nanoestructurado diseñados para optimizar la liberación del principio activo en la interfaz bacteriana.

3.2.4.2 Porphyromonas gingivalis

Porphyromonas gingivalis es una bacteria anaerobia estricta Gram negativa reconocida como un agente patógeno clave en el desarrollo de la periodontitis. Esta enfermedad inflamatoria crónica destruye los tejidos periodontales que rodean y soportan a las piezas dentarias. La *P. gingivalis* forma parte del denominado "complejo rojo" bacteriano junto con *Treponema denticola y Tannerella forsythia*. Su presencia altera el equilibrio del microbioma oral promoviendo la disbiosis y destrucción tisular periodontal (24,30,94).

La patogenicidad *de P. gingivalis* mediada por la respuesta inmunológica del huésped se activa a través de la inducción de mediadores proinflamatorios como TNF-α, IL-8 e IL-1β(95,96). En la cavidad bucal, los factores de virulencia principales comprenden un grupo de proteasas denominadas "gingipaínas", las cuales comprenden los tipos específicos para arginina (RgpA y RgpB) y para lisina (Kgp) (97). Dichas proteasas, en sinergia con la cápsula bacteriana, fimbrias y vesículas de membrana externa, facilitan la invasión celular y la evasión de mecanismos de defensa del huésped, consolidando su agresividad biológica en el tejido periodontal(98).

Adicionalmente, las gingipaínas constituyen el principal motor proteolítico de la *P. gingivalis* responsables del 85% de su actividad proteolítica(97). Al ser responsables de captar nutrientes, estructurar el biofilm y degradar la matriz tisular, estas proteasas se convierten en una diana biológica prioritaria (99). Por ello, el desarrollo de terapias basadas en principios activos bioactivos o sistemas de transporte nanoestructurados cobra un valor especial: no solo buscan frenar el crecimiento bacteriano, sino atenuar la capacidad destructiva del patógeno en el entorno periodontal (98).

3.3 Definición de términos

Refractariedad en microbiología: Condición de resistencia biológica absoluta, inmunidad o falta de respuesta que manifiesta un microorganismo frente a la acción de un agente antimicrobiano.

Refractariedad selectiva: Inactividad de las nanoestructuras cargadas con 4-AC frente a *S. mutans* debido al atrapamiento hidrofóbico a pH 7.0

Siembra interfacial: Condición que caracteriza la interacción entre la fase fluida del inoculo y la matriz sólida del agar en las técnicas de pocillo y goteo.

Ácido carmínico: Sustancia orgánica natural clasificada como antraquinona, obtenida mediante el aislamiento y purificación del extracto de *Dactylopius coccus*, empleada como principio activo puro por su acción antimicrobiana frente a patógenos orales.

Ácido 4-aminocarmínico: Variante química modificada derivada del ácido carmínico mediante la incorporación de un grupo funcional amino en la posición C4 de su anillo estructural, caracterizada por una mayor estabilidad y un perfil predominantemente bacteriostático.

Portadores lipídicos nanoestructurados (NLC): Sistemas coloidales de entrega compuestos por una matriz lipídica desordenada de lípidos sólidos y líquidos estabilizados por tensioactivos, diseñados para encapsular principios activos y modular su liberación.

Ultracizallamiento: Técnica de homogeneización mecánica de alta energía que aplica fuerzas de alto corte a revoluciones extremas (20,000 rpm) en caliente para reducir el tamaño globular de una emulsión y prevenir la aglomeración.

Sonicación de punta: Procedimiento de dispersión física que utiliza ondas de ultrasonido focalizadas a través de una sonda de titanio sumergida, empleado para consolidar la reducción nanométrica homogénea de una mezcla coloidal.

Potencial Zeta (ζ): Magnitud electroquímica medida en milivoltios (mV) que indica la carga eléctrica neta en la superficie interfacial de las nanopartículas, utilizada como el indicador principal para evaluar la estabilidad de las dispersiones coloidales.

Índice de polidispersidad (PDI): Parámetro matemático adimensional que mide el grado de homogeneidad en la distribución del tamaño de las partículas dentro de un sistema coloidal, donde valores bajos indican una dispersión uniforme.

Neutralización de pH: Proceso químico que consiste en ajustar el grado de acidez o alcalinidad de una solución mediante un agente neutralizante para desplazar un pH nativo hacia un valor neutro o fisiológico.

pH crítico del esmalte: Umbral químico salival (fijado en 5.5) por debajo del cual el medio se vuelve insaturado respecto a los cristales de hidroxiapatita, desencadenando la disolución mineral y desmineralización del tejido dentario.

Selectividad interfacial: Fenómeno físico-biológico donde un transportador nanométrico interactúa de forma diferenciada ante las superficies celulares debido a la afinidad química y las cargas electrostáticas del microambiente microbiano específico.

Relación Estructura-Actividad (SAR): Criterio farmacológico que analiza cómo la modificación en la arquitectura geométrica o en los grupos funcionales de una molécula altera de forma directa su comportamiento, afinidad y potencia biológica.

Atrapamiento hidrofóbico: Fenómeno termodinámico donde un principio activo lipofílico queda retenido en el núcleo graso interno de una nanopartícula por interacciones hidrofóbicas, limitando su difusión hacia una fase acuosa externa.

3.4 Hipótesis

3.4.1 Hipótesis del trabajo:

El ácido carmínico (AC) y ácido 4-amino carmínico (4-AC) cargados en portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) presentan acción antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*

3.5 Operacionalización de variables

3.5.1 Variables:

Las variables consideradas en el diseño experimental se estructuraron bajo los siguientes criterios analíticos específicos:

Variable independiente: Tratamiento antimicrobiano evaluado. Este incluyó el ácido 4 – aminocarmínico y el ácido carmínico puro en estado libre y cargados en portadores lipídicos nanoestructurados (NCL).

Variable dependiente: Actividad antimicrobiana *in vitro* sobre las cepas bacterianas *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*

Variables de control:

- Control negativo: Portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) vacíos sin carga activa.
- Control positivo: Solución de digluconato de clorhexidina al *0,12 %*

Condiciones de ensayo *in vitro*

- Condiciones ambientales: Temperatura de incubación (35-37°C)
- Atmósfera: anaerobiosis para *P. gingivalis* y microaerófilia para *S. mutans*.

- Estandarización del pH del tratamiento antimicrobiano a un valor neutro de 7.0

Tabla 4. Matriz de operacionalización de variables del diseño experimental

Tipo de variable	Variable	Definición	Dimensión	Indicador	Escala	Valor
Independiente	Tratamiento antimicrobiano basado en antraquinonas (AC y A-4AC) puras libres y nanoestructuradas	Formulación química estandarizada orientada a evaluar el potencial lítico del núcleo antraquinónico modificado frente a patógenos orales.	Tratamiento molecular	Tipo de principio activo o sistema coloidal inoculado en las placas de agar	Nominal	T1: Ácido 4-aminocarmínico puro al *20 %* T2: NLC-4-AC al 0,2%) T3: Ácido carmínico puro al *20 %* T4: NLC-AC al 0,2%) C (-): (NLC vacía) C (+): (clorhexidina al 0,12%)
Dependiente	Actividad antimicrobiana *in vitro*	Capacidad inhibitoria del tratamiento libre y nano encapsulado para inhibir el desarrollo antimicrobiano en condiciones estandarizadas de laboratorio.	Zona de inhibición Bacteriana (Halo neto)	Diámetro del halo neto de la zona de inhibición medido en Milímetros (mm)	Cuantitativa continua	Estandarización de la sensibilidad neta, basados en la escala de Duraffourd Nula: 0.00 mm Sensibilidad intermedia: 0.01 -14.99 mm Muy sensible: 15 a 19.99mm Sumamente sensible ≥ 20mm

V: DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo y diseño de investigación:

Esta investigación fue de tipo aplicada y experimental, con un diseño *in vitro*, transversal y prospectivo. Se evaluó la actividad antimicrobiana de los compuestos puros y nanoestructurados frente a cepas bacterianas especificas en condiciones controladas de laboratorio.

4.2 Población y muestra:

4.2.1 Población:

Se utilizaron cepas certificadas estándar de *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ y *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277 ™. El proceso de reactivación se realizó a partir de los viales criopreservados. Los microorganismos fueron sembrándolos en medios de enriquecimiento específicos: Agar mitis salivarius para *S. mutans* y Agar Schaedler suplementado con sangre al 5% para *P. gingivalis.*

4.2.2 Muestra:

La selección de la muestra se determinará mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia. Se requirieron 10 placas Petri con los medios de cultivo respectivo por bacteria como numero de repeticiones para el ensayo microbiológico.

4.2.3 El tamaño de la muestra:

Se incluyeron 10 placas de Petri con Agar Schaedler suplementado con sangre al 5% para la cepa de *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277 ™ y 10 placas Petri con Agar Mueller Hinton para *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™. Cada uno contiene los siguientes grupos de estudio:

- Ácido Carmínico puro (AC) al *20 %*.
- Ácido 4-aminocarmínico puro (4-AAC) al *20 %*.
- NLC cargadas con AC (*0,2 %*).
- NLC cargadas con 4-AAC (*0,2 %*).
- NLC vacías (Control negativo).
- Clorhexidina al *0,12 %* (Control positivo).

4.3 CRITERIOS

4.3.1 Criterios de inclusión:

Compuesto químico previamente identificado y no contaminado.

Placas Petri correctamente inoculadas con las cepas de referencia ATCC de *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277 ™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ sin contaminantes.

4.4 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS O MÉTODO

4.4.1 FASE QUÍMICA: PREPARACIÓN DE NANOMATERIALES

A) Obtención De Los Principios Activos.

Se utilizaron compuestos en estado puro (producto final) obtenidos mediante un proceso de aislamiento, modificación y purificación previamente estandarizados por el proveedor. Se obtuvo una muestra de Acido carmínico y acido 4-aminocarminico con un 99% de pureza.

- **Obtención del ácido carmínico**: Tras seguir el protocolo de purificación (ANEXO N°2), se obtuvo una muestra de AC con un 99% de pureza. Posteriormente, se preparó una solución de AC puro a una concentración de 200 mg/mL disuelto en agua destilada al 15 % (p/v). La solución de AC en su estado nativo de carácter acido (pH 2.5-3) se neutralizo mediante la adición de hidróxido de sodio (NaOH 2N) hasta lograr un pH neutro de 7.0. para simular las condiciones de la cavidad oral.

- **Obtención del ácido 4-amino carmínico (4-AC):** El derivado se sintetizó disolviendo AC en 167 ml de amoniaco al 25% y 300 ml de agua destilada en un reactor vidriado herméticamente sellado. El sistema se sometió a calentamiento térmico a una temperatura controlada entre 70 °C y 80°C durante un periodo continuo de 8 horas. El producto de la reacción fue atomizado para su recolección en el estado sólido (10). La caracterización estructural y pureza del compuesto final fue confirmada mediante por Resonancia Magnética Nuclear (RMN-1H), espectroscopía infrarroja por transformación de Fourier (FT-IR), espectroscopia ultravioleta-visible (UV-vis)

y cromatografía de líquidos acoplada a espectrofotometría de masas (LC-MS) (10,11). Posteriormente, se preparó una solución de 4-AC puro a una concentración de 200 ug/ml disuelto en agua destilada al 15% (p/v). a diferencia del AC esta solución no requirió neutralización porque ya se encontraba en pH idóneo neutro.

B) Síntesis de los portadores lipídicos nanoestructurados (NLC).

La preparación de los sistemas nanoestructurados vacíos y dopados se ejecutó mediante la técnica de homogeneización en caliente asistida por sonicación de punta, estructurándose en las siguientes fases:

- **Fase lipídica (solución 1°):** Se preparó una matriz fundida compuesta por cera de abeja (lípido solido) y aceite de sacha inchi (lípido liquido), la cual fue calentada y homogeneizada en un baño termostático a 70°C para asegurar la completa licuefacción de los componentes grasos.
- **Fase acuosa (solución 2°):** En paralelo, se preparó una solución estabilizante compuesta por lecitina de soya como agente tensioactivo en agua destilada estéril, precalentándose bajo agitación constante a 70°C.

- **Emulsión primaria y ultracizallamiento:** Una vez alcanzada la temperatura critica, la fase acuosa (solución 2°) fue vertida gradualmente sobre la fase lipídica (solución 1°). Inmediatamente después de esta unión, se adiciono 1ml de la solución del principio activo purificado y neutralizado (AC o 4-AC para los sistemas NLC), estableciendo una carga inicial del 6% dentro de la matriz lipídica. El sistema combinado se sometió de forma inmediata a un proceso de homogeneización de alto corte en un equipo de ultracizallamiento a 20,000 rpm. Este tratamiento se aplicó en 3 intervalos continuos de 3 minutos cada uno para reducir el tamaño de la partícula, mitigar los fenómenos de

aglomeración molecular, prevenir el sobrecalentamiento y la degradación térmica de los componentes

- **Sonicación focalizada**: Al finalizar el proceso de cizallamiento, la nanoemulsión resultante fue trasladada en estado caliente a un sonicador de punta. El sistema se sometió a un tratamiento de sonicación focalizada de alta intensidad durante un periodo continuo de 5 minutos para consolidar la reducción homogénea del tamaño de la partícula.

- **Enfriamiento y caracterización fisicoquímica:** La nanoemulsión obtenida se dejó enfriar a temperatura ambiente previa evaluación de sus propiedades coloidales mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS). El sistema coloidal final demostró una alta estabilidad electrostática, registrando un Potencial Zeta (Z) de -60 mV, un tamaño de partícula promedio de 250 nm y un índice de polidispersidad (PDI) de 0.3 (100)

- **Optimización de carga (pruebas piloto):** Se realizaron ensayos preliminares para determinar la capacidad de carga máxima del principio activo en la matriz lipídica. Tras observar fenómenos de inestabilidad y agregación molecular en concentraciones experimentales al 10%, se estableció una carga fija del 6% durante la preparación en caliente. Este procedimiento resultó en una concentración final estable del *0,2 %* del principio activo encapsulado de forma eficiente en el sistema nanoestructurado.

- **Ajuste de pH y Potencial Remineralizante:** Con el fin de mimetizar las condiciones salivales y preservar la homeostasis mineral de la cavidad bucal,

se ajustó el pH de las formulaciones finales a un valor neutro de 7.0. Este parámetro clínico aseguró la compatibilidad biológica del nanocompuesto, previno la desmineralización del esmalte (al situarse por encima del PH critico de 5.5) y eliminó la acidez como variable de confusión durante las pruebas microbiológicas.

- **Filtración critica**: Todas las formulaciones NLC fueron sometidas a un proceso de filtración purificante a través de membranas de 0.45 µm. Este procedimiento permitió eliminar macro precipitados y agregados lipídicos residuales, obteniéndose una dispersión coloidal homogénea estable y óptima para ensayos de difusión microbiológica.

4.4.2 FASE MICROBIOLÓGICA:

A) Obtención del material biológico:

Se utilizaron dos cepas bacterianas estándares de la American Type Culture Collection (ATCC), adquiridas mediante el laboratorio GENLAB S.A.C: *Streptococcus mutans* ATCC® 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277

El procedimiento de rehidratación de los pellets liofilizados (Kwik – Stick™) y su posterior siembra de reactivación se ejecutó en el laboratorio de Ecología Microbiana de la facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM. Este proceso se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante descritas (101). Las condiciones aplicadas para el crecimiento y mantenimiento de las cepas se detallan a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones operacionales para el crecimiento y mantenimiento de las cepas estándares.

Condición de crecimiento	***Streptococcus mutans ATCC® 25175***	***Porphyromonas gingivalis ATCC® 33277***
Medio de inoculación	Agar TSA/ mitis salivarius	Agar Schaleder suplementado con 10% de sangre ovina.
Temperatura	35 - 37°C	35 - 37°C
Tiempo de incubación	24-48 horas	5-7 días
Atmosfera	Anaerobiosis facultativa (capnofilia, 5% CO2)	Anaerobiosis (Sistemas Anaerocult/ anaerogen)

Para ambas bacterias, la estandarización del inoculo se realizó tomando colonias de crecimiento fresco y suspendiéndolas en caldo nutritivo hasta ajustar la densidad óptica al 0.5 de la escala de McFarland, garantizando una concentración uniforme de 1.5×10^8 UFC/mL. Así mismo para ambos patógenos se utilizaron los mismos 6 grupos de estudio uniformizados:

- G1 (control positivo): clorhexidina al 0,12%
- G2 (control negativo): NLC vacío
- G3 (principio activo puro): Acido Carmínico en solución estándar al *20 %*
- G4 (principio activo puro): Acido 4-aminocarminico en solución estándar al *20 %*
- G5 (sistema nanoestructurado): Acido carmínico cargado en portador lipídico (NLC-AC) al 0,2%.
- G6 (sistema nanoestructurado): Acido 4-aminocarminico cargado en portador lipídico (NLC-4-AC) al 0,2%.

B) Estandarización de las técnicas de difusión antimicrobiana por bacteria.

Debido a que los transportadores nanoestructurados (NLC) presentan una alta viscosidad intrínseca y un carácter hidrofóbico que limita su migración libre en medios sólidos, se estandarizó la ejecución de dos metodologías de siembra de forma diferenciada para cada patógeno.

Ensayos específicos para *Streptococcus mutans* (Cepa Grampositiva)

- **Método de Difusión de Disco (Fase Piloto de Permeabilidad):** Se emplearon discos de celulosa sin impregnar (Blank Discs) de 6mm de diámetro impregnados previamente con 30 µl de las soluciones correspondientes a los grupos de estudio. Esta técnica se ejecutó de forma preliminar para evaluar la cinética de liberación; sin embargo, los ensayos demostraron que la naturaleza lipídica, la viscosidad y la polaridad hidrofóbica de las NLC generaban un fenómeno de retención capilar en la celulosa del disco, impidiendo la difusión radial del activo en el agar sólido. Este hallazgo actuó como un criterio de exclusión metodológica, permitiendo descartar formalmente esta técnica para el siguiente patógeno (*P. gingivalis*) y optimizar el diseño experimental migrando directamente hacia los métodos de pocillo y goteo superficial.

- **Método de Difusión en Pocillos (Deep Well):** Se prepararon placas con agar Mueller-Hinton, las cuales fueron inoculadas en tres direcciones utilizando un hisopo estéril cargado con 50 µl del inoculo ajustado al 0.5 McFarland. Mediante un sacabocados calibrado, se realizaron pozos de 6mm de diámetro en el agar, depositando un volumen de 100 µl de las muestras

correspondientes a cada grupo. Las placas se incubaron a 35 – 37 °C en condiciones de anaerobiosis parcial, realizándose las lecturas de los halos de inhibición a las 24 horas y corroborando a las 48 horas.

- **Método de Difusión por Goteo Superficial (Drop Plate):** Se prepararon placas inoculadas bajo las mismas condiciones, se dispensaron microgotas superficiales de 10 µl de las suspensiones lipídicas de los Grupos de estudio. Este método elimino la barrera de difusión profunda del agar, permitiendo el contacto interfacial directo del nanomaterial con la superficie bacteriana para evaluar la aparición de zonas de inhibición. Las placas se incubaron a 35 – 37 °C en condiciones de anaerobiosis parcial, realizándose las lecturas de los halos de inhibición a las 24 horas y corroborando a las 48 horas.

Ensayos específicos para *Porphyromonas gingivalis* (Cepa Gramnegativa)

- **Método de Difusión en Pocillos (Deep Well):** Se prepararon placas con Agar Schaedler suplementado con sangre al 5%. Tras la inoculación masiva con hisopo estéril cargado con 50 µl del inoculo ajustado al 0.5 McFarland se realizaron pozos de 6mm de diámetro en el agar y se depositaron 50µl de cada solución de los grupos de estudio. Debido al crecimiento lento y requerimientos exigentes de este patógeno periodontal, las placas fueron selladas inmediatamente en jarras de anaerobiosis estricta (Sistema Anaerogen) e incubadas a 35 – 37 °C, realizándose las lecturas de los halos de inhibición a las 48 horas.

- **Método de Difusión por Goteo Superficial (Drop Plate**): Siguiendo la premisa del impedimento físico por la matriz grasa de las NLC, se aplicaron

microgotas superficiales de 10 µl de las suspensiones lipídicas de los Grupos de estudio directamente sobre la superficie inoculada del agar Schaedler. Este método anulo la resistencia por viscosidad del vehículo, facilitando la interacción directa con el patógeno anaerobio y permitiendo la observación macroscópica de micro halos y una marcada reducción del tamaño de las colonias bacterianas. Las placas fueron selladas inmediatamente en jarras de anaerobiosis estricta (Sistema Anaerogen) e incubadas a 35 – 37 °C, realizándose las lecturas de los halos de inhibición a las 48 horas.

4.5 RECOLECCIÓN DE DATOS

La recolección de datos cuantitativos se realizó midiendo milimétricamente el diámetro total de las zonas de inhibición nítidas medidas a las 24 horas para *S. mutans* y 48 horas para *P. gingivalis*. Se utilizó un calibrador vernier digital de alta precisión, registrando los valores en una hoja previamente preparada para este propósito (ANEXO1).

4.6 ANALISIS ESTADÍSTICO:

Las lecturas correspondientes a los halos de inhibición neta se registraron en milímetros (mm). Con el propósito de estructurar una base de datos homogénea y prevenir distorsiones en las varianzas del Análisis de Varianza (ANOVA), la ausencia de halo se codificó numéricamente como 0.00 mm, unificando la condición de actividad nula.

La comprobación de los supuestos estadísticos paramétricos se llevó a cabo en los grupos que evidenciaron una respuesta biológica activa. La distribución de normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk (n = 10), determinando un ajuste Gaussiano en la dispersión de datos ($p > 0.05$) (Anexo 3). Ante una leve fluctuación observada en el sistema coloidal G5 frente a *Porphyromonas gingivalis*, se realizó de forma complementaria un análisis de residuos mediante diagramas de probabilidad normal (Q-Q Plot), confirmando la alineación de los datos sobre la teórica de referencia. Por su parte, las asimetrías detectadas en la prueba de Levene ($p < 0.001$) fueron catalogadas como un efecto matemático previsto derivado de la varianza nula de los grupos refractarios.

Una vez validados los criterios fundamentales, se aplicó la prueba estadística de ANOVA de un factor para la contrastación global de hipótesis, seguida por la prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$) para identificar las diferencias significativas específicas entre los seis grupos de estudio. El procesamiento estadístico se realizó con el software IBM SPSS Statistics versión 26, fijando un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$). Los resultados se reportaron en tablas analíticas y gráficos de barras agrupadas detallando la media y la desviación estándar (Media ± D.E.).

4.7 CONSIDERACIONES ETICAS Y DE BIOSEGURIDAD

Este estudio no requirió el uso de muestras humanas ni animales por tratarse de un diseño experimental *In vitro*. Todo el análisis se baso en el manejo responsable y transparente de los datos de laboratorio.

En el trabajo con cepas microbianas, especialmente *Porphyromonas gingivalis*, se realizó en un ambiente de Bioseguridad Nivel 2 (BSL-2). Para proteger al operador y evitar contaminaciones, los procedimientos se ejecutaron en cabina de bioseguridad y las incubaciones se hicieron en jarras de anaerobiosis cerradas y selladas. Al

terminar cada ensayo, el material biológico y los medios contaminados se esterilizaron en autoclave (121°C por 20 minutos) antes de su descarte.

V. RESULTADOS

La evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los principios activos puros (ácido carmínico y ácido 4-aminocarmínico) y de sus respectivos sistemas nanoestructurados (NLC-AC y NLC-4AC) se organizó en función de las dos cepas bacterianas descritas en los objetivos (*Porphyromonas gingivalis ATCC® 33277 y Streptococcus mutans* ATCC® 25175) y las dos metodologías de difusión empleadas (pocillo y goteo superficial).

Previo al análisis descriptivo e inferencial, se verificaron los supuestos estadísticos paramétricos. Las pruebas de Shapiro-Wilk y el análisis de residuos mediante diagramas Q-Q Plot confirmaron la distribución normal de los datos ($p > 0.05$) en los grupos biológicamente activos. La prueba de Levene indicó heterogeneidad de varianzas ($p < 0.001$). Este comportamiento fue considerado como un artefacto matemático de los grupos refractarios con varianza cero, condición prevista que no alteró la robustez del modelo.

Tras cumplirse los criterios de normalidad y homocedasticidad requeridos, se ejecutó el Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor y la prueba de comparaciones múltiples post hoc de Tukey para determinar las diferencias significativas intergrupales (ver análisis extendido en Anexo 3.

A continuación, se presentan los resultados segmentados por microorganismo y técnica de siembra:

5.1 Ensayos microbiológicos frente a *Streptococcus mutans*

Tabla 6. Actividad antimicrobiana por el método de Difusión Profunda (Pocillo) frente a *Streptococcus mutans*

Grupos de estudio	Tratamiento experimental / Control	Halo de inhibición neto (mm; Media ± D.E.)	Valor p (ANOVA)
G1	Control positivo (Clorhexidina *0,12 %*)	34.45 ± 1.19 a	
G2	Control negativo (NLC Blanco)	0.00 ± 0.00 c	
G3	AC puro *20 %*	25.15 ± 0.22 b	< 0.001
G4	4-AC puro *20 %*	0.00 ± 0.00 c	
G5	NLC-AC *0,2 %*	0.00 ± 0.00 c	
G6	NLC-4-AC *0,2 %*	0.00 ± 0.00 c	

Nota: D.E.: Desviación Estándar; AC: Ácido carmínico; 4-AC: Ácido 4-aminocarmínico; NLC: Portadores lipídicos nanoestructurados. Un diámetro de 0.00 mm indica ausencia de halo de inhibición neta (actividad nula). Superíndices alfabéticos distintos (a, b, c) dentro de una misma columna indican diferencias estadísticas significativas mediante la prueba *post-hoc* de Tukey ($p < 0.05$). La letra (**a y b**) identifica a los grupos que conservan actividad antimicrobiana real frente al control negativo, mientras que la letra (**c**) identifica de forma exclusiva a los grupos con actividad nula y estadísticamente idénticos al control negativo (G2).

Al evaluar el comportamiento microbiológico frente a la cepa de *S. mutans* mediante difusión profunda en pocillo, la prueba de ANOVA de un factor demostró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($p < 0.001$). El control positivo de clorhexidina al *0,12 %* (G1) obtuvo la mayor media en el diámetro del halo de

inhibición con 34.45 ± 1.19 mm (a). Este valor superó estadísticamente al principio activo basal AC puro al *20 %* (G3), el cual registró un halo promedio de 25.15 ± 0.22 mm (b). Por su parte, el compuesto modificado libre 4-AC (G4) y los sistemas nanoestructurados (G5 y G6), al igual que el control negativo (G2), no registraron halos de inhibición (0.00 ± 0.00 mm). Estos cuatro grupos conformaron un subconjunto estadísticamente homogéneo (c) según la prueba de Tukey (Tabla 6).

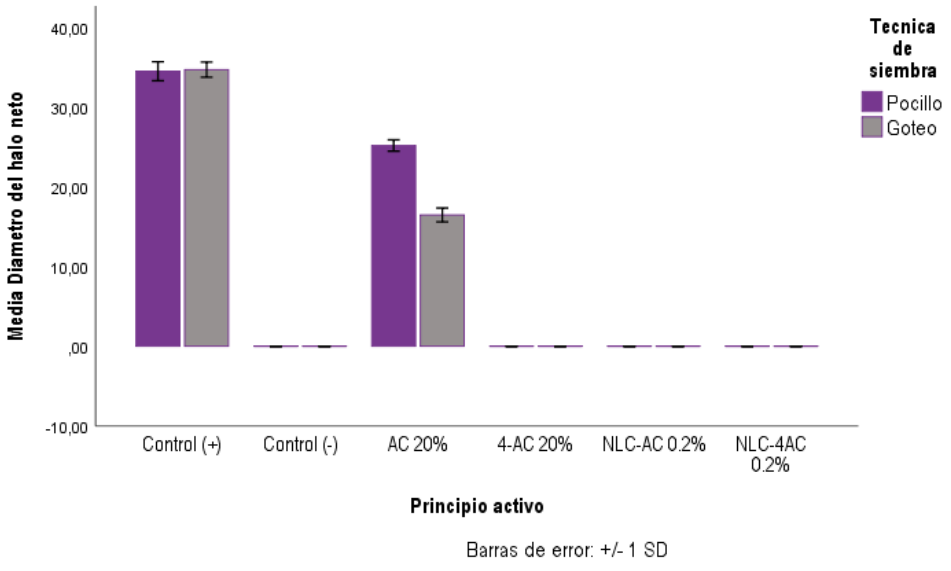
Tabla 7. Actividad antimicrobiana por el método de Goteo Superficial frente a *Streptococcus mutans*

Grupos de estudio	Tratamiento experimental / Control	Halo de inhibición neto (mm; Media ± D.E.)	Valor p (ANOVA)
G1	Control positivo (Clorhexidina *0,12 %*)	34.65 ± 0.94 a	
G2	Control negativo (NLC vacío)	0.00 ± 0.00 c	
G3	AC puro *20 %*	16.45 ± 0.88 b	< 0.001
G4	4-AC puro *20 %*	0.00 ± 0.00 c	
G5	NLC-AC *0,2 %*	0.00 ± 0.00 c	
G6	NLC-4-AC *0,2 %*	0.00 ± 0.00 c	

Nota: D.E.: Desviación Estándar; AC: Ácido carmínico; 4-AC: Ácido 4-aminocarmínico; NLC: Portadores lipídicos nanoestructurados. Un diámetro de 0.00 mm indica ausencia de halo de inhibición neta (actividad nula). Superíndices alfabéticos distintos (a, b, c) dentro de una misma columna indican diferencias estadísticas significativas mediante la prueba *post-hoc* de Tukey ($p < 0.05$); la letra (**a y b**) identifica a los grupos que conservan actividad antimicrobiana real frente al

control negativo, mientras que la letra (**c**) identifica de forma exclusiva a los grupos con actividad nula y estadísticamente idénticos al control negativo (G2).

El análisis de varianza para la técnica de goteo superficial determinó diferencias significativas globales en la distribución de los halos netos ($p < 0.001$). El grupo G1 (Clorhexidina al *0,12 %*) registró un diámetro promedio de 34.65 ± 0.94 mm (a). El grupo G3 (AC al *20 %*) experimentó una disminución en su diámetro, registrando una media de 16.45 ± 0.88 mm (b). Por su parte, la variante modificada 4-AC (G4) y los nanocompuestos (G5 y G6) no mostraron halo de inhibición (0.00 mm), agrupándose junto con el control negativo G2 en la misma categoría de respuesta nula (c) mediante la prueba de Tukey (Tabla 7).



Nota: Control +: Digluconato de Clorhexidina 0.12%; Control -: Portadores Lipídicos Nanoestructurados (NLC) vacíos; AC 20%: Ácido Carmínico puro al 20%; 4-AC 20%: Ácido 4-Aminocarmínico puro al 20%; NLC-AC 0.2%: NLC cargadas con Ácido Carmínico al 0.2%; NLC-4-AC 0.2%: NLC cargadas con Ácido 4-Aminocarmínico al 0.2%. Las barras de error representan la desviación estándar (+/- 1 DE). Medicion a las 24 horas

Figura 5. Comparación de los halos de inhibición neta entre las técnicas de difusión profunda y goteo superficial frente a *S. mutans*

Este comportamiento uniforme confirma estadísticamente que las variaciones en la técnica de difusión modulan la difusión del ácido libre, manteniendo la resistencia selectiva que *S. mutans* presenta ante la matriz nanoestructurada (Figura 5).

5.2 Ensayos microbiológicos frente a *Porphyromonas gingivalis*

Tabla 8. Actividad antimicrobiana por el método de Difusión Profunda (Pocillo) frente a *Porphyromonas gingivalis*

Grupos de estudio	Tratamiento experimental / Control	Halo de inhibición neto (mm; Media ± D.E.)	Valor p (ANOVA)
G1	Control positivo (Clorhexidina *0,12 %*)	21.21 ± 1.40 b	< 0.001
G2	Control negativo (NLC Blanco)	0.00 ± 0.00 d	
G3	AC puro *20 %*	35.41 ± 2.45 a	
G4	4AC puro *20 %*	17.53 ± 1.19 b	
G5	NLC-AC *0,2 %*	11.17 ± 2.28 c	
G6	NLC-4AC *0,2 %*	0.00 ± 0.00 d	

Nota: D.E.: Desviación Estándar; AC: Ácido carmínico; 4-AC: Ácido 4-aminocarmínico; NLC: Portadores lipídicos nanoestructurados. Un diámetro de 0.00 mm indica ausencia de halo de inhibición neta (actividad nula). Superíndices alfabéticos distintos (a, b, c, d) dentro de una misma columna indican diferencias estadísticas significativas mediante la prueba *post-hoc* de Tukey ($p < 0.05$); la letra (**a, b, c**) identifica a los grupos que conservan actividad antimicrobiana real frente al control negativo, mientras que la letra (**d**) identifica de forma exclusiva a los grupos con actividad nula y estadísticamente idénticos al control negativo (G2).

El análisis de varianza para la técnica de difusión profunda en pocillo revela diferencias significativas entre las medias de los grupos tratados frente al patógeno periodontal ($p < 0.001$). El grupo G3 (AC puro *20 %*) obtuvo la mayor media del estudio con un halo medio de 35.41 ± 2.45 mm, posicionándose en un rango de corte superior exclusivo (a). Por su parte, el control positivo de clorhexidina (G1) y la variante modificada libre (4-AC al *20 %*) (G4) registraron medias de 21.21 ± 1.40 mm y 17.53 ± 1.19 mm respectivamente. Al evaluar los sistemas nanoestructurados, la prueba de Turkey no encontró diferencias significativas entre G1 y G4, ubicándolos en el mismo subconjunto (b). Al evaluar los sistemas nanoestructurados, el grupo G5 (NLC-AC al *0,2 %*) registró un halo de inhibición promedio de 11.17 ± 2.28 mm (c). En contraste, los grupos G2 (NLC vacías) y G6 (NLC-4-AC) manifestaron una ausencia total de bioactividad (0.00 mm) conformando el subconjunto de actividad nula (d) (Tabla 8).

Tabla 9. Actividad antimicrobiana por el método de Difusión Superficial (Goteo) frente a *Porphyromonas gingivalis.*

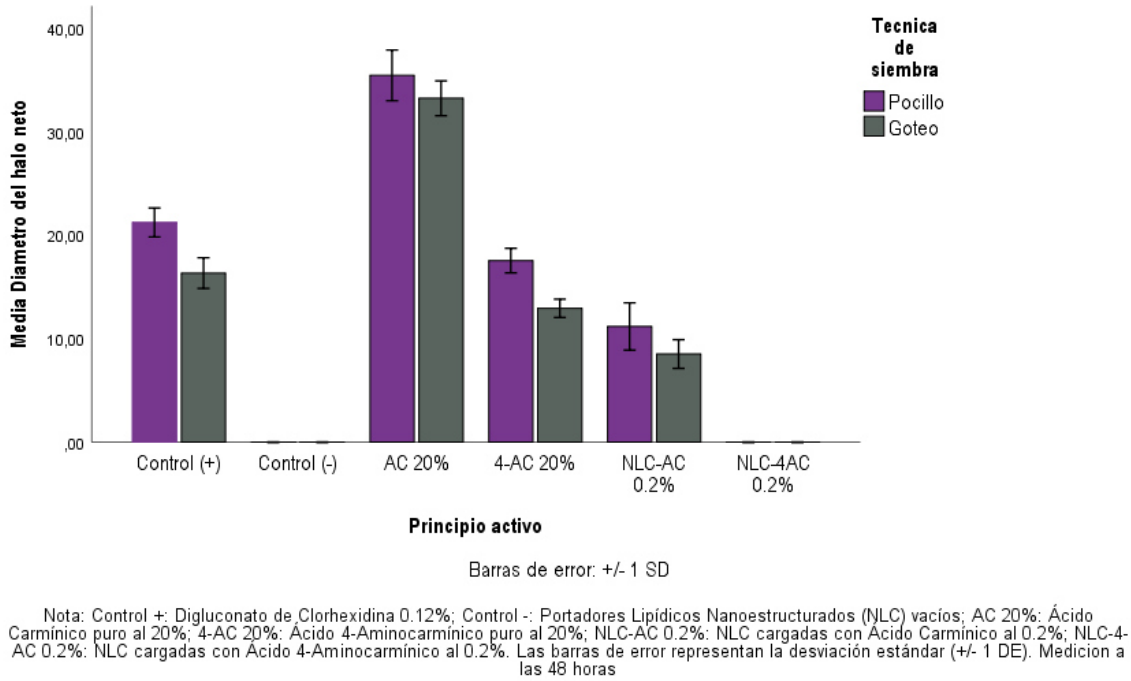
Grupos de estudio	Tratamiento experimental / Control	Halo de inhibición neto (mm; Media ± D.E.)	Valor p (ANOVA)
G1	Control positivo (Clorhexidina *0,12 %*)	16.32 ± 1.48 b	
G2	Control negativo (NLC vacío)	0.00 ± 0.00 d	
G3	AC puro *20 %*	33.20 ± 1.68 a	< 0.001
G4	4-AC puro *20 %*	12.92 ± 0.89 c	
G5	NLC-AC *0,2 %*	8.51 ± 1.38 c	
G6	NLC-4-AC *0,2 %*	0.00 ± 0.00 d	

Nota: D.E.: Desviación Estándar; AC: Ácido carmínico; 4-AC: Ácido 4- aminocarmínico; NLC: Portadores lipídicos nanoestructurados. Un diámetro de 0.00 mm indica ausencia de halo de inhibición neta (actividad nula). Superíndices alfabéticos distintos (a, b, c, d) dentro de una misma columna indican diferencias estadísticas significativas mediante la prueba post-hoc de Tukey ($p<0.05$); las letras (a, b y c) identifican a los grupos que conservan actividad antimicrobiana real frente al control negativo, mientras que la letra (d) identifica de forma exclusiva a los grupos con actividad nula y estadísticamente idénticos al control negativo (G2).

La evaluación microbiológica de la técnica por goteo superficial sobre *P. gingivalis* reportó variaciones estadísticas contundentes ($p < 0.001$). El ácido carmínico libre (G3) lideró nuevamente la restricción del crecimiento con una media de 33.20 ± 1.68 mm (a), seguido por el estándar clínico clorhexidina al *0,12 %* (G1) con una media de 16.32 ± 1.48 mm (b). Bajo este esquema de superficie, el compuesto libre modificado (4-AC puro al *20 %*) (G4) obtuvo una disminución significativa en su diámetro, con valores de 12.92 ± 0.89 mm, compartiendo subconjunto homogéneo

(c) con el grupo nanoestructurado G5 (NLC-AC al *0,2 %*:) con una media de 8.51 ± 1.38 mm.

Finalmente, el grupo G6 (NLC-4-AC al *0,2 %*) y el grupo G2 (NLC vacía) mostraron una ausencia total de halo de inhibición (0.00 ± 0.00 mm), evidenciando una actividad nula (d) (Tabla 9).



Nota: Control +: Digluconato de Clorhexidina 0.12%; Control -: Portadores Lipídicos Nanoestructurados (NLC) vacíos; AC 20%: Ácido Carmínico puro al 20%; 4-AC 20%: Ácido 4-Aminocarmínico puro al 20%; NLC-AC 0.2%: NLC cargadas con Ácido Carmínico al 0.2%; NLC-4-AC 0.2%: NLC cargadas con Ácido 4-Aminocarmínico al 0.2%. Las barras de error representan la desviación estándar (+/- 1 DE). Medicion a las 48 horas

Figura 6. Comparación de los halos de inhibición neta entre las técnicas de difusión profunda y goteo superficial frente a *Porphyromonas gingivalis*

Al analizar la Figura 6, se hace evidente que la respuesta de *Porphyromonas gingivalis* a los tratamientos está ligada a la concentración del principio activo. Con ambos métodos de siembra, las soluciones libres de ácido carmínico (AC) al *20 %* y su variante aminada (4-AC) al *20 %* fueron las que consiguieron los halos de inhibición más grandes. Sin embargo, un hallazgo clave en el gráfico es el rendimiento del sistema nanoestructurado G5 (NLC-AC *0,2 %*); este portador lipídico

logró mantener una actividad antimicrobiana importante frente al patógeno, a pesar de que la dosis ultradiluida de AC libre al *20 %* utilizada.

VI. DISCUSIÓN

Al examinar los resultados de los ensayos biológicos, se evidencia que *Porphyromonas gingivalis* es altamente sensible frente al ácido carmínico puro al *20 %* (G3). En el método de difusión en pocillo, este compuesto logró un halo de inhibición promedio de 35.41 ± 2.45 mm. Este dato es crucial porque marca una distancia clara frente a lo reportado en la literatura, donde la gran mayoría de investigaciones previas evaluaron extractos vegetales crudos o mezclas empíricas (3,4,65,66,69). El estudio de Galán Luna et al. (8), por ejemplo, utilizó un extracto directo de la grana cochinilla para el control bacteriano; sin embargo, ese tipo de preparados representa una mezcla biológica compleja donde el ácido carmínico es solo un componente dentro de una matriz sin purificar.

A diferencia de esos trabajos, en esta intervención no se usó un extracto, sino el producto final de un aislamiento químico estandarizado de la cochinilla: el ácido carmínico. Evaluamos la molécula como un principio activo puro. Esta pureza molecular es clave porque elimina las variables de confusión que introducen los componentes secundarios de los extractos crudos, garantizando que el efecto inhibitorio observado sobre el crecimiento bacteriano sea una propiedad directa de la antraquinona purificada. Al trabajar con la molécula aislada, su potencial antimicrobiano frente a este patógeno periodontal superó por mucho los registros de Galán Luna et al.(8), quienes necesitaron concentraciones altas del 40% y 50% en extracto para notar una actividad antimicrobiana. Por el contrario, nuestros resultados coinciden con la alta susceptibilidad que BinShabaib et al. (4), Gan et al. (5) y C. Park et al. (66) atribuyen a esta cepa Gramnegativa al exponerla a agentes que alteran su estabilidad celular.

Por otro lado, para entender mejor como se difunden estos compuestos y evaluar el comportamiento de los nanosistemas, la metodología incluyó el contraste entre la difusión profunda en pocillo y el método de goteo superficial (drop plate). Esta última técnica demostró ser de gran utilidad al trabajar con sistemas de base lipídica. Franco et al. (102) ya advirtieron sobre este comportamiento al estudiar la actividad de ácidos grasos y lípidos complejos, señalando que las matrices grasas naturales interactúan de forma particular en las interfaces del agar. Por esta razón, se necesitan pruebas que coloquen el compuesto directamente sobre la superficie celular. De lo contrario, se corre el riesgo de subestimar su potencial bacteriano debido al atrapamiento molecular en la profundidad del medio de agar respectivo.

La elección del método de goteo superficial se validó desde el punto de vista estadístico por su alta precisión y fidelidad. Según los análisis paramétricos y no paramétricos publicados por Naghili et al. (103), la técnica de drop plate no solo optimiza recursos y tiempo en el laboratorio, sino que tiene una concordancia matemática idéntica con las técnicas convencionales de extensión en placa. Esta equivalencia estadística nos da la seguridad de que las variaciones en los halos obedecieron al comportamiento del principio activo frente a la cepa bacteriana en el medio. Se descarta así cualquier sesgo en la manipulación o técnica de siembra.

El punto más innovador de esta investigación estuvo en el desempeño del sistema nanoestructurado G5 (NLC-AC *0,2 %*). A pesar de trabajar con una carga de principio activo cien veces menor que la solución pura al *20 %*, fue capaz de proyectar un halo neto de 11.17 ± 2.28 mm en pocillo y de 8.51 ± 1.38 mm en goteo superficial. Este notable incremento en la respuesta biológica al usar transportadores nanométricos coincide con lo reportado por Amalia et al. (67). En su investigación, el uso de soportes coloidales cargados con apenas un 0.7% de un fármaco base generó halos de inhibición de hasta 32.8 mm. Este resultado se explica porque la matriz lipídica protege y modula la liberación gradual del principio activo.

En nuestro caso, esta capacidad de difusión fue el resultado de la optimización de carga que hicimos en la fase piloto. Descartar las concentraciones al 10% por fenómenos de agregación molecular nos llevó a establecer un límite crítico de carga del 6% en la fase lipídica fundida de cera de abeja y sacha inchi. Al someter esa emulsión a un proceso de ultracizallamiento y sonicación de punta, logramos una dispersión coloidal totalmente homogénea. Esta reducción en el tamaño de partícula facilitó el tránsito del ácido carmínico puro a través de la densa malla hidrofílica del agar. Esto explica por qué una dosis tan baja como el *0,2 %* logra emular con éxito la inhibición de un agente puro al *20 %*.

En contraste con lo anterior, en el diseño experimental, *Streptococcus mutans* se mostró refractario ante los sistemas nanoestructurados (G5 y G6) y la variante modificada de la antraquinona libre (4-AC) (G4). Esto se tradujo en una actividad nula (0.00 ± 0.00 mm) para los grupos G4, G5 y G6 en cada una de las placas sembradas. Este comportamiento difiere con lo reportado por Gabriel et al. (65), C. Park et al. (66) y Park y Yoon (3), autores que suelen describir a *S. mutans* como un microorganismo sensible frente a diversos compuestos fenólicos u organosulfurados, reportando halos significativos en pruebas estándar de difusión. Incluso , Meza-Siccha et al. (1) identificaron a este estreptococo como el patógeno con mayor capacidad de adherencia y viabilidad en superficies complejas de implantes dentales, lo que resalta su agresividad biológica en la cavidad oral. Sin embargo, en nuestras pruebas de control positivo, la clorhexidina al *0,12 %* (G1) inhibió a la cepa eficazmente, alcanzando halos de 34.45 ± 1.19 mm en pocillo y 34.65 ± 0.94 mm en goteo. Esto ratifica que el cultivo era totalmente viable y descarta fallas en los medios de cultivo. La explicación de por qué nuestras formulaciones no mostraron actividad frente a *S. mutans* – a diferencia del efecto logrado ante *P. gingivalis* – radica en la pureza del principio activo químico que usamos y en la estructura propia de la pared celular Grampositiva. Al trabajar con las moléculas puras (AC y 4-AC) en lugar de extractos

crudos, se eliminaron azúcares, proteínas y metabolitos secundarios que suelen actuar como agentes surfactantes naturales o facilitadores de permeabilidad en la pared bacteriana (75). Frente a una entidad química pura y estandarizada, la estructura de *S. mutans* impone una barrera física muy difícil de cruzar. Esta bacteria está protegida por una pared celular rígida y gruesa formada por múltiples capas de peptidoglicano de las que emergen ácidos teicoicos y lipoteicoicos (75), la cual le confiere a la superficie bacteriana un carácter fuertemente hidrofílico y una carga neta negativa. Por su parte, nuestras NLC fueron formuladas con una matriz lipofílica de cera de abeja y aceite de sacha inchi, estabilizada de forma neutra con lecitina de soya. Cuando estos NLC entran en contacto con la superficie bacteriana de *S. mutans,* ocurre un fenómeno de repulsión electrostática e interfacial que impide la adhesión del vehículo coloidal. Asimismo, en la técnica de goteo superficial (drop plate), la falta de afinidad hidrofóbica impidió que la nanopartícula penetrara la red de peptidoglicano.

Este comportamiento contrasta con lo observado en *P. gingivalis*, cuyas cadenas de lipopolisacáridos interactúan por afinidad lipídica con las NLC, facilitando la fusión de membranas y la penetración del principio activo. Esto valida experimentalmente el principio de selectividad interfacial y especificidad estructural que Pang et al. (68) describieron al analizar cómo los transportadores pasivos basados en nanomateriales modulan su tasa de entrega y efectividad biológica según las características de la pared celular de cada bacteria (68).

Por otra parte, la respuesta obtenida con el ácido 4-aminocarmínico puro (G4) aporta un dato fisicoquímico valioso que se conecta directamente con el objetivo general del estudio. La molécula modificada mostró halos moderados frente a *P. gingivalis* tanto en pocillo (17.53 ± 1.19 mm) como en goteo (12.92 ± 0.89 mm). Sin embargo, incorporarla en el interior del transportador coloidal (G6: NLC-4-AC *0,2 %*) anuló por completo la evidencia de actividad antimicrobiana (0.00 mm).

Para comprender este comportamiento, es necesario analizar la Relación Estructura-Actividad (SAR) del núcleo antraquinónico. La literatura señala que la polaridad y la naturaleza de los sustituyentes modifican el comportamiento biológico de estas moléculas (104). En este sentido, la modificación estructural del ácido carmínico mediante la incorporación del grupo amina en la posición C4 para dar origen al ácido 4-aminocarmínico, generó un cambio en su respuesta farmacodinámica. En diversas familias de antraquinonas y derivados fenólicos está documentado que optimizar la estabilidad química o modificar los patrones de sustitución molecular puede sacrificar la potencia antimicrobiana, al alterar la reactividad electroquímica necesaria para interactuar con la envoltura celular. En este caso, la adición del grupo amino alteró la reactividad electroquímica de la molécula, disminuyendo la capacidad antimicrobiana que el ácido carmínico libre (AC) presentaba contra los cepas evaluadas (105–108). De este modo, el hallazgo demuestra que la modificación químicamente más estable (C4) redujo, de forma colateral, los mecanismos electrostáticos que la antraquinona libre (AC) requería para desestabilizar la pared bacteriana.

Estos hallazgos le dan un valor distintivo a la investigación. Si bien los tratados clásicos sobre los colorantes derivados de la grana cochinilla detallan la química y la estabilidad del denominado "carmín ácido-estable" o ácido 4-aminocarmínico (7,109), la literatura carecía de evaluaciones y comparaciones cuantitativas directas respecto a la actividad antioxidante y antimicrobiana simultánea entre el AC y 4-AC. Por lo tanto, los halos documentados en este ensayo aportan evidencia sobre cómo se modifica la susceptibilidad microbiana en función de la optimización estructural del principio activo en el ámbito odontológico.

La explicación técnica detrás de la inactividad observada en la nanoformulación radica en cómo este cambio estructural se acopla con el ajuste del pH a un valor neutro de 7.0. Metodológicamente, este parámetro clínico se introdujo para simular las condiciones de la saliva humana y prevenir la desmineralización del esmalte

dental (colocándose muy por encima del límite crítico de disolución de 5.5). Sin embargo, al contrastar este factor con la cinética molecular, se demuestra que en compuestos con núcleo antraquinónico el efecto biológico no depende de conservar un supuesto pH ácido nativo, sino del equilibrio entre sus formas protonadas y desprotonadas en el medio de ensayo. De este modo, la actividad antimicrobiana de las antraquinonas se relaciona directamente con el pH ambiental y con propiedades como la polaridad interfacial y la distribución de aceptores de hidrógeno (104,105).

Varios sistemas antraquinónicos muestran transiciones ácido-base complejas cerca del rango biológico. Esto es evidente en derivados estructurales como la barbaloína, que registra valores de pKa_1 = 9.6 ± 0.6 y pKa_2 = 12.6 ± 0.8, mientras que otros homólogos modifican radicalmente su mecanismo redox entre los rangos de pH 4–7 y pH 10 de según su estado de protonación (110). Bajo estos criterios, resulta fundamentado proponer que, al neutralizar el entorno a un pH de 7.0 para simular las condiciones de la cavidad oral, la aminación en la posición C4 alteró la distribución de carga y la polaridad del cromóforo, condicionando su afinidad con los blancos microbianos. Como advierte la literatura sobre derivados amino-antraquinónicos, alterar el patrón de sustitución periférica puede reconfigurar la bioactividad de forma asimétrica, disminuyendo la eficacia frente a microorganismos de manera colateral (111–113).

Bajo este estado electrostático neutro inducido por el ajuste a pH 7.0, el equilibrio químico desplazó al compuesto purificado 4-AC hacia una condición marcadamente lipofílica. Esto se tradujo en una elevada afinidad por la matriz grasa compuesta por cera de abeja y el aceite de sacha inchi. Como consecuencia directa, el principio activo modificado quedó retenido por interacciones hidrofóbicas en el núcleo interno de la nanopartícula, lo que frenó su desprendimiento y redujo su coeficiente de partición hacia la fase acuosa del agar. Al no alcanzarse una tasa de liberación adecuada en el medio hidrofílico, la concentración periférica del compuesto libre no

logró superar la concentración mínima inhibitoria (CMI) necesaria para inducir el efecto antimicrobiano. Por consiguiente, la disminución de la actividad antimicrobiana del 4-aminocarmínico frente al ácido carmínico basal se sostiene como una consecuencia directa de la modificación estructural y del cambio en su estado ácido-base a pH 7, más que por apartarse de un pH nativo (114,115). Esta relación entre la estructura molecular y el medio de ensayo coincide con lo que Shirai et al. (69) ya advertían al demostrar cómo las condiciones de reparto aceite/agua modifican la potencia antimicrobiana final de los principios activos al alterar su difusión.

VII. CONCLUSIÓN

1. Las soluciones libres al *20 %* (AC y 4-AC) demostraron perfiles de actividad antimicrobiana diferenciados: el ácido carmínico libre demostró efectividad antimicrobiana contra ambas bacterias, mientras que el ácido 4-aminocarmínico libre solo tuvo un efecto inhibitorio moderado frente a *Porphyromonas gingivalis* y no mostró ninguna actividad contra *Streptococcus mutans*.
2. La evaluación de las nanoformulaciones mediante las técnicas de difusión mostraron resultados diferenciados: el nanosistema NLC-AC mostró actividad lítica sobre *P. gingivalis,* a diferencia del NLC-4-A, que no produjo un halo de inhibición frente a este patógeno. En el caso de *S. mutans* ambos nanosistemas resultaron sin actividad biológica.
3. El sistema NLC cargado con el ácido 4-aminocarmínico no mostró actividad antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans* ni *Porphyromonas gingivalis*. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis general planteada en este trabajo de investigación.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Priorizar el empleo de principios activos aislados y compuestos puros estandarizados en futuras investigaciones nanomedicinales, en lugar de extractos crudos complejos. Esto permitirá garantizar con mayor precisión la carga molecular dentro de los portadores lipídicos nanoestructurados (NLC), facilitando el control de las interacciones moleculares y garantizando la reproducibilidad en la liberación del principio activo.
2. Ampliar la evaluación experimental *in vitro* mediante ensayos de citotoxicidad celular en fibroblastos gingivales humanos y modelos de biopelículas (biofilm) polimicrobianas mixtas. Contar con estos datos de biocompatibilidad y respuesta en entornos complejos es un requisito indispensable para certificar la seguridad biológica de los principios activos puros y nanoestructurados antes de avanzar a fases preclínicas.
3. Evaluar el comportamiento cinético y la tasa de liberación de los sistemas coloidales bajo un rango dinámico de pH que simule las variaciones de la cavidad bucal (entre 4.5 y 6.8), permitiendo determinar si el gradiente de acidez característico de las lesiones cariosas y bolsas periodontales actúan como un estímulo natural para activar y desencadenar la liberación del principio activo atrapado.
4. Desarrollar ensayos microbiológicos complementarios utilizando cepas nativas aisladas directamente de pacientes con diagnóstico clínico de caries dental y periodontitis, a fin de contrastar los perfiles de susceptibilidad obtenidos en las cepas estándar ATCC frente a los mecanismos de resistencia colectiva que ocurren en los aislamientos clínicos de la cavidad oral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Meza-Siccha AS, Aguilar-Luis MA, Silva-Caso W, Mazulis F, Barragan-Salazar C, del Valle-Mendoza J. *In vitro* Evaluation of Bacterial Adhesion and Bacterial Viability of *Streptococcus mutans*, Streptococcus sanguinis, and *Porphyromonas gingivalis* on the Abutment Surface of Titanium and Zirconium Dental Implants. Int J Dent. 2019;2019(1):4292976. doi:10.1155/2019/4292976

2. Park JY, Lee JY, Kim Y, Kim BK, Kim BK, Choi SI. Biosafety characteristics and antibacterial activity of probiotic strains against *Streptococcus mutans*, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, and *Porphyromonas gingivalis*. Ann Microbiol. 2025 Jan 15;75(1):2. doi:10.1186/s13213-024-01790-7

3. Park CM, Yoon HS. Antibacterial Activity and Inhibitory Effect of Biofilm Formation by Actinidia polygama against *S. mutans* and *P. gingivalis*. Biomed Sci Lett. 2023 Jun 30;29(2):88–94. doi:10.15616/BSL.2023.29.2.88

4. BinShabaib MS, ALHarthi SS, Helaby BS, AlHefdhi MH, Mohammed AE, Aabed K. Comparison of the Anti-bacterial Efficacy of Saussurea costus and Melaleuca alternifolia Against *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*, and Enterococcus faecalis: An in-vitro Study. Front Oral Health. 2022 Jun 27;3. doi:10.3389/froh.2022.950840

5. Gan N, Fang Y, Weng W, Jiao T, Yu W. Antibacterial effects and microarray-based molecular mechanisms of trans-cinnamaldehyde against *Porphyromonas gingivalis*. Heliyon. 2023 Dec 1;9(12). doi:10.1016/j.heliyon.2023.e23048

6. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. J Nat Prod. 2020 Mar 27;83(3):770–803. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01285

7. Cooksey CJ. The red insect dyes: carminic, kermesic and laccaic acids and their derivatives. Biotech Histochem. 2019 Feb 17. Located at: world. doi:10.1080/10520295.2018.1511065

8. Luna MJG, Pérez VHH, Contla DMR, Hernández LFA, Güitrón LC, Hernández AG. Incremento del efecto antibiótico contra la cepa Staphyloccocus aureus del extracto de grana cochinilla (Ac) con hidroxiapatita (HAp). Pädi Bol Científico Cienc Básicas E Ing ICBI. 2019;7(Especial-2):Especial-2. doi:10.29057/icbi.v7iespecial-2.4742

9. Amalia M, Ervina I, Silvia, Nasution EE. Antimicrobial activity of chitosan nanoparticles loaded with 0.7% tetracycline against *Porphyromonas gingivalis*. J Dentomaxillofacial Sci. 2023 Dec 1;8(3):3. doi:10.15562/jdmfs.v8i3.1652

10. Kawasaki Y, Sugimoto N, Sato K, Yamazaki S, Ishiwata H, Yoneya T. Identification of acid-resistant cochineal in imported apple syrup products. Vol. 43. 2002;43(4):191–5. doi:10.3358/shokueishi.43.191

11. Sugimoto N, Kawasaki Y, Sato K, Aoki H, Ichi T, Koda T, et al. Structure of acid-stable carmine. Shokuhin Eiseigaku Zasshi J Food Hyg Soc Jpn. 2002 Feb;43(1):18–23. doi:10.3358/shokueishi.43.18 PubMed PMID: 11998314.

12. Utamaningyas A, Pramesti HT, Balafif FF. The *Streptococcus mutans* ability to survive in biofilms and during dental caries formation: scoping review. J Syiah Kuala Dent Soc. 2022;7(2):2. doi:10.24815/jds.v7i2.30295

13. Naghili H, Tajik H, Mardani K, Razavi Rouhani SM, Ehsani A, Zare P. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. Vet Res Forum. 2013;4(3):179–83. PubMed PMID: 25653794; PubMed Central PMCID: PMC4312378.

14. Jain N, Dutt U, Radenkov I, Jain S. WHO's global oral health status report 2022: Actions, discussion and implementation. Oral Dis. 2024 Mar;30(2):73–9. doi:10.1111/odi.14516 PubMed PMID: 36680388.

15. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Laverty D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. J Clin Periodontol. 2017;44(S18):S94–105. doi:10.1111/jcpe.12677

16. Trindade D, Carvalho R, Machado V, Chambrone L, Mendes JJ, Botelho J. Prevalence of periodontitis in dentate people between 2011 and 2020: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. J Clin Periodontol. 2023 May;50(5):604–26. doi:10.1111/jcpe.13769

17. Robello-Malatto JM. Frecuencia de enfermedades bucales en pacientes atendidos en una clínica especializada en odontología en Lima, Perú. 2014.

18. Oral Health Peru 2022 country profile [Internet]. [cited 2025 Jan 9]. Available from: https://www.who.int/publications/m/item/oral-health-per-2022-country-profile

19. Informe Sobre la Situación Mundial de la Salud Bucodental: Hacia la Cobertura Sanitaria Universal para la Salud Bucodental de Aquí a 2030. Resumen Ejecutivo. 1st ed. Geneva: World Health Organization; 2022. 1 p.

20. Barrientos L, Herrera CL, Montenegro G, Ortega X, Veloz J, Alvear M, et al. Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and Streptococcus sobrinus. Braz J Microbiol. 2013 Oct 30;44(2):577–85. doi:10.1590/S1517-83822013000200038 PubMed PMID: 24294257; PubMed Central PMCID: PMC3833163.

21. Veloz JJ, Alvear M, Salazar LA. Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Streptococcus mutans* of Individual and Mixtures of the Main Polyphenolic Compounds Found in Chilean Propolis. BioMed Res Int. 2019 Jan 2;2019:7602343. doi:10.1155/2019/7602343 PubMed PMID: 30719447; PubMed Central PMCID: PMC6334332.

22. Abdulkareem A, Abdulbaqi H, Gul S, Milward M, Chasib N, Alhashimi R. Classic vs. Novel Antibacterial Approaches for Eradicating Dental Biofilm as Adjunct to Periodontal Debridement: An Evidence-Based Overview. Antibiotics. 2022 Jan;11(1):1. doi:10.3390/antibiotics11010009

23. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. Nat Rev Dis Primer. 2017 Jun 22;3:17038. doi:10.1038/nrdp.2017.38 PubMed PMID: 28805207.

24. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998 Feb;25(2):134–44. doi:10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x PubMed PMID: 9495612.

25. Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P, Cortellini P, et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. J Periodontol. 2018 Jun;89 Suppl 1:S237–48. doi:10.1002/JPER.17-0733 PubMed PMID: 29926943.

26. Aguilar-Luis MA, Casas Apayco L, Tinco Valdez C, De Lama-Odría M del C, Weilg C, Mazulis F, et al. Screening and Assessment of Antimicrobial Susceptibility of Periodontopathic Bacteria in Peruvian Patients with Periodontitis: A Pilot Study. Int J Dent. 2021 Feb 24;2021:2695793.

doi:10.1155/2021/2695793 PubMed PMID: 33679978; PubMed Central PMCID: PMC7929679.

27. Aguilar-Luis MA, Casas Apayco L, Tinco Valdez C, De Lama-Odría M del C, Weilg C, Mazulis F, et al. Screening and Assessment of Antimicrobial Susceptibility of Periodontopathic Bacteria in Peruvian Patients with Periodontitis: A Pilot Study. Int J Dent. 2021 Feb 24;2021:2695793. doi:10.1155/2021/2695793 PubMed PMID: 33679978; PubMed Central PMCID: PMC7929679.

28. Contaldo M, D'Ambrosio F, Ferraro GA, Di Stasio D, Di Palo MP, Serpico R, et al. Antibiotics in Dentistry: A Narrative Review of the Evidence beyond the Myth. Int J Environ Res Public Health. 2023 Jan;20(11):11. doi:10.3390/ijerph20116025

29. Klein EY, Van Boeckel TP, Martinez EM, Pant S, Gandra S, Levin SA, et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Apr 10;115(15):E3463–70. doi:10.1073/pnas.1717295115 PubMed PMID: 29581252; PubMed Central PMCID: PMC5899442.

30. Mahuli SA, Zorair AM, Jafer MA, Sultan A, Sarode G, Baeshen HA, et al. Antibiotics for Periodontal Infections: Biological and Clinical Perspectives. J Contemp Dent Pract. 2020 Apr 1;21(4):372–6. PubMed PMID: 32584271.

31. de Pontes JTC, Toledo Borges AB, Roque-Borda CA, Pavan FR. Antimicrobial Peptides as an Alternative for the Eradication of Bacterial Biofilms of Multi-Drug Resistant Bacteria. Pharmaceutics. 2022 Mar 15;14(3):642. doi:10.3390/pharmaceutics14030642 PubMed PMID: 35336016; PubMed Central PMCID: PMC8950055.

32. Stan D, Enciu AM, Mateescu AL, Ion AC, Brezeanu AC, Stan D, et al. Natural Compounds With Antimicrobial and Antiviral Effect and Nanocarriers Used for Their Transportation. Front Pharmacol. 2021 Sep 6;12:723233. doi:10.3389/fphar.2021.723233 PubMed PMID: 34552489; PubMed Central PMCID: PMC8450524.

33. Andrei V, Fiț NI, Matei I, Barabás R, Bizo LA, Cadar O, et al. *In vitro* Antimicrobial Effect of Novel Electrospun Polylactic Acid/Hydroxyapatite Nanofibres Loaded with Doxycycline. Materials. 2022 Jan;15(18):18. doi:10.3390/ma15186225

34. Fernandez CC, Sokolonski AR, Fonseca MS, Stanisic D, Araújo DB, Azevedo V, et al. Applications of Silver Nanoparticles in Dentistry: Advances and Technological Innovation. Int J Mol Sci. 2021 Mar 2;22(5):2485. doi:10.3390/ijms22052485 PubMed PMID: 33801230; PubMed Central PMCID: PMC7957900.

35. Farkas NI, Marincaș L, Barabás R, Bizo L, Ilea A, Turdean GL, et al. Preparation and Characterization of Doxycycline-Loaded Electrospun PLA/HAP Nanofibers as a Drug Delivery System. Mater Basel Switz. 2022 Mar 12;15(6):2105. doi:10.3390/ma15062105 PubMed PMID: 35329557; PubMed Central PMCID: PMC8951507.

36. Organization WH. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017. In: Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017 [Internet]. 2017 [cited 2025 May 8]. Available from: https://iris.who.int/handle/10665/259744

37. Durrance-Bagale A, Jung AS, Frumence G, Mboera L, Mshana SE, Sindato C, et al. Framing the Drivers of Antimicrobial Resistance in Tanzania. Antibiotics. 2021 Aug;10(8):8. doi:10.3390/antibiotics10080991

38. Mshana SE, Sindato C, Matee MI, Mboera LEG. Antimicrobial Use and Resistance in Agriculture and Food Production Systems in Africa: A Systematic Review. Antibiotics. 2021 Aug;10(8):8. doi:10.3390/antibiotics10080976

39. Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: Its potential for resistance development and ecological and human risk. Environ Int. 2018 May 1;114:131–42. doi:10.1016/j.envint.2018.02.003

40. Ardila CM, Bedoya-García JA, Arrubla-Escobar DE. Antibiotic resistance in periodontitis patients: A systematic scoping review of randomized clinical trials. Oral Dis. 2023;29(7):2501–11. doi:10.1111/odi.14288

41. Conrads G, Klomp T, Deng D, Wenzler JS, Braun A, Abdelbary MMH. The Antimicrobial Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis*: Genetic Repertoire, Global Phenotype, and Review of the Literature. Antibiotics. 2021 Dec;10(12):1438. doi:10.3390/antibiotics10121438

42. Abad MJ, Ansuategui M, Bermejo P, Abad MJ, Ansuategui M, Bermejo P. Active antifungal substances from natural sources. Arkivoc [Internet]. 2007 [cited 2024 Nov 15]. Available from: https://produccioncientifica.ucm.es/documentos/5db96c4e2999520a73d3d84c

43. Dadgostar P. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. Infect Drug Resist. 2019 Dec 20;12:3903–10. doi:10.2147/IDR.S234610 PubMed PMID: 31908502; PubMed Central PMCID: PMC6929930.

44. O L, E P, M V, D F, R R. Bioactive Compounds from Plants Used in Peruvian Traditional Medicine. Nat Prod Commun. 2016 Mar;11(3). PubMed PMID: 27169179.

45. Veloz JJ, Alvear M, Salazar LA. Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Streptococcus mutans* of Individual and Mixtures of the Main Polyphenolic Compounds Found in Chilean Propolis. BioMed Res Int. 2019 Jan 2;2019:7602343. doi:10.1155/2019/7602343 PubMed PMID: 30719447; PubMed Central PMCID: PMC6334332.

46. Barrientos L, Herrera CL, Montenegro G, Ortega X, Veloz J, Alvear M, et al. Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and Streptococcus sobrinus. Braz J Microbiol. 2013 Oct 30;44(2):577–85. doi:10.1590/S1517-83822013000200038 PubMed PMID: 24294257; PubMed Central PMCID: PMC3833163.

47. (PDF) Revisión de las plantas medicinales con efecto antibacteriano en enfermedades periodontales en América. ResearchGate. 2024 Dec 9. doi:10.26722/rpmi.2023.v8n2.718

48. Pasupuleti MK, Nagate RR, Alqahtani SM, Penmetsa GS, Gottumukkala SNVS, Ramesh KSV. Role of Medicinal Herbs in Periodontal Therapy: A Systematic Review. J Int Soc Prev Community Dent. 2023 Feb 27;13(1):9–16. doi:10.4103/jispcd.JISPCD_210_22 PubMed PMID: 37153928; PubMed Central PMCID: PMC10155875.

49. Nazzaro F, Fratianni F, Martino LD, Coppola R, Feo VD. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. Pharmaceuticals. 2013 Nov 25;6(12):1451. doi:10.3390/ph6121451 PubMed PMID: 24287491.

50. Bazán Aliaga RB, Reátegui Arévalo Ó, Solórzano Espinoza LV, Castro Arredondo JA, Miranda García VE, Martínez Cadillo EE, et al. Actividad inhibitoria del extracto etanólico del Cyperus Rotundus procedente de la región de Cajamarca (provincia de Contumazá) en una cepa estandarizada de *Streptococcus mutans* (ATCC ® 25175 TM). Rev Científica Odontológica. 10(1):e093. doi:10.21142/2523-2754-1001-2022-093 PubMed PMID: 38389917; PubMed Central PMCID: PMC10880713.

51. Efecto Antibacteriano de la Infusión de Orégano (Origanum vulgare) sobre el Crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans*, 2015 – International Journal of Odontostomatology [Internet]. [cited 2025 Feb 20]. Available from: https://ijodontostomatology.com/es/articulo/efecto-antibacteriano-de-la-infusion-de-oregano-origanum-vulgare-sobre-el-crecimiento-in-vitro-de-streptococcus-mutans-2015/

52. Reyes KB, Ramos-Perfecto D, Luna AC, Botello CP, Paredes DD, Macedo JCR. Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de Stevia rebaudiana sobre Streptococcus sanguinis y Actinomyces viscosus, bacterias iniciadoras en la formación de biopelícula dental. Odontol Sanmarquina. 2018 Mar 21;21(1):1. doi:10.15381/os.v21i1.14428

53. Idir F, Van Ginneken S, Coppola GA, Grenier D, Steenackers HP, Bendali F. Origanum vulgare ethanolic extracts as a promising source of compounds with antimicrobial, anti-biofilm, and anti-virulence activity against dental plaque bacteria. Front Microbiol. 2022 Nov 2;13:999839. doi:10.3389/fmicb.2022.999839 PubMed PMID: 36406439; PubMed Central PMCID: PMC9668103.

54. Aldave CCA, Quispe JMN. Revisión de las plantas medicinales con efecto antibacteriano en enfermedades periodontales en América. Rev Peru Med Integrativa. 2023 Sep 5;8(2):2. doi:10.26722/rpmi.2023.v8n2.718

55. Gamboa F, Muñoz CC, Numpaque G, Sequeda-Castañeda LG, Gutierrez SJ, Tellez N. Antimicrobial Activity of Piper marginatum Jacq and Ilex guayusa Loes on Microorganisms Associated with Periodontal Disease. Int J Microbiol. 2018 Sep 25;2018:4147383. doi:10.1155/2018/4147383 PubMed PMID: 30356383; PubMed Central PMCID: PMC6176333.

56. Caballero Zamora GK. Efecto antimicrobiano *In vitro* del Látex de Croton Lechleri (Sangre de Drago) sobre Candida Albicans y Staphylococcus Aureus. Univ Católica Los Ángeles Chimbote [Internet]. 2020 Jul 31 [cited 2025 Feb 20]. Available from: https://repositorio.uladech.edu.pe/handle/20.500.13032/17174

57. Extraction pathways and purification strategies towards carminic acid as natural-based food colorant: A comprehensive review. Adv Colloid Interface Sci. 2024 Jan 1;323:103052. doi:10.1016/j.cis.2023.103052

58. Arriagada F, Ugarte C, Günther G, Larraín MA, Guarnizo-Herrero V, Nonell S, et al. Carminic Acid Linked to Silica Nanoparticles as Pigment/Antioxidant Bifunctional Excipient for Pharmaceutical Emulsions. Pharmaceutics. 2020 Apr 19;12(4):376. doi:10.3390/pharmaceutics12040376 PubMed PMID: 32325834; PubMed Central PMCID: PMC7238007.

59. Study of natural anthraquinone colorants by EPR and UV/vis spectroscopy. Dyes Pigments. 2016 Sep 1;132:79–93. doi:10.1016/j.dyepig.2016.04.046

60. (PDF) Crecimiento poblacional de la cochinilla Dactylopius coccus Costa criada en cinco cultivares de nopal Opuntia ficus-indica Mill. ResearchGate [Internet]. 2024 Oct 22 [cited 2025 Feb 20]. Available from:

https://www.researchgate.net/publication/262596571_Crecimiento_poblacional_de_la_cochinilla_Dactylopius_coccus_Costa_criada_en_cinco_cultivares_de_nopal_Opuntia_ficus-indica_Mill

61. Borges A, Freitas V, Mateus N, Fernandes I, Oliveira J. Solid Lipid Nanoparticles as Carriers of Natural Phenolic Compounds. Antioxidants. 2020;9. doi:10.3390/antiox9100998

62. Antioxidants. BoD – Books on Demand; 2019. 420 p.

63. Eick S, Schmitt A, Sachse S, Schmidt KH, Pfister W. *In vitro* antibacterial activity of fluoroquinolones against *Porphyromonas gingivalis* strains. J Antimicrob Chemother. 2004 Aug 1;54(2):553–6. doi:10.1093/jac/dkh354

64. Abdallah EM, Alhatlani BY, de Paula Menezes R, Martins CHG. Back to Nature: Medicinal Plants as Promising Sources for Antibacterial Drugs in the Post-Antibiotic Era. Plants. 2023 Aug 28;12(17):3077. doi:10.3390/plants12173077 PubMed PMID: 37687324; PubMed Central PMCID: PMC10490416.

65. Gabriel T, Vestine A, Kim KD, Kwon SJ, Sivanesan I, Chun SC. MDPI [revista] [Internet]. 2022 [cited 2025 Jul 17]. Actividad antibacteriana de nanopartículas de extracto de ajo (Allium sativum) contra diferentes bacterias como *Streptococcus mutans* y Poryphormonas gingivalis. Available from: https://www.mdpi.com/2076-3417/12/7/3491

66. 박충무, 현숙경, 윤현서. 구강 질환 유발균인 *Streptococcus mutans*와 *Porphyromonas gingivalis*에 대한 모링가(Moringa oleifera) 잎의 항균 효과. 한국차학회지. 2023 Sep;29(3):51–7. doi:10.29225/jkts.2023.29.3.51

67. Amalia M, Ervina I, Silvia U, Nasution EE. Antimicrobial activity of chitosan nanoparti-cles loaded with 0.7% tetracycline against *Porphyromonas gingivalis*. J Dentomaxillofacial Sci. 2023;8(3):3. doi:10.15562/jdmfs.v8i3.1652

68. Pang Q, Jiang Z, Wu K, Hou R, Zhu Y. Nanomaterials-Based Wound Dressing for Advanced Management of Infected Wound. Antibiotics. 2023;12. doi:10.3390/antibiotics12020351

69. Shirai T, Satoh Y, Ishihara K. Antibacterial activity of mulberry extracts and purified fractions against oral pathogenic bacteria. J Oral Biosci. 2024. doi:10.1016/j.job.2023.12.009

70. Álvarez-Martínez FJ, Barrajón-Catalán E, Micol V. Tackling Antibiotic Resistance with Compounds of Natural Origin: A Comprehensive Review. Biomedicines. 2020 Oct;8(10):10. doi:10.3390/biomedicines8100405

71. Abdallah EM, Alhatlani BY, de Paula Menezes R, Martins CHG. Back to Nature: Medicinal Plants as Promising Sources for Antibacterial Drugs in the Post-Antibiotic Era. Plants. 2023 Aug 28;12(17):3077. doi:10.3390/plants12173077 PubMed PMID: 37687324; PubMed Central PMCID: PMC10490416.

72. Vladkova TG, Smani Y, Martinov BL, Gospodinova DN. Recent Progress in Terrestrial Biota Derived Antibacterial Agents for Medical Applications. Molecules. 2024 Oct 15;29(20):4889. doi:10.3390/molecules29204889 PubMed PMID: 39459256.

73. Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. Am J Transl Res. 2019 Jul 15;11(7):3919–31. PubMed PMID: 31396309; PubMed Central PMCID: PMC6684887.

74. Moradali MF, Rehm BHA. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. Nat Rev Microbiol. 2020;18(4):195–210. doi:10.1038/s41579-019-0313-3 PubMed PMID: 31992873; PubMed Central PMCID: PMC7223192.

75. Lemos J, Palmer S, Zeng L, Wen Z, Kajfasz J, Freires I, et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. Microbiol Spectr. 2019 Jan 18;7(1):10.1128/microbiolspec.gpp3-0051–2018. doi:10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018

76. Síntesis biogénica: un enfoque sostenible para la síntesis de nanopartículas mediada por hongos: Química inorgánica y nanometálica: Vol. 53, N.º 5 [Internet]. [cited 2025 Jul 30]. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/24701556.2021.2025078

77. Wouters J, Verhecken A. The coccid insect dyes: hplc and computerized diode-array analysis of dyed yarns. Stud Conserv. 1989 Nov 1;34(4):189–200. doi:10.1179/sic.1989.34.4.189

78. Amin N, Rehman F ur, Adeel S, Ahamd T, Muneer M, Haji A. Sustainable application of cochineal-based anthraquinone dye for the coloration of bio-mordanted silk fabric. Environ Sci Pollut Res. 2020 Mar 1;27(7):6851–60. doi:10.1007/s11356-019-06868-3

79. Chieli A, Sanyova J, Doherty B, Brunetti BG, Miliani C. Chromatographic and spectroscopic identification and recognition of ammoniacal cochineal dyes and pigments. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2016 Jun 5;162:86–92. doi:10.1016/j.saa.2016.03.007 PubMed PMID: 26985877.

80. Cervantes-González J, Vosburg DA, Mora-Rodriguez SE, Vázquez MA, Zepeda LG, Villegas Gómez C, et al. Anthraquinones: Versatile Organic Photocatalysts. ChemCatChem. 2020;12(15):3811–27. doi:10.1002/cctc.202000376

81. Forni C, Facchiano F, Bartoli M, Pieretti S, Facchiano A, D'Arcangelo D, et al. Beneficial Role of Phytochemicals on Oxidative Stress and Age-Related Diseases. BioMed Res Int. 2019 Apr 7;2019:8748253. doi:10.1155/2019/8748253 PubMed PMID: 31080832; PubMed Central PMCID: PMC6475554.

82. Surface-enhanced Raman scattering study of the anthraquinone red pigment carminic acid. Vib Spectrosc. 2006 Mar 17;40(2):161–7. doi:10.1016/j.vibspec.2005.08.002

83. Jiao M, Kong W, Liu W, Dong Z, Yang J, Wei Z, et al. Boosting the antibacterial potency of natural products through nanotechnologies. Int J Pharm. 2025 Apr 15;674:125437. doi:10.1016/j.ijpharm.2025.125437

84. Karnwal A, Kumar G, Pant G, Hossain K, Ahmad A, Alshammari MB. Perspectives on Usage of Functional Nanomaterials in Antimicrobial Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. ACS Omega. 2023 Apr 6;8(15):13492–508. doi:10.1021/acsomega.3c00110 PubMed PMID: 37091369; PubMed Central PMCID: PMC10116640.

85. Khosa A, Reddi S, Saha RN. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. Biomed Pharmacother. 2018 Jul 1;103:598–613. doi:10.1016/j.biopha.2018.04.055

86. Chauhan I, Yasir M, Verma M, Singh A. Nanostructured Lipid Carriers: A Groundbreaking Approach for Transdermal Drug Delivery. Adv Pharm Bull. 2020;10:150–65. doi:10.34172/apb.2020.021

87. Sun Z, Huai Q, Li D, Wu X, Li Y, Zheng H. Investigation on the structure and properties of nanostructured lipid carriers loaded with different contents of

phytosterols and their impact on lipid oxidation. Food Biosci. 2024 Dec 1;62:105033. doi:10.1016/j.fbio.2024.105033

88. Salvi VR, Pawar P. Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier. J Drug Deliv Sci Technol. 2019 Jun 1;51:255–67. doi:10.1016/j.jddst.2019.02.017

89. Khan S, Sharma A, Jain V. An Overview of Nanostructured Lipid Carriers and its Application in Drug Delivery through Different Routes. Adv Pharm Bull. 2022;13:446–60. doi:10.34172/apb.2023.056

90. Ghasemiyeh P, Mohammadi-Samani S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. Res Pharm Sci. 2018;13:288–303. doi:10.4103/1735-5362.235156

91. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*- Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. Caries Res. 2011 Feb 23;45(1):69–86. doi:10.1159/000324598

92. Moravej H, Moravej Z, Yazdanparast M, Heiat M, Mirhosseini A, Moosazadeh Moghaddam M, et al. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. Microb Drug Resist. 2018 Jul;24(6):747–67. doi:10.1089/mdr.2017.0392

93. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Iii JRY, et al. The Exopolysaccharide Matrix Modulates the Interaction between 3D Architecture and Virulence of a Mixed-Species Oral Biofilm. PLOS Pathog. 2012 Apr 5;8(4):e1002623. doi:10.1371/journal.ppat.1002623

94. Contaldo M, D'Ambrosio F, Ferraro GA, Di Stasio D, Di Palo MP, Serpico R, et al. Antibiotics in Dentistry: A Narrative Review of the Evidence beyond the Myth. Int J Environ Res Public Health. 2023 Jan;20(11):11. doi:10.3390/ijerph20116025

95. Molecular Strategies Underlying *Porphyromonas gingivalis* Virulence. J Mol Biol. 2021 Apr 2;433(7):166836. doi:10.1016/j.jmb.2021.166836

96. Gasmi Benahmed A, Mujawdiya PK, Noor S, Gasmi A. *Porphyromonas gingivalis* in the Development of Periodontitis: Impact on Dysbiosis and Inflammation. Arch Razi Inst. 2022 Oct 31;77(5):1539–51. doi:10.22092/ari.2021.356596.1875

97. Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis J. Gingipains, the Major Cysteine Proteinases and Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis*: Structure, Function and Assembly of Multidomain Protein Complexes. Curr Protein Pept Sci. 4(6):397–407. doi:10.2174/1389203033487036

98. Kairu T, Nakao R, Ikeda T, Nakashima K, Potempa J, Imamura T. Ovid [Internet]. [cited 2026 Jul 31]. Inhibition of gingipains and Porphyromonas... : Journal of Periodontal Research. Available from: https://www.ovid.com/journals/jpre/fulltext/10.1111/jre.12372~inhibition-of-gingipains-and-porphyromonas-gingivalis-growth doi:10.1111/jre.12372

99. Wu D, Li X, Zhao G, Hao L, Liu X. Discovery of Gingipains and *Porphyromonas gingivalis* Inhibitors from Food-Derived Natural Products: A Narrative Review. Foods. 2025 Jan;14(16):2869. doi:10.3390/foods14162869

100. Saporito F, Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Boselli C, Icaro Cornaglia A, et al. Essential oil-loaded lipid nanoparticles for wound healing. Int J Nanomedicine.

2018;13:175–86. doi:10.2147/IJN.S152529 PubMed PMID: 29343956; PubMed Central PMCID: PMC5747963.

101. https://www.atcc.org [Internet]. [cited 2025 Aug 15]. ATCC: The Global Bioresource Center. Available from: https://www.atcc.org/

102. Franco A, Scieuzo C, Salvia R, Pucciarelli V, Borrelli L, Addeo NF, et al. Antimicrobial activity of lipids extracted from Hermetia illucens reared on different substrates. Appl Microbiol Biotechnol. 2024;108(1):167. doi:10.1007/s00253-024-13005-9 PubMed PMID: 38261012; PubMed Central PMCID: PMC10806025.

103. Naghili H, Tajik H, Mardani K, Razavi Rouhani SM, Ehsani A, Zare P. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. Vet Res Forum. 2013;4(3):179–83. PubMed PMID: 25653794; PubMed Central PMCID: PMC4312378.

104. Qun T, Zhou T, Hao J, Wang C, Zhang KZ, Xu J, et al. Antibacterial activities of anthraquinones: structure–activity relationships and action mechanisms. RSC Med Chem. 2023;14:1446–71. doi:10.1039/d3md00116d

105. Li Y, Jiang JG. Health functions and structure-activity relationships of natural anthraquinones from plants. Food Funct. 2018;9 12:6063–80. doi:10.1039/c8fo01569d

106. Soliman I, Hasanien YA, Zaki A, Shawky H, Nassrallah AA. Irradiation impact on biological activities of Anthraquinone pigment produced from Talaromyces purpureogenus and its evaluation, characterization and application in beef burger as natural preservative. BMC Microbiol. 2022;22. doi:10.1186/s12866-022-02734-4

107. Godlewska-Żyłkiewicz B, Świsłocka R, Kalinowska M, Golonko A, Świderski G, Arciszewska Ż, et al. Biologically Active Compounds of Plants: Structure-Related Antioxidant, Microbiological and Cytotoxic Activity of Selected Carboxylic Acids. Materials. 2020;13. doi:10.3390/ma13194454

108. Terán R, Guevara R, Mora J, Dobronski L, Barreiro-Costa O, Beske T, et al. Characterization of Antimicrobial, Antioxidant, and Leishmanicidal Activities of Schiff Base Derivatives of 4-Aminoantipyrine. Molecules. 2019;24. doi:10.3390/molecules24152696

109. Dapson R. The history, chemistry and modes of action of carmine and related dyes. Biotech Histochem. 2007;82:173–87. doi:10.1080/10520290701704188

110. Matos FL, Duarte EL, Muniz G, Milan-Garces EA, Coutinho K, Lamy T, et al. Spectroscopic characterization of different protonation/deprotonation states of Barbaloin in aqueous solution. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2023 Feb 5;286:122020. doi:10.1016/j.saa.2022.122020

111. Shupeniuk V, Taras T, Sabadakh O, Luchkevich E, Matkivskyi M. Synthesis and Antimicrobial Activity of Nitrogen-Containing Anthraquinone Derivatives. Iraqi J Pharm Sci. 2022 Dec 24;31(2):193–201. doi:10.31351/vol31iss2pp193-201

112. Satyanarayana N, Nampally U, Sree GD, Priya GD, Zhu Q. A Secondary Amine Catalyzed Metal-Free Multicomponent (One-Pot) Synthesis of Biologically Active Aza-Anthraquinone Derivatives, and Their Structure–Activity Relationship (SAR) Studies. J Heterocycl Chem. 2025;62(12):1928–38. doi:10.1002/jhet.70092

113. Zee-Cheng RKY, Podrebarac EG, Menon CS, Cheng CC. Structural modification study of bis(substituted aminoalkylamino)anthraquinones. An evaluation of the relationship of the [2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]amino side chain with

antineoplastic activity. J Med Chem. 1979 May 1;22(5):501–5. doi:10.1021/jm00191a008

114. Razzano G, Rizzo V, Vigevani A. Determination of phenolic ionization constants of anthracyclines with modified substitution pattern of anthraquinone chromophore. Farm Soc Chim Ital. 1990 Feb 1;45(2):215–22. PubMed PMID: 2133996.

115. Yan X, Jansen CU, Diao F, Qvortrup K, Tanner D, Ulstrup J, et al. Surface-confined redox-active monolayers of a multifunctional anthraquinone derivative on nanoporous and single-crystal gold electrodes. Electrochem Commun. 2021 Mar 1;124:106962. doi:10.1016/j.elecom.2021.106962

X. ANEXOS

Anexo 1: Matriz de tabla de consistencia.

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables y Operacionalización	Metodología
Problema General: ¿Cuál es la actividad antimicrobiana del ácido 4-aminocarmínico cargado en portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis?*	Objetivo General: Evaluar la actividad antimicrobiana del ácido 4-aminocarmínico cargado en portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* Objetivos Específicos: 1. Determinar los diámetros de los halos de inhibición netos mediante difusión en pocillo frente a *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* 2. Evaluar la actividad antimicrobiana del ácido 4-aminocarmínico y su precursor basal "ácido carmínico" cargados en portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* mediante técnicas de difusión biológica 3. Comparar la efectividad farmacodinámica de los portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) cargados frente sus contrapartes en estado libre y los controles experimentales.	Hipótesis general El ácido carmínico (AC) y el ácido 4-aminocarmínico (4-AC) cargados en portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) presentan actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*	Variable Independiente: Tratamiento antimicrobiano (6 grupos experimentales): Dimensiones y valores T1: Clorhexidina *0,12 %* (+) T2: NLC vacías (-) T3: Ácido carmínico libre (*20 %*) T4: Ácido 4-aminocarmínico libre (*20 %*) T5: NLC-AC (*0,2 %*) T6: NLC-4-AC (*0,2 %*) Variable Dependiente: Actividad antimicrobiana *in vitro*: Dimensiones e indicadores Diámetro del halo neto medido en milímetros (mm). • Escala de Duraffourd: Nula: 0.00 mm Sensibilidad intermedia: 0.01 - 14.99 mm Muy sensible: 15.00 - 19.99 mm Sumamente sensible: ≥ 20.00 mm	Tipo y diseño de investigación Aplicada, cuantitativa, experimental, *in vitro*, transversal y controlado Población y muestra Población: Cultivos bacterianos ATCC de *S. mutans y P gingivalis* Muestra: 10 réplicas por grupo de estudio (n = 10). Total = 60 unidades de análisis por método. Técnicas e Instrumentos: Técnicas: Difusión en pozo y goteo superficial. Estandarización: Escala de McFarland al o.5. Atmosfera: anaerobiosis para *P. gingivalis* y anaerobiosis parcial para *S. mutans* Control de pH: ajuste neutro 7.o Instrumento: Calibrador digital (Vernier), ficha de datos. Análisis estadístico Pruebas de análisis de varianza ANOVA de un factor para comparaciones múltiples y prueba post-hoc de Tukey ($p < 0.05$).

Anexo 2: Hoja de recolección de datos.

Efecto antibacteriano del compuesto lipídico nanoestructurado del ácido 4-aminocarminico según concentración frente a *P. gingivalis* (2) y *S. mutans* (1)

Placa	Bacteria	AC	A-4AC	Control +	Control -	AcNCL1	A4acNCL1
1	1	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
2	1	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
3	1	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
4	1	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
6	1	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
7	1	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
8	1	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
9	1	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
10	1	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
11	2	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
12	2	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
13	2	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
14	2	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
15	2	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
16	2	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
17	2	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
18	2	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
19	2	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:
20	2	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:	HI:

Anexo 3: *Evidencia fotográfica de las fases de obtención de los principios activos antraquinónicos*



Selección de la materia prima: *Dactylopius coccus*



Extracto de grana cochinilla

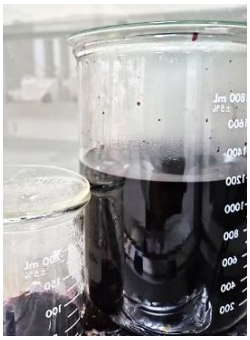


Filtrado del precipitado de AC

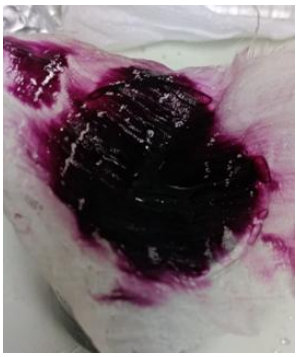


Almacenamiento hermético de la forma seca del precipitado del AC

Figura 7. Fases consecutivas del aislamiento, purificación y modificación estructural de las antraquinonas puras.



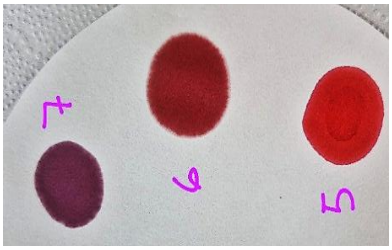
Elaboración del ácido 4 aminocarmínico



Filtrado de precipitado del ácido 4-aminocarminico



Forma final del AC y 4-AC en polvo y su forma en solución



D) Neutralización del AC a pH 7.0

ANEXO 4: Certificación y trazabilidad biológica de las cepas de referencia.

Microbiologics

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

SPECIFICATIONS:	RELEASE INFORMATION:
Product Name: Streptococcus mutans	**Quality Control Technologist:** Jacob A Lohman
Catalog Number: 0266	**Release Date:** 2024/07/18
Lot Number: 266-39**	
Reference Number: ATCC® 25175™*	
Passage from Reference: 2	
Expiration Date: 2026/06/30	

Performance

Macroscopic Features:	**Medium:**
Two colony types; small, circular, dome shaped, entire edge, white and the other is small, circular and translucent.	SBAP
Microscopic Features:	**Method:**
Small gram positive cocci to ovoid cells occurring singly, in pairs and predominately in chains	Gram Stain (1)

ID System: MALDI-TOF (1)

See attached ID System results document.

Other Features/ Challenges: Results

(1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative

Amanda Kuperus
Director of Quality Control
AUTHORIZED SIGNATURE

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.

ACCREDITED
TESTING CERT #2655.01

ATCC Licensed Derivative

(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

ACCREDITED
REFERENCE MATERIAL PRODUCER
CERT #2655.02

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results

Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	Green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	Yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	Red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	**High consistency:** The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a highconfidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	**Low consistency:** The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	**No consistency:** The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2024-07-18T14:36:19.005 JAL

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
H9 (+++) (A)	266-39	Streptococcus mutans	2.29

Comments:

N/A

Microbiologics

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

SPECIFICATIONS:	RELEASE INFORMATION:
Product Name: Porphyromonas gingivalis	**Quality Control Technologist:** Elie V Weinert
Catalog Number: 0912	**Release Date:** 2024/06/03
Lot Number: 912-78**	
Reference Number: ATCC® 33277™*	
Passage from Reference: 3	
Expiration Date: 2026/04/30	

Performance

Macroscopic Features:	**Medium:**
Small, circular, transparent colonies that become brown with age.	A/R SBAP
Microscopic Features:	**Method:**
Gram negative rod, pleomorphic bacillary to coccoid forms.	Gram Stain (1)

ID System: MALDI-TOF (1)

See attached ID System results document.

Amanda Kuperus
Director of Quality Control
AUTHORIZED SIGNATURE

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.

ACCREDITED
TESTING CERT #2655.01

ATCC Licensed Derivative®

(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

ACCREDITED
REFERENCE MATERIAL PRODUCER
CERT #2655.02

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results

Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	Green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	Yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	Red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	**High consistency:** The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a highconfidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	**Low consistency:** The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	**No consistency:** The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2024-05-28T12:05:09.736 dpa

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
G9 (+++) (A)	912-78	Porphyromonas gingivalis	2.30

Comments:

N/A

Anexo 5: Análisis estadístico de validación de supuestos (spss v.26) pruebas de normalidad e igualdad de varianzas.

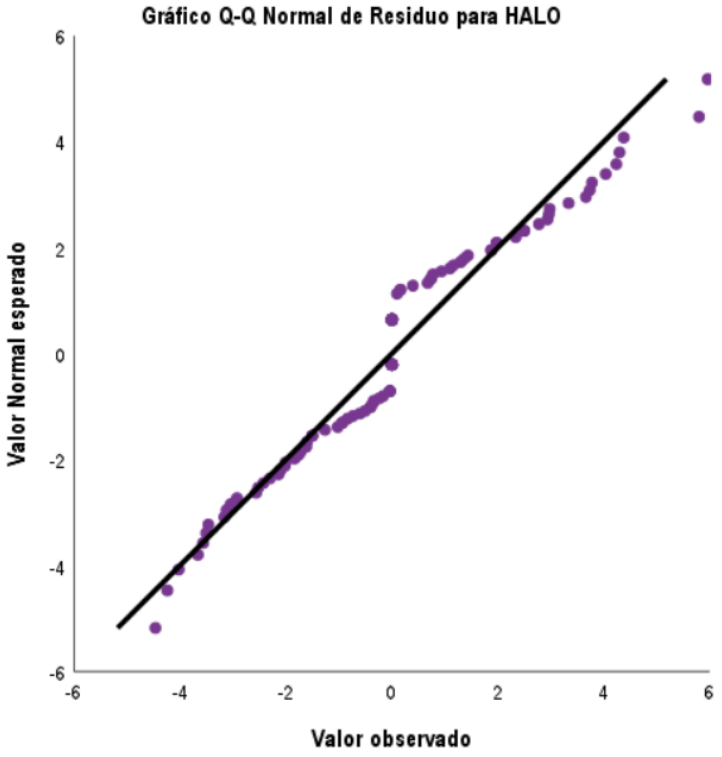
Para la aplicación de la estadística paramétrica mediante la prueba de ANOVA de un factor, se procedió a evaluar los supuestos fundamentales de distribución normal y homogeneidad de varianzas en los datos obtenidos de los diámetros de los halos de inhibición neta.

Tabla 10. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los halos de inhibición neta según especie bacteriana y método de difusión.

Microorganismo y método	Grupos de estudio	Estadístico	Gl	Valor p
Porphyromonas gingivalis Difusión en pocillo	G1: Control positivo	0.888	10	0.159
	G2: Control negativo	—	10	—
	G3: AC puro *20 %*	0.910	10	0.281
	G4: 4AC puro *20 %*	0.940	10	0.557
	G5: NLC-AC *0,2 %*	0.930	10	0.447
	G6: NLC-4AC *0,2 %*	—	10	—
Porphyromonas gingivalis Goteo superficial	G1: Control positivo	0.926	10	0.406
	G2: Control negativo	—	10	—
	G3: AC puro *20 %*	0.936	10	0.507
	G4: 4AC puro *20 %*	0.964	10	0.826
	G5: NLC-AC *0,2 %*	0.842	10	0.047
	G6: NLC-4AC *0,2 %*	—	10	—
Streptococcus mutans Difusión en pocillo	G1: Control positivo	0.940	10	0.557
	G2: Control negativo	—	10	—
	G3: AC puro *20 %*	0.905	10	0.249
	G4: 4AC puro *20 %*	—	10	—
	G5: NLC-AC *0,2 %*	—	10	—
	G6: NLC-4AC *0,2 %*	—	10	—
Streptococcus mutans Goteo superficial	G1: Control positivo	0.933	10	0.478
	G2: Control negativo	—	10	—
	G3: AC puro *20 %*	0.935	10	0.494
	G4: 4AC puro *20 %*	—	10	—
	G5: NLC-AC *0,2 %*	—	10	—
	G6: NLC-4-AC *0,2 %*	—	10	—

gl: Grados de libertad; AC: Ácido carmínico; 4-AC: Ácido 4-aminocarmínico; NLC: Portadores lipídicos nanoestructurados. (—). Nota: Se excluyen del cálculo matemático de la prueba de Shapiro-Wilk los grupos G2, G4 (para *S. mutans*) y G6

en ambas cepas, debido a que registraron valores constantes absolutos equivalentes a 0.00 mm (varianza cero)



La prueba de Shapiro-Wilk ($n = 10$) indicó que los grupos con respuesta biológica activa presentaron valores de significancia estadística superiores al nivel alfa crítico ($p > 0.05$). Este resultado confirmó que los diámetros de los halos netos siguieron una distribución normal (Gaussiana). La fluctuación marginal registrada en el grupo G5 bajo goteo superficial frente a *Porphyromonas gingivalis* ($p = 0.047$) fue validada mediante el diaGrama de probabilidad normal Q-Q Plot, el cual evidenció la alineación de los residuos sobre la diagonal teórica. Habiéndose cumplido el supuesto de normalidad y amparados en el Teorema del Límite Central, se justificó la aplicación del Análisis de Varianza (ANOVA). Los grupos con varianza cero (0.00 mm) se integraron como una condición matemática prevista del diseño experimental.

Tabla 11. Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene para los grupos de tratamiento evaluados en *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*.

Microorganismo objetivo	Técnica de difusión	Estadístico de Levene (Basado en la media)	gl1	gl2	Valor p (Sig.)
Porphyromonas gingivalis ATCC® 33277	Difusión en pocillo	8.628	5	54	< 0.001
	Goteo superficial	9.045	5	54	< 0.001
Streptococcus mutans ATCC® 25175	Difusión en pocillo	19.952	5	54	< 0.001
	Goteo superficial	14.478	5	54	< 0.001

Nota: gl: Grados de libertad (gl1: entre grupos; gl2: dentro de grupos).

La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene basada en la media reportó un valor de significancia estadística marcadamente heterogéneo ($p < 0.001$) para ambas cepas bacterianas. Esta asimetría fue un fenómeno previsto y condicionado metodológicamente por la presencia de múltiples grupos refractarios con varianza cero absolutas (0.00 mm).

Debido al equilibrio estricto en el tamaño de las réplicas por grupo ($n = 10$), la robustez del modelo ANOVA de un factor permaneció vigente e inalterada para la determinación de las diferencias significativas globales.

ANEXO 6: Evidencia fotográfica del procedimiento

A. Registro de la evaluación microbiológica frente a *P. gingivalis* mediante técnicas en pocillo (Deep well) y goteo (drope plate).

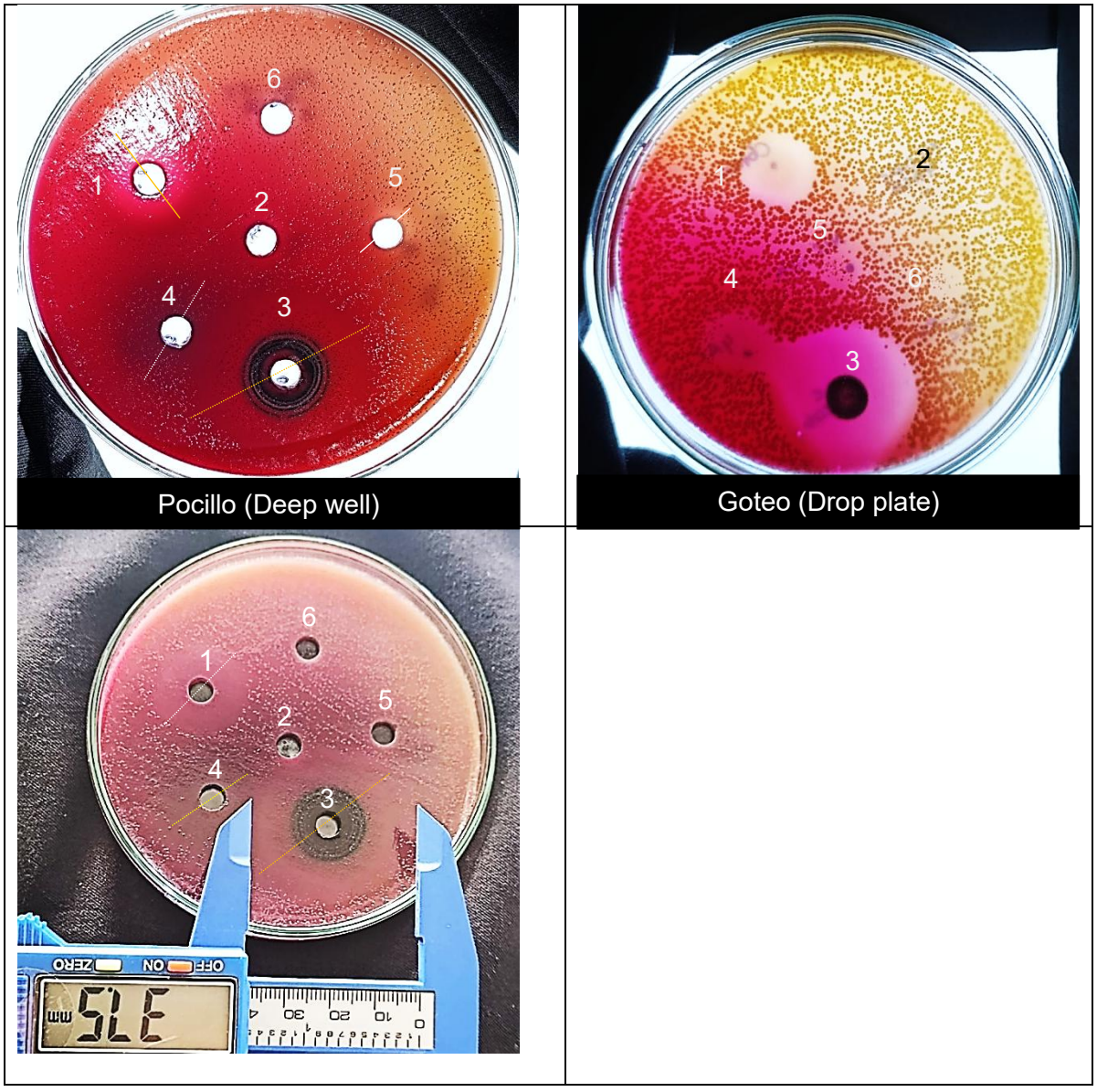


Figura 8. Actividad antimicrobiana sobre *P. gingivalis*.

A la izquierda el método por pocillo (Deep well), a la derecha el método por goteo (Drop plate). Los grupos enumerados **G1**: control positivo; **G2:** Control negativo; **G3**: AC libre al *20 %*; **G4:** 4-AC libre al *20 %*; **G5:** NLC-AC al *0,2 %*; **G6**: NLC-4-AC al *0,2 %*.

B. Registro de la evaluación microbiológica frente a *S. mutans* mediante técnicas de pocillo (Deep Well) y goteo (Drope plate).

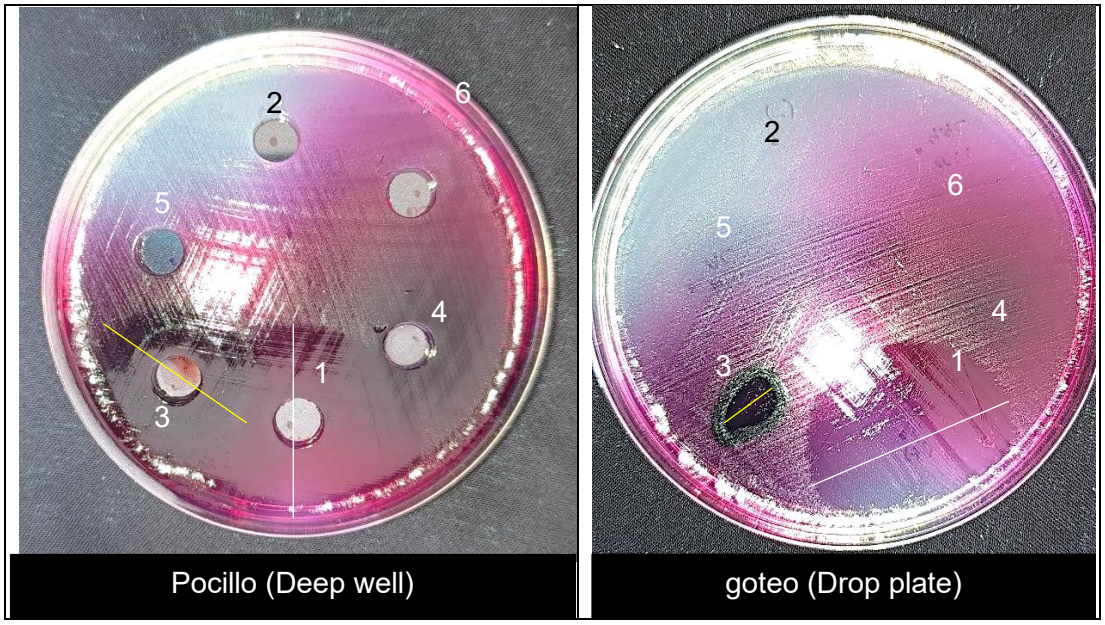


Figura 9. Actividad antimicrobiana sobre *S. mutans*.

A la izquierda el método por pocillo (Deep well), a la derecha el método por goteo (Drop plate). Los grupos enumerados G1: Control positivo; **G2:** Control negativo; **G3:** AC libre al *20 %*; **G4**: 4-AC libre al *20 %*; **G5**: NLC-AC al *0,2 %*; **G6:** NLC-4-AC al *0,2 %*.

ANEXO 7: Constancia de uso de laboratorios o guía de fabricación de las NLC

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207 Telefax: 1209, 1218
Ciudad Universitaria – Av. Venezuela s/n – Lima 1

CONSTANCIA DE FORMULACIÓN EXPERIMENTAL

Por la presente, se deja constancia de que los sistemas coloidales denominados Portadores Lipídicos Nanoestructurados (NLC), utilizados en el presente trabajo de investigación para la evaluación antimicrobiana in vitro, fueron desarrollados, optimizados y sintetizados en las instalaciones del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Química Orgánica (LIDQO) de la Facultad de Química de la UNMSM, durante el periodo de abril de 2026.

La manufactura de las plataformas coloidales se ejecutó bajo la dirección técnica de Bach. Jonathan Eleazar Castro Gutiérrez / Químico, en estrecha colaboración y co-diseño con el/la investigador(a) de la tesis, garantizando el estricto cumplimiento de los siguientes criterios experimentales y de control de calidad:

1. Componentes de la Matriz Grasa: Incorporación de cera de abeja como lípido sólido y aceite de sacha inchi como lípido líquido, estabilizados mediante un tensioactivo (lecitina de soya).
2. Estandarización del pH: Ajuste intencional y estabilización potenciométrica de las fórmulas finales a un pH neutro de 7.0, con el fin de asegurar la compatibilidad biológica mineral salival.
3. Optimización de Carga: Fijación del límite crítico de carga del principio activo (ácido carmínico y ácido 4-aminocarmínico) al 6% en fase lipídica fundida para prevenir fenómenos de agregación molecular, obteniendo una concentración final diluida del 0,2% en la dispersión coloidal.
4. Filtración Crítica: Filtrado de las muestras a través de membranas de celulosa de 0,45 micrómetros para la remoción absoluta de macroprecipitados y agregados lipídicos residuales, asegurando la homogeneidad nanométrica del vehículo.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines de transparencia metodológica, validez instrumental y archivo en los anexos del manuscrito de tesis.

Lima, 27 de mayo de 2026.

Dr. Julio Cesar Santiago Contreras
Responsable de LIDQO
Departamento de Química Orgánica
Facultad de Química e Ing. Química
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Email: jsantiagoc@unmsm.edu.pe