



Facultad de Ciencias de la Salud

Tema:

Análisis microbiológico de la formación de biofilm en membranas de colágeno y sintéticas reabsorbibles, empleadas en regeneración ósea guiada.

Trabajo de Titulación para la obtención del Título de cirujano oral

Presentada por:

Jimmy Humberto Zambrano Sánchez

Tutor:

Boris Hernán Villacrés Granda

Quito, agosto de 2026

Declaración De Aceptación De Norma Ética Y Derechos

El presente documento se ciñe a las normas éticas y reglamentarias de la Universidad Hemisferios. Así, declaro que lo contenido en este ha sido redactado con entera sujeción al respeto de los derechos de autor, citando adecuadamente las fuentes. Por tal motivo, autorizo a la Biblioteca a que haga pública su disponibilidad para lectura dentro de la institución, a la vez que autorizo el uso comercial de mi obra a la Universidad Hemisferios, siempre y cuando se me reconozca el cuarenta por ciento (40%) de los beneficios económicos resultantes de esta explotación.

Además, me comprometo a hacer constar, por todos los medios de publicación, difusión y distribución, que mi obra fue producida en el ámbito académico de la Universidad Hemisferios.

De comprobarse que no cumplí con las estipulaciones éticas, incurriendo en caso de plagio, me someto a las determinaciones que la propia Universidad plante.

Firma del estudiante

Nombres completos: Jimmy Humberto Zambrano Sánchez

C.I.: 1205703174

Dedicatoria

Dedico este trabajo a todas las personas que han sido parte de mi camino académico y personal. A mi familia, por su apoyo incondicional, sus palabras de aliento y su paciencia en cada etapa de este proceso. A mis amigos, por acompañarme en los momentos de alegría y también en los de dificultad, brindándome siempre motivación para seguir adelante.

Índice

Declaración De Aceptación De Norma Ética Y Derechos	2
Dedicatoria.....	3
Índice.....	4
Índice de Tablas	5
Índice de Figuras.....	7
Resumen.....	8
Abstract	9
Introducción	10
Metodología	16
Análisis y Recolección de Datos.....	24
Hallazgos.....	25
Discusión.....	46
Conclusión	49
Referencias.....	50
Anexos	56

Índice de Tablas

Tabla 1 Grupos de estudio establecidos según el tipo de membrana empleada (Lumina Coat y Duosynt), características de composición, tratamiento con clorhexidina, codificación y tamaño muestral.....	17
Tabla 2 Cuadro de nomenclatura y abreviaturas utilizadas durante el desarrollo del proyecto....	18
Tabla 3 Establecimiento de grupos experimentales de estudio, de acuerdo con el tipo de membrana empleado y el tratamiento con clorhexidina.	25
Tabla 4 Resumen de medias y desviaciones estándar de los ensayos de cristal violeta, sales de tetrazolio y recuento de unidades formadoras de colonias, por grupo de estudio.	27
Tabla 5 Porcentaje de reducción relativa de microorganismos adheridos a membranas de colágeno Lumina Coat y sintéticas Duosynt, asociado al efecto de la clorhexidina por tipo de ensayo.	31
Tabla 6 Medias con desviación estándar de biofilms adheridos sobre membranas de colágeno Lumina Coat y Sintéticas Duosynt, de los ensayos de tinción con cristal violeta (CV), sales de tetrazolio (XTT) y recuentos microbiológicos (UFC/ml).	33
Tabla 7 ANOVA factorial 2x2 de la influencia del tipo de material de la membrana, el efecto de la clorhexidina y la interacción material/clorhexidina según los ensayos de tinción con cristal violeta, sales de tetrazolio y recuento de UFC/ml.	35
Tabla 8 Prueba de Tukey HSD del ensayo de cristal violeta (CV) para la evaluación de la capacidad de formación de biofilms mixtos de <i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i> sobre membranas de colágeno Lumina Coat y sintética Duosynt.	37
Tabla 9 Prueba de Tukey HSD del ensayo de sales de tetrazolio (XTT) para la evaluación de la capacidad de formación de biofilms mixtos de <i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i> sobre membranas de colágeno Lumina Coat y sintética Duosynt.	38

Tabla 10 Prueba de Tukey HSD del ensayo de recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), para la evaluación de la capacidad de formación de biofilms mixtos de <i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i> sobre membranas de colágeno Lumina Coat y sintética Duosynt.	39
Tabla 11 Welch con ajuste de Holm para evaluar efectos del tipo de material de las membranas y la influencia de la clorhexidina sobre el crecimiento de biofilms mixtos, según los ensayos de cristal violeta (CV), sales de tetrazolio (XTT) y recuentos microbianos (UFC/ml).....	40
Tabla 12 Welch y Mann-Whitney con ajuste de Holm y estimación de g de Hedges para evaluar el efecto del material de las membranas y el efecto de clorhexidina sobre el crecimiento de biofilms mixtos, según los ensayos de cristal violeta (CV), sales de tetrazolio (XTT) y recuentos microbianos (UFC/ml).....	42

Índice de Figuras

Figura 1 Matriz de corte de precisión y procesamiento de membranas para estudios microbiológicos.....	20
Figura 2 Estadística descriptiva general del análisis microbiológico de la formación de biofilm mixto de <i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i> , sobre membranas de colágeno Lumina Coat y sintéticas Duosynt, con y sin tratamiento de clorhexidina.	26
Figura 3 Efecto de la clorhexidina en la reducción del biofilm adherido a las membranas de colágeno Lumina Coat y sintéticas Duosynt, según los ensayos de tinción con cristal violeta, sales de tetrazolio y recuento de UFC/ml.	28
Figura 4 Ensayo para la formación de biofilms mixtos de <i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i> sobre membranas de colágeno Lumina Coat y sintéticas Duosynt, con tratamiento de clorhexidina vs sin tratamiento de clorhexidina, antes y después del tiempo de incubación.....	29
Figura 5 Porcentaje de reducción relativa de microorganismos adheridos a membranas de colágeno Lumina Coat y sintéticas Duosynt, asociado al efecto de la clorhexidina por tipo de ensayo.	32
Figura 6 Gráficos de interacción con intervalos de confianza, entre las membranas de colágeno Lumina Coat y sintética Duosynt y el efecto antimicrobiano de la clorhexidina, según los ensayos de tinción de cristal violeta, sales de tetrazolio y recuento de UFC/ml.	44

Análisis microbiológico de la formación de biofilm en membranas de colágeno y sintéticas reabsorbibles, empleadas en regeneración ósea guiada.

Jimmy Humberto Zambrano Sánchez

Universidad Hemisferios

jhzambranos@estudiantes.uhemisferios.edu.ec

Resumen

Introducción: La exposición de las membranas reabsorbibles utilizadas en cirugías de regeneración ósea guiada (ROG) al entorno bucal, ocasiona un alto riesgo de fracaso ante la posibilidad de contaminación microbiológica, generando infecciones y pérdida del injerto colocado. **Objetivo:** Evaluar el crecimiento microbiológico que se genera sobre membranas de colágeno Lumina Coat y sintéticas Duosynt reabsorbibles, empleadas en ROG, cargadas previamente con clorhexidina, mediante pruebas microbiológicas. **Materiales y métodos:** El estudio fue observacional, experimental e *in vitro*. Se analizó el crecimiento microbiológico a través de tinción con cristal violeta (CV) y sales de tetrazolio (XTT) mediante espectrofotometría y recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml), de un biofilm mixto compuesto de *Candida albicans* (ATCC 29212) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 10231) (ATCC 10231), sobre membranas Lumina Coat y Duosynt. **Resultados:** Los ensayos de tinción con CV, cuantificación en UFC/ml y prueba XTT mostraron resultados consistentes, evidenciando una reducción significativa del biofilm y de microorganismos en las membranas tratadas con clorhexidina en comparación con las no tratadas. En el caso de la membrana sintética, el ensayo XTT presentó una leve variación debido a la retención interna del reactivo; sin embargo, los resultados generales se mantuvieron concordantes entre las pruebas. **Conclusión:** El tratamiento previo con

clorhexidina al 0,0015% reduce la formación de biofilm y la cantidad de microorganismos adheridos en membranas de colágeno y sintéticas reabsorbibles.

Palabras Clave: Membranas artificiales, Regeneración ósea guiada, Biopelículas, Clorhexidina, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*

Abstract

Introduction: The exposure of resorbable membranes used in guided bone regeneration (ROG) surgeries to the oral environment poses a high risk of failure due to potential microbiological contamination, leading to infections and loss of the graft material. **Aim:** To evaluate the microbiological growth on Lumina Coat collagen membranes and synthetic Duosynt resorbable membranes used in ROG, previously loaded with chlorhexidine, through microbiological tests. **Materials and Methods:** This was an observational, experimental, in vitro study. Microbiological growth was analyzed using crystal violet (CV) staining and tetrazolium salts (XTT) through spectrophotometry, as well as colony-forming unit counts (CFU/ml), of a mixed biofilm composed of *Candida albicans* (ATCC 29212) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 10231), on Lumina Coat and Duosynt membranes. **Results:** The CV staining, CFU/ml quantification, and XTT assay showed consistent results, demonstrating a significant reduction in biofilm and microorganisms on membranes treated with chlorhexidine compared to untreated ones. In the case of the synthetic membrane, the XTT assay showed slight variation due to internal retention of the reagent; however, the overall results remained consistent across tests. **Conclusion:** Pre-treatment with 0.0015% chlorhexidine reduces biofilm formation and the number of microorganisms adhered to collagen and synthetic resorbable membranes. **Keywords:** Artificial membranes, Guided bone regeneration, Biofilms, Chlorhexidine, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*

Introducción

El uso de membranas de barrera para bloquear el crecimiento de tejido blando dentro de los injertos óseos, es una estrategia estándar que se ha empleado con éxito en la práctica clínica (Ren et al., 2022; Z. Yang et al., 2022). Desarrolladas en la década de 1970, pero empleadas con mayor recurrencia tras varios estudios una década después (Lang et al., 1994).

Estos dispositivos médicos siguen siendo empleados hoy en día junto a injertos óseos para mantener la altura del reborde alveolar o aumentar el volumen óseo como tratamiento previo a la colocación de implantes dentales (Kim et al., 2023; Kunrath et al., 2025; Popowski et al., 2025).

Comúnmente se clasifican en dos grandes categorías, no reabsorbibles, como las de politetrafluoroetileno denso o expandido (d-PTFE o e-PTFE), mallas de titanio y membranas de PTFE reforzadas titanio (Naung et al., 2019; Soldatos et al., 2017). Cuya principal ventaja es su estabilidad mecánica a largo plazo, pero su principal desventaja es que deben ser removidas mediante una intervención quirúrgica secundaria (Kunrath et al., 2025).

Por otro lado, se encuentran las membranas reabsorbibles que se han utilizado ampliamente para la regeneración ósea guiada (ROG), debido a su buena biocompatibilidad y la capacidad de integrarse con los tejidos sin necesidad de una segunda cirugía para retirarlas (Naung et al., 2019; Shi et al., 2023).

Las membranas reabsorbibles se diseñan a partir de materiales naturales como colágeno, quitosano o gelatina que puede tener diferentes orígenes (Gao et al., 2022; Ma et al., 2016). También están las sintéticas que basan su estructura en poliéster alifático como el poliláctico (PLA) o también el poliglicólico (PGA) (Soldatos et al., 2017). La estructura de las membranas puede presentar diferentes características tanto en sus dimensiones como en su composición, lo

que incide en la estabilidad y en el tiempo de degradación (Barrino et al., 2024). Debiéndose considerar estas cualidades para la selección de una determinada membrana por la localización y tamaño del defecto óseo a tratar (Sbricoli et al., 2020).

Estas membranas son empleadas en diversos ámbitos quirúrgicos como la corrección de defectos y preservación ósea, tanto en los maxilares como en mandíbula (Verboket et al., 2024). Además, favorecen la formación de hueso nuevo en el sitio quirúrgico (Allan et al., 2021; Barrino et al., 2024), y se emplean en regeneración de tejidos con la combinación de factores de crecimiento (Takayama et al., 2023). Su empleo está bien documentado en procedimientos de aumento óseo previo o simultáneo a la colocación de implantes dentales, mostrando resultados clínicos y radiográficos congruentes (Buser et al., 2023).

En la práctica clínica, la cicatrización adecuada del lecho quirúrgico después de la cirugía regenerativa es un aspecto esencial para poder señalar el éxito clínico (Roccuzzo et al., 2023; Susin et al., 2015). En el caso de las membranas de colágeno, la degradación rápida, la baja resistencia mecánica y la deficiente función de barrera en casos donde el defecto es demasiado extenso, son los principales desafíos que deben de sobrellevarse (Vallecillo et al., 2024).

Entre las complicaciones clínicas con mayor frecuencia están la dehiscencia de la herida, la exposición de la membrana a la cavidad oral, la colonización microbiana de la membrana y posterior infección, poniendo en peligro el proceso regenerativo (De Sanctis et al., 1996; Urban & Monje, 2019). El riesgo de fracaso es debido a que la respuesta inflamatoria causada por la invasión de patógenos orales puede inhibir el crecimiento de los osteoblastos (D. Yang et al., 2025).

De la misma manera, la exposición de la membrana al entorno oral después de cirugías de ROG, influye entonces perjudicialmente en el resultado del aumento de volumen óseo (Garcia et

al., 2018), debido a la facilidad de contaminación y la formación de biopelículas sobre las membranas (Abdo et al., 2023).

Para el manejo de estas complicaciones, las medidas terapéuticas a elegir pueden variar, iniciando por aplicaciones tópicas de antisépticos, hasta finalmente la remoción de la membrana de barrera con el injerto óseo (Sanz et al., 2022).

La estructura porosa y composición de las membranas también pueden favorecer la adhesión y proliferación de patógenos (Abdo et al., 2023; Slutzkey et al., 2015), sumado a la producción bacteriana de collagenasas y proteasas específicas que degradan la membrana, dan como resultado la infección del injerto (Sela et al., 2003). En estudios anteriores, se ha comparado la contaminación microbiana de membranas de politetrafluoroetileno expandido, de colágeno y de ácido poliláctico en casos de exposición, concluyendo que en todas existió la presencia de al menos once tipos de patógenos periodontales (Mombelli et al., 1993).

Los microorganismos involucrados en estas infecciones, con mayor frecuencia son bacterias periodontopatógenas y comensales orales, con un rango de incidencia alto (Abdo et al., 2023; Takallu et al., 2024). El proceso de colonización de estos microorganismos es facilitado por las bajas propiedades antimicrobianas de la membrana e incluso puede tener origen debido a la interacción entre membrana y los microorganismos (Slutzkey et al., 2015).

De acuerdo a varios estudios, los géneros bacterianos más frecuentes son los *Streptococcus*, especialmente los pertenecientes al grupo *viridans*, *Staphylococcus*, incluyendo *S. aureus*, especies de *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Veillonella* y *Porphyromonas gingivalis* (Carreño et al., 2016); seguidos en menor medida por *Enterococcus faecalis*, cuya relevancia radica en su resistencia a tratamientos antimicrobianos habituales y su alta capacidad de formación de biofilms por su afinidad de unión al colágeno (Zelikman et al., 2022).

Otro patógeno a tomar en cuenta es la *Candida albicans*, por su alta capacidad de adhesión y creación de biofilms, especialmente sobre superficies rugosas presentes en diversos biomateriales usados en odontología y cirugía oral (Nobile & Johnson, 2015; Pierce et al., 2010). Debido a que al transformarse a hifas prestan una superficie de adhesión mayor para las bacterias especialmente para las de baja demanda de oxígeno (Rapala et al., 2023).

Existen investigaciones donde se concluye que *C. albicans* y *E. faecalis* actúan de manera sinérgica sobre la mucosa oral, aumentando la invasión tisular de forma conjunta, modificando la expresión genética de *C. albicans* hacia una mayor virulencia y adhesión (Krishnamoorthy et al., 2020).

En investigaciones y experimentación clínica respecto a la contaminación de las membranas, varios tipos de controles y métodos de análisis pueden ser empleados (Abdo et al., 2023; Toledano, Manzano, et al., 2021); por ejemplo, el cultivo bacteriano y recuento de unidades formadoras de colonias o UFC, que sirve para identificar y cuantificar la carga microbiológica de la membrana (Slutzkey et al., 2015; Weitkamp et al., 2024).

También se cuenta con la microscopía electrónica de barrido o SEM, para observar directamente las biopelículas en la superficie de las membranas y los tipos de patógenos adheridos, detallando morfología celular e integridad de la membrana (Lazarevic et al., 2023; Weitkamp et al., 2024).

Las pruebas espectrofotométricas, que monitorizan el crecimiento bacteriano midiendo la turbidez de las muestras obtenidas en función de la concentración, permiten evaluar la capacidad de la membrana para inhibir o favorecer el crecimiento bacteriano o fúngico (Slutzkey et al., 2015). Análisis moleculares, utilizados con menor frecuencia, como la PCR, también pueden ser útiles para identificar especies de microorganismos en las membranas (Abdo et al., 2023).

Por otro lado, los ensayos de degradación enzimática se pueden realizar para evaluar la degradación de la membrana mediada por enzimas bacterianas, verificando indirectamente la colonización y la actividad microbiológica relacionada con la integridad del biomaterial (Sela et al., 2003).

Si bien no existe un consenso definitivo en la práctica clínica, la literatura indica que la colonización de la membrana es uno de los parámetros críticos para evaluar el éxito en la ROG, especialmente en la exposición al medio oral (Lazarevic et al., 2023; Sela et al., 2003; Weitkamp et al., 2024).

Para reducir el riesgo de infección, existen varias estrategias aplicadas como los pretratamientos de las membranas, en caso de exposición a la cavidad oral; varias de ellas incorporan agentes antimicrobianos o modificaciones fisicoquímicas de la membrana (Toledano et al., 2022; Toledano, Vallecillo, et al., 2021).

Una alternativa es la incorporación de nanopartículas de plata en la membrana, que muestra actividad antibacteriana suficiente contra patógenos periodontales y buena biocompatibilidad con los tejidos, sin ser tóxico para los fibroblastos gingivales (Takallu et al., 2024).

Otra opción es la carga de antibióticos, como tetraciclina o minociclina sobre la membrana, asegurando la liberación prolongada del antibiótico (Toledano et al., 2022). También existe la alternativa de incorporar agentes antimicrobianos no antibióticos, como el quitosano, quitosano con hidroxiapatita, zinc, clorhexidina y ácido láurico, que expresan una buena actividad antimicrobiana y disminución del proceso inflamatorio (Barreras et al., 2016; Lazarevic et al., 2023). Llegando a reducir la formación de biofilms sobre la membrana, minimizando el riesgo de fracaso en la ROG (Adamuz et al., 2024).

Respecto a la clorhexidina, su tiempo de permanencia en las membranas depende de su aplicación y el entorno de uso, las nanopartículas de clorhexidina sobre el colágeno han demostrado una liberación sostenida, a diferencia de cuando se administra en su forma activa (Sanz et al., 2022).

En el caso de la aplicación de digluconato de clorhexidina en forma de solución, las enzimas metaloproteinasas de matriz, inhiben significativamente la degradación durante las primeras 24 horas, disminuyendo con el paso del tiempo, a menos que el colágeno sea activado con sistemas autograbantes, lo que extiende el tiempo hasta tres semanas (Osorio et al., 2011). Se ha demostrado que concentraciones altas de clorhexidina tiene un efecto citotóxico para células periodontales, epiteliales gingivales y fibroblastos, observándose que una concentración optima a emplear es de 15 $\mu\text{g/ml}$ lo que equivale al 0,0015 % (Chen et al., 2003).

En cuanto al tratamiento de la infección de membranas usadas en ROG, el manejo suele ser quirúrgico para retirar todo el injerto, sin embargo, hay opciones no quirúrgicas que pueden abordarse en situaciones selectas, pero la evidencia clínica directa es escasa (Abdo et al., 2023; Sanz et al., 2022).

En virtud de lo señalado, el objetivo de esta investigación fue analizar el crecimiento de biofilms sobre membranas de colágeno y sintéticas reabsorbibles empleadas en ROG, cargadas previamente con clorhexidina, mediante pruebas microbiológicas. Así, se determinó la eficacia del tratamiento con clorhexidina y su correlación con la viabilidad de los microorganismos.

Metodología

El presente estudio es de tipo observacional y experimental, *in vitro*, en el que se analizó el crecimiento microbiológico sobre membranas de colágeno y sintéticas reabsorbibles, su inhibición mediante la aplicación de clorhexidina al 0,0015% para mejorar su capacidad antimicrobiana versus otras membranas del mismo tipo, pero sin tratar, al final de la investigación se analizaron un total de 372 muestras.

Se utilizaron membranas reabsorbibles de colágeno de matriz ósea bovina desmineralizada, Lumina Coat de marca Criteria Biomateriais y membranas reabsorbibles sintéticas a base de polímeros sintéticos (policarbonato de trimetileno y ácido poliláctico-co-glicólico), Duosynt de la marca FGM, ambas de fabricación brasileña. Además, como patógenos orales se incluyeron *Candida albicans* (ATCC 29212) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 10231).

No se incluyeron en este estudio membranas de origen sintético no reabsorbibles, membranas de origen humano, membranas reabsorbibles de origen animal de otras marcas comerciales, tampoco se consideró otras bacterias residentes de la cavidad oral.

Las membranas fueron seccionadas de forma estéril mediante el uso de un dispositivo de corte diseñado para el efecto, se sometieron a colonización por *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* y fueron cultivadas en microplacas estériles de 96 pocillos de fondo plano (Nest Biotechnology, China).

Se establecieron cuatro grupos de estudio, debido a los tratamientos propuestos para las membranas, de la siguiente manera, Grupo 1 membranas de colágeno con tratamiento de clorhexidina; Grupo 2 membranas sintéticas con tratamiento de clorhexidina; Grupo 3 membranas de colágeno sin tratamiento de clorhexidina; Grupo 4 membranas sintéticas sin tratamiento de clorhexidina (Tabla 1 y 2).

De cada uno de estos grupos de estudio se realizaron 90 repeticiones, desarrollando un total de 360 muestras por los 4 grupos, sobre este total se realizaron tres ensayos diferentes para el análisis del biofilm adherido, de tal forma que 120 muestras recibieron tinción con cristal violeta (CV), 120 muestras con tinción con sales de tetrazolio (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) o (XTT) y 120 muestras se usaron para el recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), adicional se incluyeron controles positivos y negativos, generando un total de 372 muestras examinadas.

Las muestras de los ensayos de tinción con CV y XTT se analizaron en un espectrofotómetro marca Agilent, modelo: Epoch2ns, serie: 24092318.

Tabla 1

Grupos de estudio establecidos según el tipo de membrana empleada (Lumina Coat y Duosynt), características de composición, tratamiento con clorhexidina, codificación y tamaño muestral

Grupos	Membrana	Composición	Casa comercial	Tratamiento con clorhexidina	Código	n
Grupo "1"	Lumina Coat	Colágeno tipo I de matriz ósea bovina desmineralizada	Criteria Biomateriais (Brasil)	SI	L/CHX +	90
Grupo "2"	Duosynt	Sintéticas a base de polímeros PTMC Y PLGA	FGM (Brasil)	SI	D/CHX +	90

Grupo “3”	Lumina	Colágeno tipo I de	Criteria		L/CHX	
	Coat	matriz ósea bovina	Biomateriais	NO	-	90
		desmineralizada	(Brasil)			
Grupo “4”		Sintéticas a base de			D/CHX	
	Duosynt	polímeros PTMC Y	FGM (Brasil)	NO	-	90
		PLGA				

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2

Cuadro de nomenclatura y abreviaturas utilizadas durante el desarrollo del proyecto

	Nomenclatura	Cod.
Membranas	Colágeno	Cg
	Sintética	St
Patógenos	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ef
	<i>Cándida albicans</i>	Ca
Tinción	Cristal Violeta	CV
	Sal de tetrazolio	XTT
Clorhexidina	Con clorhexidina	CHX +
	Sin clorhexidina	CHX -
Viabilidad celular	Unidades formadoras	UFC / ml
	de colonias	
Controles	Positivo	N+
	Negativo	N-

Fuente: Elaboración propia.

Se diseñó una matriz de corte con precisión milimétrica, con la finalidad de realizar cortes a la membrana lo más preciso posible y evitar alteraciones en los resultados debido a la mala segmentación de las membranas (Figura 1).

Esta matriz se compone en su totalidad de acero inoxidable 304 de grado alimenticio, esterilizable, y consta de dos placas de 100 x 100 x 5 mm cada una y un par de tuercas de sujeción.

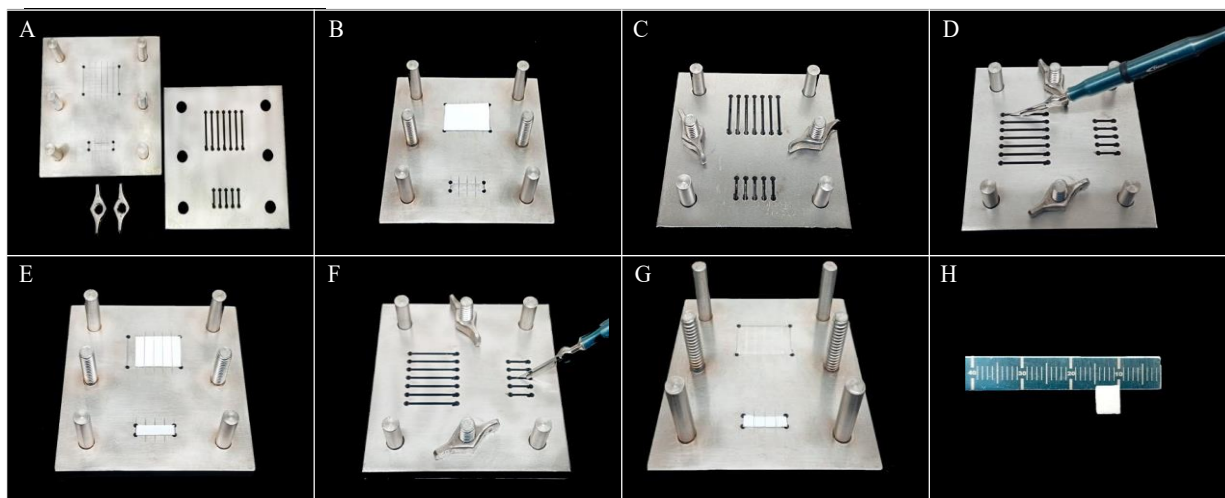
La placa superior o guía, dispone de varias perforaciones lineales, diseñadas para deslizar las hojas de bisturí y cortar las membranas sobre la placa base. También se implementaron 6 perforaciones circulares, ubicadas 3 a cada costado de la placa, para recibir los seis pilares que son parte de la estructura de la placa base.

Las perforaciones lineales se dividen en dos grupos, que coinciden sobre dos celdillas en bajo relieve que forman parte de la placa base, estas perforaciones tienen de un grosor de 0,5 mm para recibir una hoja de bisturí N.º 15, cuyo grosor estándar es de 0,4 mm, dejando así un espacio para el paso del bisturí sin fricción ni atascamientos. El primer grupo de perforaciones lineales permite seccionar las membranas en tirillas y el segundo grupo contribuye a hacer el seccionamiento final de las membranas en porciones de 5 x 5 mm.

La placa inferior o base, consta de dos celdillas en bajo relieve donde se insertan las membranas para ser procesadas, cuatro pilares estabilizadores en las esquinas para el asentamiento de la placa guía y dos pilares roscados para recibir tuercas de sujeción. Las tuercas de sujeción se diseñaron para ser ajustadas manualmente y facilitar el ensamblaje de la matriz, con la intención de poder prensar la membrana y evitar que pueda deslizarse al momento de pasar el bisturí.

Figura 1

Matriz de corte de precisión y procesamiento de membranas para estudios microbiológicos



Nota: A: matriz de corte con sus tres componentes, placa inferior o base, placa superior o guía y tuercas de sujeción; B: colocación de una membrana sobre la primera celdilla en bajo relieve para realizar prueba de corte; C: acople de placa de corte sobre la placa base y prensado con las tuercas de sujeción; D: corte inicial con bisturí N.º 15; E: membrana seccionada en tiras de 5 mm de ancho por 20 mm de largo; F: colocación de una tira de membrana sobre la segunda celdilla de corte, acople de la placa guía, prensado y realización del segundo corte de la membrana; G: muestra del seccionamiento de la membrana en porciones finales de 5 mm de largo por 5 mm de ancho. H: medición de fragmento de membrana que corrobora sus dimensiones.

Fuente: Elaboración propia.

El proceso de seccionamiento de las membranas se desarrolló dentro de una cabina de flujo laminar sobre campos estériles y usando materiales e instrumentos estériles.

En primer lugar, se realizó el proceso de asepsia de la matriz de corte con todos sus componentes utilizando jabón germicida para eliminar residuos orgánicos e inorgánicos que

pudieran estar adheridos a sus superficies, finalmente se empacaron todos los componentes en fundas de esterilización desechables para ser llevados a la autoclave a 134 °C por 15 min.

Luego de terminado el proceso de esterilización, secado y enfriamiento, se almacenó en un contenedor limpio con tapa hasta el momento de ser utilizada.

Todo el proceso de manipulación de la matriz de corte, membranas, instrumental e insumos se realizó cumpliendo estrictos protocolos de asepsia, antisepsia y esterilidad. Se colocó un campo estéril sobre la superficie de trabajo de la cabina de flujo laminar, para evitar movimientos que puedan ocasionar errores al cortar las membranas, sobre este campo se colocó la placa base y ubicó la membrana dentro de la primera celdilla, se superpuso la placa guía encajando las perforaciones circulares con los pilares de la placa base. Por último, se aseguró la matriz con las tuercas de sujeción.

Los cortes se efectuaron de manera firme y en un solo movimiento, obteniendo de cada membrana de colágeno seis tirillas de 20 x 5 mm y de la sintética 4 tirillas de 20 x 5 mm. Una vez obtenidas las tirillas, se ubicaron una por una dentro de la segunda celdilla de corte para realizar los seccionamientos finales, obteniendo porciones de membranas de 5 x 5 mm, para un total de 24 porciones por la membrana de colágeno y 16 por la membrana sintética.

Finalmente, las porciones de membranas fueron divididas y almacenadas de acuerdo con los grupos de estudio, siendo los grupos 1 y 2 tratados con clorhexidina y los grupos 3 y 4 no.

A cada una de las porciones de membrana, se les colocaron 50 µl de solución de clorhexidina al 0,0015% por 20 minutos, luego se secaron en Petri estériles dentro de la cabina de flujo laminar durante 2 horas y se almacenaron en refrigeración para ser usadas en 24 horas.

Para la activación y caracterización de cepas microbianas, *Candida albicans* (ATCC 29212) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 10231) fueron proporcionadas por el laboratorio de

Microbiología General de la Universidad Hemisferios, mismas que constan de certificación ATCC. *E. faecalis* fue sembrado en agar BHI y para *C. albicans* se utilizó agar Sabouraud Dextrose (SDA), ambas se incubaron en condiciones aerobias a 37 °C durante 24 horas, para permitir la formación de colonias características y su activación metabólica.

Se ejecutó el proceso de caracterización de ambos patógenos antes, durante y al final del experimento, mediante pruebas bioquímicas y de identificación morfológica (sulfuro-indol-movilidad, triple sugar iron, bilis esculina, prueba de catalasa, tinción Gram), para confirmar la identidad de estos y descartar la presencia de otros patógenos en las muestras.

Una vez activadas *C. albicans* y *E. faecalis*, se sembraron por separado en caldo de BHI enriquecido con glucosa al 1 % durante 18 horas a 37 °C; luego se llevaron a concentración 0,5 McFarland y se procedió a la inoculación de los fragmentos de membranas. Dentro de los pocillos de la microplaca de cultivo se colocaron las membranas y se dispensó 150 µl de caldo de BHI, 75 µl de inóculo de *E. faecalis* y 75 µl de inóculo de *C. albicans*.

La incubación de las microplacas se realizó a 37 °C durante 48 horas con agitación a 90 RPM para permitir la formación de biopelículas uniformes sobre las membranas.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se enjuagaron los fragmentos de las membranas para eliminar remanentes del medio de cultivo y las células planctónicas no adheridas, sumergiendo suavemente las membranas por 5 segundos en solución PBS estéril, este proceso se hizo por tres ocasiones.

Posterior al enjuague, se realizó la cuantificación microbiana, con las muestras de todos los grupos, mediante los ensayos de análisis de crecimiento microbiológico con tinción con CV, análisis de viabilidad microbiológica con tinción con XTT y cuantificación de la carga microbiológica viable expresada en UFC/ml.

Se realizaron mediciones con espectrofotometría a los cuatro grupos de estudio únicamente expuestos al caldo de cultivo BHI sin patógenos y sometidos a la tinción con CV y XTT, para determinar los valores del ruido que se genera por estos insumos y poder restarlos a los resultados de las repeticiones, obteniendo únicamente datos en base al biofilm adherido a las membranas.

Sobre los fragmentos de membrana enjuagados y colocados en un nuevo pocillo, se añadieron 200 µl de CV al 0,1 % para teñir las biopelículas, dejando reposar por 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el exceso de CV con 3 enjuagues sucesivos de solución buffer PBS. Se ubicaron las membranas en un nuevo pocillo y se les agregó 250 µl de etanol al 95% para diluir el CV adherido a los biofilms. Para finalizar se llevaron 200 µl de cada una de las muestras a nuevos pocillos para su análisis en lector de microplacas (Agilent Epoch2ns, US) a 570 nm. Como control negativo se utilizaron fragmentos de membranas que no fueron inoculados, pero si pasaron por el proceso de tinción.

Para este proceso se requirió de dos compuestos, XTT y menadiona. El XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) se preparó como una solución saturada de 0,5 g/l en solución buffer PBS y se esterilizó usando filtros de jeringa de 0.22 µm, debido a que el XTT es fotosensible debió ser cubierto con papel aluminio durante su preparación al igual que el recipiente donde fue almacenado. La preparación de la menadiona se realizó como una solución madre de 10 Mm en acetona 100%. Estos dos compuestos, XTT y menadiona, se combinaron justo antes de ser utilizados, siendo que se añadió 1 µl de menadiona por cada 10 ml de solución de XTT.

Sobre las membranas enjuagadas que se destinaron para este ensayo, se añadieron 150 µl de solución de XTT/menadiona directamente, se cubrieron las microplacas con papel aluminio y

se incubaron a 37 °C por dos horas. Pasado este tiempo, se extrajeron 100 µl de la solución y se llevó a un nuevo pocillo para su medición en el lector de microplacas a 490 nm.

Este tercer ensayo implicó sumergir cada fragmento de membrana enjuagado previamente, en 1 ml de buffer PBS dentro de un microtubo de 2 ml, luego se agitó con un vortex durante 1 minuto y esta solución se diluyó hasta 1:10⁶. Finalmente, para el recuento de UFC/ml se sembraron 100 µl de esta solución en placas de agar Plate Count y se incubaron a 37 °C por 48 horas.

Análisis y Recolección de Datos

Los datos obtenidos de todo el estudio se recolectaron en tablas de Excel diseñadas para el efecto para posteriormente ser analizados estadísticamente. El factor 1 fue el tipo de membrana con dos niveles: membrana de colágeno Lumina Coat y membrana sintética Duosynt; el factor 2 fue la clorhexidina con dos niveles: con clorhexidina (CHX+) y sin clorhexidina (CHX-); se establecieron como variables dependientes: el análisis de crecimiento microbiológico mediante tinción con CV, análisis de viabilidad microbiológica mediante tinción con XTT y la cuantificación de la carga microbiológica viable mediante el recuento de UFC/ml.

Como modelo principal de análisis se estableció el ANOVA factorial de dos vías 2 x 2, para la comparación entre los cuatro grupos de estudio se utilizó la prueba post hoc Tukey HSD y finalmente para el análisis de sensibilidad se utilizaron las pruebas de Kruskal-Wallis y p robustos HC3 cuando los supuestos paramétricos fueron divergentes. Ante la presencia de varianzas heterogéneas se empleó Welch y Mann-Whitney para comparar grupos de forma robusta con ajuste de Holm para evitar errores por comparaciones múltiples y se calculó la g de Hedges para demostrar magnitud real y clínica del impacto de la clorhexidina sobre el biofilm adherido en los dos tipos de membranas.

Hallazgos

A los datos obtenidos se les realizaron varios análisis, tanto para estadística descriptiva como para inferencial, que mostraron los siguientes resultados.

Se comparó el crecimiento microbiológico sobre dos tipos de membranas, considerando la presencia o ausencia de clorhexidina, bajo los tres tipos de ensayo propuestos: análisis de crecimiento microbiológico mediante tinción con CV, análisis de viabilidad microbiológica mediante tinción con XTT y cuantificación de la carga microbiológica viable expresada en UFC/ml (Tabla 3). Así, las medidas descriptivas calculadas fueron: n, media, desviación estándar (DE), mediana, mínimo, máximo y coeficiente de variación (CV%) (Figura 2).

Tabla 3

Establecimiento de grupos experimentales de estudio, de acuerdo con el tipo de membrana empleado y el tratamiento con clorhexidina

Grupo	Código	Tipo de membrana	Marca	Condición CHX
Grupo 1	L/CHX+	Colágeno	Lumina Coat	Con clorhexidina
Grupo 2	D/CHX+	Sintética	Duosynt	Con clorhexidina
Grupo 3	L/CHX-	Colágeno	Lumina Coat	Sin clorhexidina
Grupo 4	D/CHX-	Sintética	Duosynt	Sin clorhexidina

Nota: L: membrana Lumina Coat; D: membrana Duosynt; CHX+: con tratamiento de clorhexidina; CHX-: sin tratamiento de clorhexidina.

Fuente: Elaboración propia.

Figura 2

Estadística descriptiva general del análisis microbiológico de la formación de biofilm mixto de E. faecalis y C. albicans, sobre membranas de colágeno Lumina Coat y sintéticas Duosynt, con y sin tratamiento de clorhexidina

A	Grupo	Código	n	Media	DE	Mediana	Min.	Máx.	CV%
	Grupo 1	L/CHX+	30	2,288	0,030	2,283	2,209	2,341	1,3%
	Grupo 2	D/CHX+	30	2,212	0,370	2,227	1,501	2,844	16,7%
	Grupo 3	L/CHX-	30	2,508	0,044	2,493	2,455	2,635	1,8%
	Grupo 4	D/CHX-	30	2,735	0,352	2,877	1,785	3,070	12,9%

B	Grupo	Código	n	Media	DE	Mediana	Min.	Máx.	CV%
	Grupo 1	L/CHX+	30	2,288	0,030	2,283	2,209	2,341	1,3%
	Grupo 2	D/CHX+	30	2,212	0,370	2,227	1,501	2,844	16,7%
	Grupo 3	L/CHX-	30	2,508	0,044	2,493	2,455	2,635	1,8%
	Grupo 4	D/CHX-	30	2,735	0,352	2,877	1,785	3,070	12,9%

C	Grupo	Código	n	Media	DE	Mediana	Min.	Máx.	CV%
	Grupo 1	L/CHX+	30	2,70	1,42	3,00	0,00	5,00	52,5%
	Grupo 2	D/CHX+	30	2,80	1,32	3,00	0,00	5,00	47,3%
	Grupo 3	L/CHX-	30	8,97	2,80	8,50	4,00	16,00	31,2%
	Grupo 4	D/CHX-	30	8,57	2,98	8,00	4,00	16,00	34,8%

Nota: L: membrana Lumina Coat; D: membrana Duosynt; CHX+: con tratamiento de clorhexidina; CHX-: sin tratamiento de clorhexidina; A: ensayo de tinción con cristal violeta (biomasa total)); B: ensayo de tinción con sales de tetrazolio (viabilidad microbiana); C: ensayo de recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (carga microbiana viable); DE: desviación estándar; CV%: coeficiente de variación; las tablas presentan las medidas descriptivas calculadas de acuerdo con cada ensayo y por grupos de estudio.

Fuente: Elaboración propia.

En el ensayo con CV, los grupos sin clorhexidina presentaron medias mayores que su contraparte con clorhexidina, al mismo tiempo la membrana Lumina Coat mostró valores más estables con coeficientes de variación cercanos a 1-2 %, mientras que Duosynt presentó mayor dispersión.

Referente al ensayo con XTT, la diferencia descriptiva con clorhexidina resultó menos uniforme, siendo que Lumina Coat con clorhexidina mostró la media más baja; mientras que Duosynt con clorhexidina se acercó a los grupos sin clorhexidina. Existiendo una variabilidad relativa alta en todos los grupos, sugiriendo prudencia al interpretar pequeñas diferencias de absorbancia (Figura 3).

Para UFC/ml, el recuento mostró la diferencia más marcada entre condiciones, donde los grupos con clorhexidina tuvieron medias aproximadas entre $2,7 - 2,8 \times 10^6$ de UFC/ml, mientras que los grupos sin clorhexidina estuvieron cerca de $8,6 \times 10^6$ a $9,0 \times 10^6$. Además, los grupos con clorhexidina incluyeron observaciones con valor 0, fenómeno que no apareció en los grupos sin clorhexidina (Tabla 4).

Tabla 4

Resumen de medias y desviaciones estándar de los ensayos de cristal violeta, sales de tetrazolio y recuento de unidades formadoras de colonias, por grupo de estudio

Grupo	Código	CV media ± DE	XTT media ± DE	UFC/ml media ± DE * 10⁶
Grupo 1	L/CHX+	2,288 ± 0,030	0,0064 ± 0,0020	2,70 * 10 ⁶ ± 1,42
Grupo 2	D/CHX+	2,212 ± 0,370	0,0090 ± 0,0021	2,80 * 10 ⁶ ± 1,32
Grupo 3	L/CHX-	2,508 ± 0,044	0,0100 ± 0,0043	8,97 * 10 ⁶ ± 2,80
Grupo 4	D/CHX-	2,735 ± 0,352	0,0099 ± 0,0033	8,57 * 10 ⁶ ± 2,98

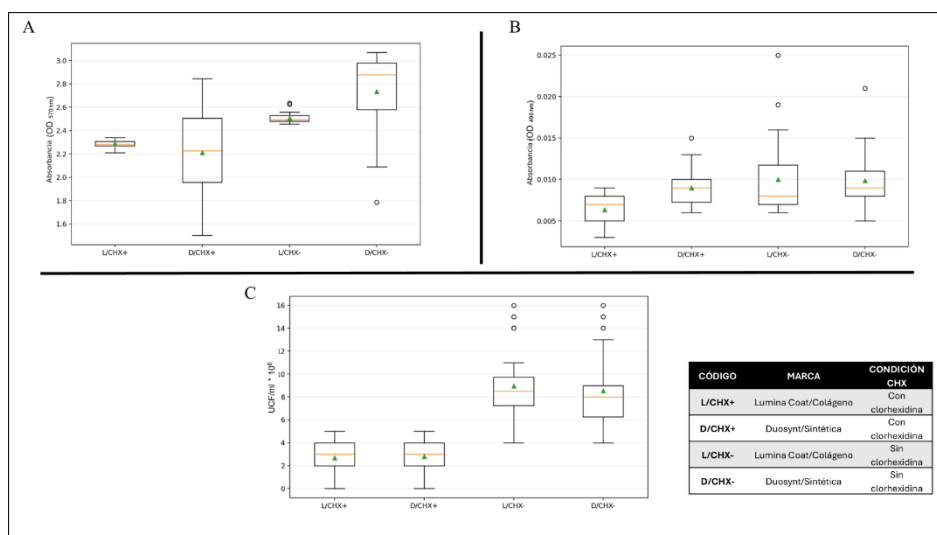
Nota: L: membrana Lumina Coat; D: membrana Duosynt; CHX+: con tratamiento de clorhexidina; CHX-: sin tratamiento de clorhexidina; CV: ensayo de tinción con cristal violeta (biomasa total); XTT: ensayo de tinción con sales de tetrazolio (viabilidad microbiana); UFC/ml: ensayo de recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (carga microbiana viable); DE: desviación estándar.

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 4 se observan que los grupos con clorhexidina (L/CHX+ y D/CHX+) mostraron valores de concentración de microorganismos menores en los ensayos de UFC/ml, mientras que en los grupos sin clorhexidina (L/CHX- y D/CHX-) se identificaron valores notablemente más altos.

Figura 3

Efecto de la clorhexidina en la reducción del biofilm adherido a las membranas de colágeno Lumina Coat y sintéticas Duosynt, según los ensayos de tinción con cristal violeta, sales de tetrazolio y recuento de UFC/ml



Nota: A: Análisis del crecimiento microbiano (biomasa total) mediante ensayo de tinción con Cristal Violeta (CV); B: Análisis de viabilidad microbiana mediante ensayo de tinción con sales

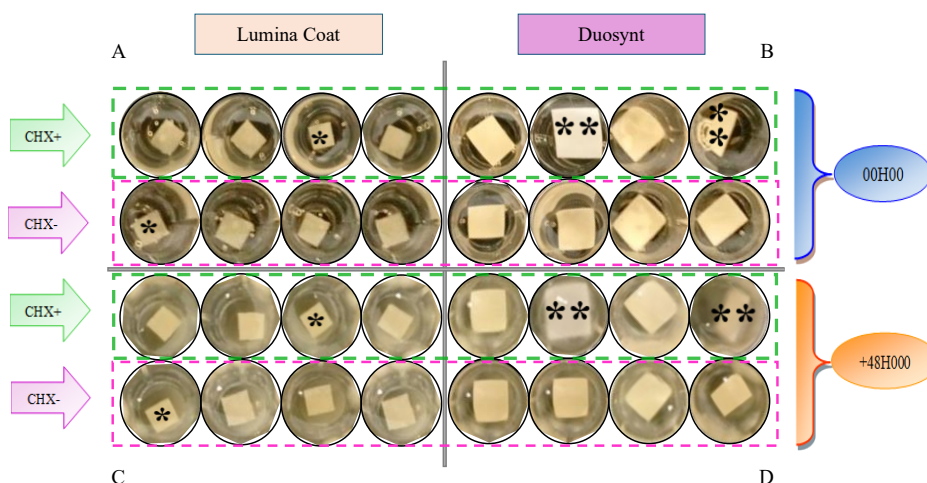
de tetrazolio (XTT); C: Análisis de cuantificación de carga microbiana viable expresada en de UFC/ml; los gráficos muestran de manera general que, si existe diferencias respecto a la adherencia del biofilm y su viabilidad, entre las membranas tratadas con clorhexidina versus las no tratadas.

Fuente: Elaboración propia.

Esta comparación agrupa los dos tipos de membrana para contrastar la condición de la presencia de clorhexidina frente a la condición de sin clorhexidina. Determinándose únicamente una lectura descriptiva de magnitud (Figura 4).

Figura 4

Ensayo para la formación de biofilms mixtos de E. faecalis y C. albicans sobre membranas de colágeno Lumina Coat y sintéticas Duosynt, con tratamiento de clorhexidina vs sin tratamiento de clorhexidina, antes y después del tiempo de incubación



Nota: A y B: membranas de colágeno Lumina Coat y sintéticas Duosynt respectivamente recién inoculadas con *E. faecalis* y *C. albicans* en caldo de BHI; C y D: membranas bajo la misma distribución, luego de 48 horas de incubación a 37 °C. y agitación a 90 rpm; Flecha verde, membranas con tratamiento de clorhexidina, Flecha magenta: membrana sin tratamiento con

clorhexidina; *: las membranas de colágeno muestran reducción de su tamaño respecto a las sintéticas; **: las membranas sintéticas debido a su propiedad hidrofóbica no se mantienen en el fondo del pocillo y modifican su posición, ubicándose en la superficie del caldo de cultivo o de forma perpendicular al fondo del pocillo; se observó un evidente aumento de turbidez del medio de cultivo en los pocillos, debido al crecimiento microbiano luego de transcurridas las 48 horas de incubación.

Fuente: Elaboración propia.

Con base a lo observado en la Tabla 1, la prevalencia de la bifurcación del canal dentario inferior es baja alcanzando apenas el 14,4%, la ubicación más frecuente fue el lado derecho, mayoritariamente con un canal retromolar, en el caso del lado izquierdo también fue más frecuente el canal retromolar, hubo más predominio del sexo femenino y el grupo de edad de 55-64 años, con una mayor concentración de la etnia mestiza, siendo la gran mayoría de participantes de la zona urbana.

Como resultado se evidenció que la presencia de clorhexidina produce un impacto en el conjunto de datos, donde los recuentos de UFC/ml son aproximadamente tres veces mayores en ausencia de clorhexidina. En los ensayos realizados, la reducción microbiana descriptiva, en relación con la presencia de clorhexidina, fue alrededor del 13,95% para CV, 22,7% para XTT y 68,6 % para UFC/ml. Además, el efecto de la clorhexidina fue más claro al analizarse por recuentos de UFC/ml. En cambio, que en relación con el tipo de membrana se encontraron diferencias menos consistentes (Tabla 5).

La membrana Duosynt presentó mayor variabilidad en el ensayo con CV que la membrana Lumina Coat, tanto con tratamiento de clorhexidina como sin tratamiento de clorhexidina.

Tabla 5

Porcentaje de reducción relativa de microorganismos adheridos a membranas de colágeno

Lumina Coat y sintéticas Duosynt, asociado al efecto de la clorhexidina por tipo de ensayo

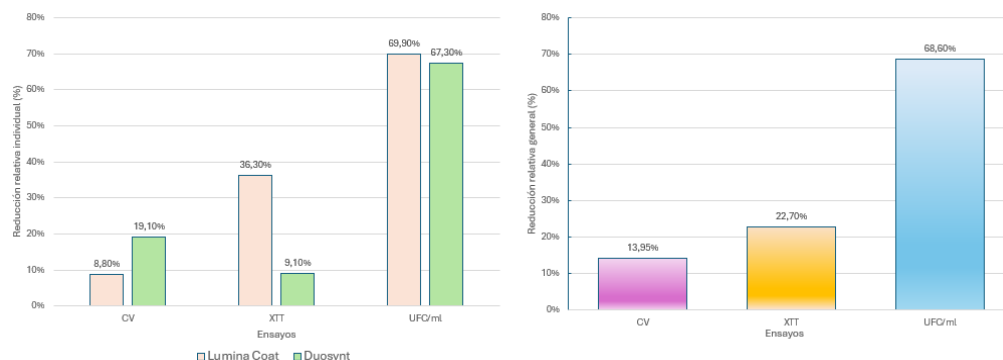
Material	Ensayo	Media con CHX	Media sin CHX	Reducción relativa	Reducción relativa general
Lumina Coat	CV	2,288	2,508	8,80%	13,95%
Duosynt	CV	2,212	2,735	19,10%	
Lumina Coat	XTT	0,0064	0,01	36,30%	22,70%
Duosynt	XTT	0,009	0,0099	9,10%	
Lumina Coat	UFC/ml	2,7	8,97	69,90%	68,60%
Duosynt	UFC/ml	2,8	8,57	67,30%	

Nota: CV: ensayo de tinción con cristal violeta (biomasa total); XTT: ensayo de tinción con sales de tetrazolio (viabilidad microbiana); UFC/ml: ensayo de recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (carga microbiana viable); la tabla muestra que en todos los ensayos existió un porcentaje de reducción de microorganismos por el efecto de la clorhexidina, siendo más evidente en el ensayo de recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro.

Fuente: Elaboración propia.

Figura 5

Porcentaje de reducción relativa de microorganismos adheridos a membranas de colágeno Lumina Coat y sintéticas Duosynt, asociado al efecto de la clorhexidina por tipo de ensayo



Nota: CV: ensayo de tinción con cristal violeta (biomasa total); XTT: ensayo de tinción con sales de tetrazolio (viabilidad microbiana); UFC/ml: ensayo de recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (carga microbiana viable).

Fuente: Elaboración propia.

Previo a la interpretación de las pruebas inferenciales, se muestra el resumen de la tendencia central y dispersión por grupo, utilizando como referencia para entender la dirección de los efectos estadísticos la (Tabla 6).

Tabla 6

Medias con desviación estándar de biofilms adheridos sobre membranas de colágeno Lumina Coat y Sintéticas Duosynt, de los ensayos de tinción con cristal violeta (CV), sales de tetrazolio (XTT) y recuentos microbiológicos (UFC/ml)

Grupo	n	CV	XTT	UFC/ml media	UFC/ml mediana
		media $\pm$ DE	media $\pm$ DE	$\pm$ DE	(rango)
G1:	30	2,288 $\pm$	0,0064 $\pm$	2,70 $\times 10^6 \pm$	3,00 $\times 10^6$ (0,00 $\times 10^6$ -
L/CHX+		0,030	0,0020	1,42 $\times 10^6$	5,00 $\times 10^6$)
G2:	30	2,212 $\pm$	0,0090 $\pm$	2,80 $\times 10^6 \pm$	3,00 $\times 10^6$ (0,00 $\times 10^6$ -
D/CHX+		0,370	0,0021	1,32 $\times 10^6$	5,00 $\times 10^6$)
G3:	30	2,508 $\pm$	0,0100 $\pm$	8,97 $\times 10^6 \pm$	8,50 $\times 10^6$ (4,00 $\times 10^6$ -
L/CHX-		0,044	0,0043	2,80 $\times 10^6$	16,00 $\times 10^6$)
G4:	30	2,735 $\pm$	0,0099 $\pm$	8,57 $\times 10^6 \pm$	8,00 $\times 10^6$ (4,00 $\times 10^6$ -
D/CHX-		0,352	0,0033	2,98 $\times 10^6$	16,00 $\times 10^6$)

Nota: G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; L: membrana Lumina Coat; D: membrana Duosynt; CHX+: con tratamiento de clorhexidina; CHX-: sin tratamiento de clorhexidina CV: ensayo de tinción con cristal violeta (biomasa total); XTT: ensayo de tinción con sales de tetrazolio (viabilidad microbiana); UFC/ml: ensayo de recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (carga microbiana viable); DE: desviación estándar.

Fuente: Elaboración propia.

La normalidad residual no se cumplió en estrictamente en ninguna variable. Las varianzas fueron heterogéneas en CV y UFC/ml, mientras que XTT fue compatible con

homogeneidad de varianzas. Por ello los resultados del ANOVA se interpretan junto con los valores p robustos HC3 y con Kruskal-Wallis como contraste de sensibilidad.

Los resultados del ANOVA factorial 2 x 2 para el ensayo de CV mostraron que la clorhexidina presentó un efecto significativo sobre la absorbancia de este ensayo ($p < 0.05$), de igual forma la interacción entre material/clorhexidina también fue significativa, lo que indica que la diferencia asociada a clorhexidina no fue idéntica en ambos materiales. Por tal motivo el efecto principal del material no fue significativo en el análisis p robusto HC3. También se pudo evidenciar, en el caso del uso de XTT, que existen efectos significativos en el material con clorhexidina, lo que indicaría que la actividad metabólica microbiana, puede variar si las membranas reciben el tratamiento de clorhexidina, Además, que el efecto de la clorhexidina fue más evidente en una membrana que en la otra, pero debido a la interacción entre el XTT y algunos tipos de membranas, se pueden presentar resultados divergentes. Similarmente, los resultados de la ANOVA 2x2 sobre el recuento de UFC/ml, permitió observar que la clorhexidina tuvo un efecto altamente significativo y de gran tamaño en la reducción del biofilm adherido sobre las membranas. Ni el material ni la interacción entre material/clorhexidina fueron significativos, lo que nos sugiere que la reducción de bacterias cultivables por clorhexidina fue consistente en Lumina Coat y Duosynt (Tabla 7).

Tabla 7

ANOVA factorial 2x2 de la influencia del tipo de material de la membrana, el efecto de la clorhexidina y la interacción material/clorhexidina según los ensayos de tinción con cristal violeta, sales de tetrazolio y recuento de UFC/ml

Ensayo	Efecto	F clásico (1,116)	P clásico	F robusto HC3	p HC3	ηp^2	Lectura
CV	Material	2,587	0,11	2,981	0,087	0,022	No significativo
CV	CHX	63,08	<0,001	509,691	<0,001	0,352	Efecto significativo
CV	Interacción Material×CHX	10,432	0,002	10,084	0,002	0,083	Efecto significativo
XTT	Material	5,115	0,026	18,456	<0,001	0,042	Efecto significativo
XTT	CHX	16,378	<0,001	12,8	<0,001	0,124	Efecto significativo
XTT	Interacción Material×CHX	5,954	0,016	5,756	0,018	0,049	Efecto significativo
UFC/ml	Material	0,132	0,717	0,001	0,98	0,001	No significativo

							Efecto
UFC/ml	CHX	212,285	<0,001	206,174	<0,001	0,647	principal marcado
							No
UFC/ml	Interacción Material×CHX	0,367	0,546	0,354	0,553	0,003	significativo

Nota: CHX: clorhexidina; CV: ensayo de tinción con cristal violeta (biomasa total); XTT: ensayo de tinción con sales de tetrazolio (viabilidad microbiana); UFC/ml: ensayo de recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (carga microbiana viable).

Fuente: Elaboración propia.

Las comparaciones post hoc realizadas con la prueba de Tukey HSD, respondieron directamente a dos interrogantes del estudio: cual es el efecto de la clorhexidina dentro de cada tipo de membrana y cuál es el efecto del tipo de membrana dentro de cada condición de clorhexidina.

En el ensayo con CV, la clorhexidina redujo la absorbancia dentro de ambos materiales y la diferencia entre materiales fue significativa, principalmente en ausencia de clorhexidina (Tabla 8). En cuanto al ensayo con XTT, la diferencia más marcada se mantuvo en Lumina Coat con clorhexidina; Duosynt con y sin clorhexidina no mostró separación significativa (Tabla 9). Referente al ensayo de recuento de UFC/ml, los contrastes dentro de cada material confirmaron diferencias significativas entre CHX+ y CHX- (Tabla 10). También se realizaron comparaciones entre grupos para evaluar los efectos globales de la clorhexidina y el material (Tabla 11).

Tabla 8

Prueba de Tukey HSD del ensayo de cristal violeta (CV) para la evaluación de la capacidad de formación de biofilms mixtos de E. faecalis y C. albicans sobre membranas de colágeno Lumina Coat y sintética Duosynt

Comparación	Diferencia de medias	IC 95%	p ajustado	Significancia
G1 L/CHX+ vs G2 D/CHX+	-0,076	-0,249 a 0,097	0,662	No
G1 L/CHX+ vs G3 L/CHX-	0,221	0,048 a 0,393	0,006	Sí
G2 D/CHX+ vs G4 D/CHX-	0,523	0,351 a 0,696	<0,001	Sí
G3 L/CHX- vs G4 D/CHX-	0,227	0,054 a 0,399	0,005	Sí

Nota: G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; L: membrana Lumina Coat; D: membrana Duosynt; CHX+: con tratamiento de clorhexidina; CHX-: sin tratamiento de clorhexidina; IC 95%: intervalo de confianza al 95% para la diferencia de medidas; p ajustado: valor de probabilidad ajustado para comparaciones múltiples.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 9

Prueba de Tukey HSD del ensayo de sales de tetrazolio (XTT) para la evaluación de la capacidad de formación de biofilms mixtos de E. faecalis y C. albicans sobre membranas de colágeno Lumina Coat y sintética Duosynt

Comparación	Diferencia de medias	IC 95%	p ajustado	Significancia
G1 L/CHX+ vs G2 D/CHX+	0,0026	0,0006 a 0,0047	0,006	Sí
G1 L/CHX+ vs G3 L/CHX-	0,0036	0,0016 a 0,0057	<0,001	Sí
G2 D/CHX+ vs G4 D/CHX-	0,0009	-0,0012 a 0,0030	0,668	No
G3 L/CHX- vs G4 D/CHX-	-0,0001	-0,0022 a 0,0020	0,999	No

Nota: G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; L: membrana Lumina Coat; D: membrana Duosynt; CHX+: con tratamiento de clorhexidina; CHX-: sin tratamiento de clorhexidina; IC 95%: intervalo de confianza al 95% para la diferencia de medidas; p ajustado: valor de probabilidad ajustado para comparaciones múltiples.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 10

Prueba de Tukey HSD del ensayo de recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), para la evaluación de la capacidad de formación de biofilms mixtos de E. faecalis y C. albicans sobre membranas de colágeno Lumina Coat y sintética Duosynt

Comparación	Diferencia de medias	IC 95%	p ajustado	Significancia
G1 L/CHX+ vs G2 D/CHX+	0,10 ×10 ⁶	-1,42 ×10 ⁶ a 1,62 ×10 ⁶	0,998	No
G1 L/CHX+ vs G3 L/CHX-	6,27 ×10 ⁶	4,74 ×10 ⁶ a 7,79 ×10 ⁶	<0,001	Sí
G2 D/CHX+ vs G4 D/CHX-	5,77 ×10 ⁶	4,24 ×10 ⁶ a 7,29 ×10 ⁶	<0,001	Sí
G3 L/CHX- vs G4 D/CHX-	-0,40 ×10 ⁶	-1,92 ×10 ⁶ a 1,12 ×10 ⁶	0,903	No

Nota: G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; L: membrana Lumina Coat; D: membrana Duosynt; CHX+: con tratamiento de clorhexidina; CHX-: sin tratamiento de clorhexidina; IC 95%: intervalo de confianza al 95% para la diferencia de medidas; p ajustado: valor de probabilidad ajustado para comparaciones múltiples.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 11

Welch con ajuste de Holm para evaluar efectos del tipo de material de las membranas y la influencia de la clorhexidina sobre el crecimiento de biofilms mixtos, según los ensayos de cristal violeta (CV), sales de tetrazolio (XTT) y recuentos microbianos (UFC/ml)

Ensayo	Comparación agrupada	Diferencia de medias	IC 95% Welch	p ajustado Holm	Significancia
CHX+ vs CHX-					
CV	(G1+G2 vs G3+G4)	0,372	0,275 a 0,469	<0,001	Sí
Lumina Coat vs					
CV	Duosynt (G1+G3 vs G2+G4)	0,075	-0,043 a 0,194	0,209	No
CHX+ vs CHX-					
XTT	(G1+G2 vs G3+G4)	0,0023	0,0011 a 0,0034	<0,001	Sí
Lumina Coat vs					
XTT	Duosynt (G1+G3 vs G2+G4)	0,0013	0,0001 a 0,0025	0,039	Sí
CHX+ vs CHX-					
UFC/ml	(G1+G2 vs G3+G4)	$6,02 \times 10^6$	$5,20 \times 10^6$ a $6,83 \times 10^6$	<0,001	Sí

	Lumina Coat vs				
			$-1,51 \times 10^6$ a $1,21$		
UFC/ml	Duosynt (G1+G3	$-0,15 \times 10^6$		0,828	No
	vs G2+G4)		$\times 10^6$		

Nota: G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; L: membrana Lumina Coat; D: membrana Duosynt; CHX+: con tratamiento de clorhexidina; CHX-: sin tratamiento de clorhexidina; IC 95%: intervalo de confianza al 95% para la diferencia de medidas; p ajustado: valor de probabilidad ajustado para comparaciones múltiples.

Fuente: Elaboración propia.

Además del post hoc general, se evaluaron contrastes planeados alineados con el diseño del estudio, donde se confirma que en el ensayo con CV el efecto de la clorhexidina es significativo en los dos tipos de membrana y el contraste entre materiales sin clorhexidina también resulta significativo; en el ensayo con XTT el efecto de la clorhexidina es significativo en Lumina Coat, pero no en Duosynt; y en el ensayo de recuento de UFC/ml, se confirma que el efecto de la clorhexidina es fuerte en los dos tipos de membrana (Tabla 12).

Tabla 12

Welch y Mann-Whitney con ajuste de Holm y estimación de g de Hedges para evaluar el efecto del material de las membranas y el efecto de clorhexidina sobre el crecimiento de biofilms mixtos, según los ensayos de cristal violeta (CV), sales de tetrazolio (XTT) y recuentos microbianos (UFC/ml)

Ensayo	Contraste	Diferencia de medias	p Welch Holm	p MW Holm	g de Hedges
Efecto de					
CV	clorhexidina en Lumina Coat	-0,221	<0,001	<0,001	-5,73
Efecto de					
CV	clorhexidina en Duosynt	-0,523	<0,001	<0,001	-1,43
CV	Efecto del material con clorhexidina	0,076	0,271	0,223	0,29
CV	Efecto del material sin clorhexidina	-0,227	0,003	<0,001	-0,89
Efecto de					
XTT	clorhexidina en Lumina Coat	-0,0036	<0,001	<0,001	-1,07
Efecto de					
XTT	clorhexidina en Duosynt	-0,0009	0,422	0,727	-0,32

XTT	Efecto del material con clorhexidina	-0,0026	<0,001	<0,001	-1,28
XTT	Efecto del material sin clorhexidina	0,0001	0,920	0,727	0,03
UFC/ml	Efecto de clorhexidina en Lumina Coat	$-6,27 \times 10^6$	<0,001	<0,001	-2,79
UFC/ml	Efecto de clorhexidina en Duosynt	$-5,77 \times 10^6$	<0,001	<0,001	-2,47
UFC/ml	Efecto del material con clorhexidina	$-0,10 \times 10^6$	1,000	0,847	-0,07
UFC/ml	Efecto del material sin clorhexidina	$0,40 \times 10^6$	1,000	0,847	0,14

Nota: CV: ensayo de tinción con cristal violeta (biomasa total); XTT: ensayo de tinción con sales de tetrazolio (viabilidad microbiana); UFC: ensayo de recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (carga microbiana viable); p Welch Holm: valor p ajustado mediante método de holm para prueba de Welch; p MW Holm: valor p ajustado mediante método de holm para prueba de U de Mann-Whitney; g de Hedges: medida del tamaño del defecto.

Fuente: Elaboración propia.

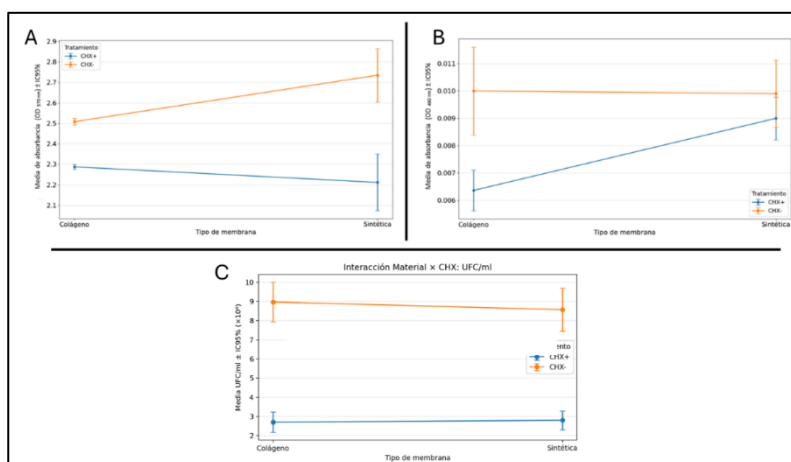
En la (Figura 5 y 6) se muestran los patrones de interacción entre material y clorhexidina (intervalos de confianza 95%). En el ensayo de CV, la clorhexidina también se asoció con menor biomasa teñida. La interpretación significativa sugiere que el comportamiento de los materiales no es exactamente paralelo, señalando que Duosynt sin clorhexidina alcanzó la mayor absorbancia, mientras que los grupos con clorhexidina obtuvieron valores menores.

En el ensayo de viabilidad celular con XTT, la interpretación es más matizada, demostrándose que la diferencia más marcada se concentra en Lumina Coat con clorhexidina, que presentó menor actividad metabólica. Duosynt con clorhexidina, Lumina Coat sin clorhexidina y Duosynt sin clorhexidina no se separaron claramente en el post hoc de Tukey.

Finalmente, desde un punto de vista inferencial, la evidencia más sólida corresponde a la reducción del recuento de UFC/ml en presencia de clorhexidina. Este resultado es coherente con los datos descriptivos y con las pruebas p robustos HC3 y no paramétricas.

Figura 6

Gráficos de interacción con intervalos de confianza, entre las membranas de colágeno Lumina Coat y sintética Duosynt y el efecto antimicrobiano de la clorhexidina, según los ensayos de tinción de cristal violeta, sales de tetrazolio y recuento de UFC/ml



Nota: CHX+: con tratamiento de clorhexidina; CHX-: sin tratamiento de clorhexidina; A: resultados de la interacción Material/clorhexidina para ensayo con cristal violeta (Absorbancia, OD570nm). La separación entre CHX+ y CHX- indica menor absorbancia en este ensayo en presencia de clorhexidina; B: resultados de la interacción Material/clorhexidina para ensayo con sales de tetrazolio (Absorbancia, OD490nm). El grupo L/CHX+ muestra menor actividad metabólica promedio; C: resultados de la interacción Material/clorhexidina para ensayo de recuento de UFC/ml; la reducción asociada a clorhexidina es clara en ambos materiales.

Fuente: Elaboración propia.

La membrana de colágeno presentó una estructura más esponjosa, maleable y con microfilamentos, a diferencia de la membrana Duosynt que su estructura fue más compacta, rígida y microporosa sin los microfilamentos observados en la anterior.

Al realizar la inoculación de las membranas dentro de los pocillos de la microplaca, las porciones de membrana de colágeno no experimentaban movimientos de flotación en el caldo de cultivo, mientras que un mediano porcentaje de las membranas sintéticas experimentaban alteraciones en su estabilidad, pudiendo modificar su posición inicial, desde ubicarse perpendicular a la base del pocillo hasta llegar a ubicarse en la superficie del caldo de cultivo.

Otra observación relevante es que las membranas que se utilizaron en los ensayos con XTT, sufrieron cambios de color en distintas concentraciones de color negro y café, de manera directamente proporcional a la exposición a clorhexidina, donde las membranas que no fueron tratadas con clorhexidina mostraron un cambio de color más marcado, siendo esto una de las alteraciones más importantes que definen no solo la adherencia microbiológica a las membranas sino que evidencia la capacidad de metabolización que presentaban en ese momento los microorganismos y por lo tanto la viabilidad existente.

Finalmente, un aspecto que se debe mencionar es que a diferencia de la membrana Duosynt que no modificó su estructura, la membrana Lumina Coat experimentó un pequeño cambio de tamaño, mostrando una reducción evidente de sus dimensiones iniciales, mostrándose desde el inicio de la inoculación una reducción mínima pero evidente de la membrana, lo que al final del estudio puede ser un factor influyente en la cuantificación de cantidad de biofilm adherido a la superficie de la membrana (Figura 3).

Discusión

Se evaluó integralmente el crecimiento microbiológico sobre dos membranas diferentes de colágeno (Lumina Coat) y sintética a base de polímeros PTMC y PLGA (Duosynt), donde se analizó el impacto de la incorporación de clorhexidina previo a su inoculación con *Candida albicans* (ATCC 29212) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 10231), para la formación de un biofilm mixto, a través de los tres ensayos diferentes ya mencionados (CV, XTT y recuento por UFC/ml), pero que resultaron complementarios para establecer una conclusión fiable.

La estadística descriptiva e inferencial mostró hallazgos que concuerdan con estudios anteriores, donde se manifiesta que la presencia de clorhexidina en las membranas Lumina Coat y Duosynt, fue el factor de mayor peso y que determinó el menor desarrollo microbiano sobre estas superficies evaluadas (Adamuz et al., 2024; Chen et al., 2003), pudiendo observarse los porcentajes de reducción individual y general en la (Figura 5).

En el ensayo con CV existió una interacción significativa entre la membrana y la clorhexidina ($p < 0.01$), indicando que la clorhexidina de manera general reduce la cantidad de biomasa adherida en un 13,95 %; el ensayo con XTT mostró resultados significativos ($p < 0.05$), llegando a demostrar que la clorhexidina puede disminuir contundentemente la actividad metabólica, con una reducción general del 22,70 % ($p < 0.001$) y con una disminución mínima

específica sobre la membrana Duosynt que no generó cambios estadísticos significativos correspondientes al 9.1 % ($p > 0.05$); en el recuento de (UFC/ml), la clorhexidina demostró una reducción significativa del 68.6%, en los grupos 1 y 2, mostrándose una media global que decreció de 8.77×10^6 UFC/ml a 2.75×10^6 UFC/ml ($p < 0.001$).

Con el modelo ANOVA factorial 2x2, se estableció que no existió mayor relevancia entre los diferentes materiales de las membranas ($p > 0.05$) ni de la interacción entre material con la clorhexidina ($p > 0.05$). Lo que muestra una actividad similar de la clorhexidina tanto para la matriz de colágeno como para la sintética.

Si bien existieron datos de los ensayos de CV y XTT, que demostraron diferencias en las lecturas de absorbancia entre materiales, estas son poco significativas individualmente y que, al agruparse los resultados de los tres ensayos, se evidencia que el tipo de material sea Lumina Coat o Duosynt, no mostró interacciones de importancia que puedan generar cambios trascendentales en la adherencia del biofilm. La discrepancia de los resultados entre las tres metodologías de análisis puede explicarse mediante el concepto viable pero no cultivable (VBNC) que indica que los microorganismos pueden encontrarse en estado latente, pero no manifestar división celular (Mahdizade et al., 2025). Esto explicaría por qué en el ensayo de recuento de microorganismos vivos (UFC/ml) se observó menor cantidad de colonias procedentes de los grupos con clorhexidina vs los grupos que no tenían clorhexidina. presentando así, el porcentaje de reducción de microorganismos más alto entre los tres ensayos (Kichler et al., 2021; Lu et al., 2024; Mejía et al., 2025).

El estado de VBNC no indica que la clorhexidina va a suprimir totalmente metabolismo microbiano, pudiendo existir aun, una actividad relativa de las deshidrogenasas capaces de reducir el XTT. Este efecto, se observó similarmente en estudios anteriores, donde se

demonstraron resultados equivalentes en la reducción de la actividad metabólica de especies del género *Candida* frente a la aplicación de clorhexidina, pero que aún persistía la actividad enzimática reductora del XTT (Fu et al., 2014; Koban et al., 2012).

La similitud de resultados entre la membrana Duosynt con y sin clorhexidina en el ensayo con XTT, puede explicarse debido a que el colorante pudiera retenerse en la membrana y no liberarse al sobrenadante, generando falsos positivos o negativos. Además, esta particularidad se confirma en otros estudios que explican la existencia de una retención física inespecífica del colorante, debido a la porosidad y tensión superficial que presentan las membranas sintéticas, a diferencia de las membranas de colágeno (Roether et al., 2002; Weyermann et al., 2005). De igual forma la sección 5 de la norma **ISO 10993-5:2009** advierte que, si el dispositivo médico a evaluar posee estructura porosa, absorbente o interactúa con el reactivo (MTT o XTT), existe alto riesgo de retención inespecífica del colorante (International Organization for Standardization, 2009).

Las limitaciones del estudio corresponden a la diversidad microbiana reducida por el empleo único de *E. faecalis* y *C. albicans*, ya que la práctica, la membrana expuesta al medio oral puede contaminarse de otros patógenos como los del complejo rojo de Socransky cuya actividad metabólica puede generar alteraciones en la efectividad de la clorhexidina (Socransky & Haffajee, 2000). Además, no se evaluó el tiempo de liberación sostenida de la clorhexidina, ni la citotoxicidad de la clorhexidina al 0,0015% sobre osteoblastos o fibroblastos; y, por último, al ser un estudio *in vitro*, no se cuenta con el ambiente y las dinámicas propias de la cavidad oral.

Se sugieren más estudios a futuro que incluyan la presencia de inmunoglobulinas y cambios de pH para simular en ambiente de la cavidad oral, la inclusión de membranas de matriz de pericardio y otros patógenos orales para evaluar las similitudes o discrepancias del efecto de

la clorhexidina para disminuir el riesgo de contaminación de la membrana en caso de exposición al medio oral. También se abre la puerta a la posibilidad del empleo de la matriz de corte diseñada en este estudio, para el seccionamiento prolijo de las membranas previo a su implantación, así como la incorporación de soluciones de clorhexidina a la membrana como protocolo en los consultorios dentales, para generar en ellas una capacidad antimicrobiana en caso de que se expongan luego de las cirugías de ROG.

Finalmente, se muestran en este estudio resultados que se complementaron para llegar a un mismo criterio; donde las diferentes conductas observadas entre membranas, antiséptico y microorganismos marcan la importancia de no evaluar la eficacia de la clorhexidina en base a un solo indicador. Mientras el CV ayuda a medir la cantidad total de biofilm adherido a la membrana y el XTT la aparente actividad metabólica, el recuento de las UFC/ml se sitúa como el indicador final de supervivencia celular y de la potencial de infección que puede generarse.

Conclusión

Como conclusión se puede establecer que los datos obtenidos demuestran con firmeza que el uso de la clorhexidina representa una estrategia eficaz para disminuir la colonización de *Candida albicans* (ATCC 29212) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 10231), en membranas empleadas en ROG, manifestando semejanzas en la supresión de la viabilidad microbiana y la capacidad de multiplicarse sobre las matrices de colágeno y las sintéticas.

Por consiguiente, se puede dictaminar que el ensayo más eficiente de este estudio para demostrar el efecto de la clorhexidina, fue el recuento de unidades formadoras de colonias, para cuantificar la carga microbiana viable sobre los biofilms adheridos a las membranas empleadas.

Referencias

- Abdo, V. L., Suarez, L. J., de Paula, L. G., Costa, R. C., Shibli, J., Feres, M., Barão, V. A. R., Bertolini, M., & Souza, J. G. S. (2023). Underestimated microbial infection of resorbable membranes on guided regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 226, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113318>
- Adamuz, A., Manzano, F. J., & Vallecillo, C. (2024). Regeneration Membranes Loaded with Non-Antibiotic Anti-2 Microbials: A Review. *Polymers*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/polym16010095>
- Allan, B., Ruan, R., Landao, E., Gillman, N., Wang, T., Gao, J., Ruan, Y., Xu, Y., Lee, C., Goonewardene, M., & Zheng, M. (2021). Collagen membrane for guided bone regeneration in dental and orthopedic applications. *Tissue Engineering - Part A*, 27(5), 372–381. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2020.0140>
- Barreras, U., Méndez, F., Martínez, R., Valencia, C., Rodríguez, P., & Rodríguez, J. (2016). Chitosan nanoparticles enhance the antibacterial activity of chlorhexidine in collagen membranes used for periapical guided tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, 58, 1182–1187. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.085>
- Barrino, F., Vassallo, V., Cammarota, M., Lepore, M., Portaccio, M., Schiraldi, C., & La Gatta, A. (2024). A comprehensive in vitro characterization of non-crosslinked, diverse tissue-derived collagen-based membranes intended for assisting bone regeneration. *PLoS ONE*, 19(7), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0298280>
- Buser, D., Urban, I., Monje, A., Kunrath, M., & Dahlin, C. (2023). Guided bone regeneration in implant dentistry: Basic principle, progress over 35 years, and recent research activities. *Periodontology 2000*, 93(1), 9–25. <https://doi.org/10.1111/prd.12539>
- Carreño, J., González, M., Gómez, G., Aguilar, A., Menéndez, M., & Menéndez, M. (2016). Bacterial influence on consolidation of bone grafts in maxillary sinus elevation. *Clinical Oral Implants Research*, 27(11), 1431–1438. <https://doi.org/10.1111/clr.12757>
- Chen, Y., Hung, S., Lin, L., Chi, L., & Ling, L. (2003). Attachment of Periodontal Ligament Cells to Chlorhexidine-Loaded Guided Tissue Regeneration Membranes. *J Periodontol*, 74, 1652–1659. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.11.1652>
- De Sanctis, M., Zucchelli, G., & Clauser, C. (1996). Bacterial Colonization of Bioabsorbable Barrier Material and Periodontal Regeneration. *J Periodontol*, 67, 1193–1200. [10.1902/jop.1996.67.11.1193](https://doi.org/10.1902/jop.1996.67.11.1193)
- Fu, J., Wei, P., Zhao, C., He, C., Yan, Z., & Hua, H. (2014). In vitro antifungal effect and inhibitory activity on biofilm formation of seven commercial mouthwashes. *Oral Diseases*, 20(8), 815–820. <https://doi.org/10.1111/odi.12242>

- Gao, Y., Wang, S., Shi, B., Wang, Y., Chen, Y., Wang, X., Lee, E., & Jiang, H. (2022). Advances in Modification Methods Based on Biodegradable Membranes in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. *Polymers*, 14(5), 1–23. <https://doi.org/10.3390/polym14050871>
- Garcia, J., Dodge, A., Luepke, P., Wang, H., Kapila, Y., & Lin, G. (2018). Effect of membrane exposure on guided bone regeneration: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Implants Research*, 29(3), 328–338. <https://doi.org/10.1111/clr.13121>
- International Organization for Standardization. (2009). Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. *Geneve, Switzerland: International Organization for Standardization*, Art. 10. <https://www.iso.org/standard/36406.html>
- Kichler, V., Teixeira, L., Prado, M., Colla, G., Schuldt, D., Coelho, B., Porto, L., & de Almeida, J. (2021). A novel antimicrobial-containing nanocellulose scaffold for regenerative endodontics. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 46(2), 1–11. <https://doi.org/10.5395/rde.2021.46.e20>
- Kim, K., Su, Y., Kucine, A., Cheng, K., & Zhu, D. (2023). Guided Bone Regeneration Using Barrier Membrane in Dental Applications. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 9(10), 5457–5478. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.3c00690>
- Koban, I., Matthes, R., Hübner, N., Welk, A., Sietmann, R., Lademann, J., Kramer, A., & Kocher, T. (2012). XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär*, 7(7), 1–10. <https://doi.org/10.3205/dgkh000190>
- Krishnamoorthy, A., Lemus, A., Solomon, A., Valm, A., & Neelakantan, P. (2020). Interactions between candida albicans and enterococcus faecalis in an organotypic oral epithelial model. *Microorganisms*, 8(11), 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111771>
- Kunrath, M., Magrin, G., Zorzo, C., Rigotto, I., Aludden, H., & Dahlin, C. (2025). Membranes for Periodontal and Bone Regeneration: Everything You Need to Know. *Journal of Periodontal Research*, 1–23. <https://doi.org/10.1111/jre.70005>
- Lang, N., Hämmeler, C., Brägger, U., Lehmann, B., & Nyman, S. (1994). Guided tissue regeneration in jawbone defects prior to implant placement. *Clin Oral Impl Res*, 5(2), 92–97. 10.1034/j.1600-0501.1994.050205.x
- Lazarevic, M., Petrovic, S., Pierfelice, T., Ignjatovic, N., Piattelli, A., Vlajic, T., & Radunovic, M. (2023). Antimicrobial and Osteogenic Effects of Collagen Membrane Decorated with Chitosan–Nano-Hydroxyapatite. *Biomolecules*, 13(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/biom13040579>
- Lu, F., Xia, K., Su, J., Yi, J., Luo, Z., Xu, J., Gu, Q., Chen, B., & Zhou, H. (2024). Biochemical and structural characterization of chlorhexidine as an ATP-assisted inhibitor against type 1 methionyl-tRNA synthetase from Gram-positive bacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 268, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116303>

- Mahdizade, M., Scholz, K., Cieplik, F., & Al-Ahmad, A. (2025). Viable but non-cultivable state in oral microbiota: a critical review of an underexplored microbial survival strategy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15, 1–30. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1533768>
- Ma, S., Adayi, A., Liu, Z., Li, M., Wu, M., Xiao, L., Sun, Y., Cai, Q., Yang, X., Zhang, X., & Gao, P. (2016). Asymmetric collagen/chitosan membrane containing minocycline-loaded chitosan nanoparticles for guided bone regeneration. *Scientific Reports*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep31822>
- Mejía, K., Rodríguez, A., & Martínez, M. (2025). Insights Into the Mechanism of Action of Chlorhexidine on *Porphyromonas gingivalis*. *International Journal of Dentistry*, 2025(1), 1–10. <https://doi.org/10.1155/ijod/1492069>
- Mombelli, A., Lang, N., & Nyman, S. (1993). Isolation of Periodontal Species After Guided Tissue Regeneration. *Journal of Periodontology*, 64(11S), 1171–1175. <https://doi.org/10.1902/jop.1993.64.11s.1171>
- Naung, N., Shehata, E., & Van Sickels, J. (2019). Resorbable Versus Nonresorbable Membranes: When and Why? *Dental Clinics of North America*, 63(3), 419–431. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2019.02.008>
- Nobile, C., & Johnson, A. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>
- Osorio, R., Yamauti, M., Osorio, E., Ruiz, M., Pashley, D., Tay, F., & Toledano, M. (2011). Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *European Journal of Oral Sciences*, 119(1), 79–85. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2010.00789.x>
- Pierce, C., Uppuluri, P., Tummala, S., & Lopez, J. (2010). A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Visualized Experiments*, (44), 1–4. <https://doi.org/10.3791/2287>
- Popowski, W., Koseski, D., Domanowska, D., Zalewska, M., & Popowska, M. (2025). Bacterial colonization of bone substitute materials used in oral surgery: mechanisms, clinical implications, and preventive strategies—A narrative review. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1715632>
- Rapala, M., Surowiec, M., Juszczak, M., Wronowska, E., Kulig, K., Bednarek, A., Gonzalez, M., Karkowska, J., Zawrotniak, M., Satała, D., & Kozik, A. (2023). Living together: The role of *Candida albicans* in the formation of polymicrobial biofilms in the oral cavity. *Yeast*, 40(8), 303–317. <https://doi.org/10.1002/yea.3855>
- Ren, Y., Fan, L., Alkildani, S., Liu, L., Emmert, S., Najman, S., Rimashevskiy, D., Schnettler, R., Jung, O., Xiong, X., & Barbeck, M. (2022). Barrier Membranes for Guided Bone

- Regeneration (GBR): A Focus on Recent Advances in Collagen Membranes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 1–33. <https://doi.org/10.3390/ijms232314987>
- Roccuzzo, A., Imber, J., Salvi, G., & Roccuzzo, M. (2023). Peri-implantitis as the consequence of errors in implant therapy. *Periodontology 2000*, 92(1), 350–361. <https://doi.org/10.1111/prd.12482>
- Roether, J., Boccaccini, A., Hench, L., Maquet, V., & Gautier, S. (2002). Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass s for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23, 3871–3878. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00131-x](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00131-x)
- Sanz, I., Ortiz, A., Molina, A., & Sanz, M. (2022). Complications in bone-grafting procedures: Classification and management. *Periodontology 2000*, 88, 86–102. <https://doi.org/10.1111/prd.12413>
- Sbricoli, L., Guazzo, R., Annunziata, M., Gobbato, L., Bressan, E., & Nastri, L. (2020). Selection of collagen membranes for bone regeneration: A literature review. *Materials*, 13(3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ma13030786>
- Sela, M., Kohavi, D., Rosen, G., Steinberg, D., & Krausz, E. (2003). Enzymatic degradation of collagen-guided tissue regeneration membranes by periodontal bacteria. *Clin Oral Impl Res*, 14, 263–268. [10.1034/j.1600-0501.2003.140302.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2003.140302.x)
- Shi, X., Li, X., Tian, Y., Qu, X., Zhai, S., Liu, Y., Jia, W., Cui, Y., & Chu, S. (2023). Physical, mechanical, and biological properties of collagen membranes for guided bone regeneration: a comparative in vitro study. *BMC Oral Health*, 23(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12903-023-03223-4>
- Slutzkey, S., Kozlovsky, A., Artzi, Z., & Matalon, S. (2015). Collagen barrier membranes may accelerate bacterial growth in vitro: A potential clinical risk to regenerative procedures. *Quintessence Int*, 46(1), 43–50. <https://doi.org/10.3290/j.qi.a32821>
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. (2000). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology*, 28(1), 12–55. [10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x)
- Soldatos, N., Stylianou, P., Koidou, V., Angelov, N., Yukna, R., Georgios, I., & Romanos, E. (2017). Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. *Quintessence International*, 48(2), 1–17. <https://doi.org/10.3290/j.qi.a37133>
- Susin, C., Fiorini, T., Lee, J., De Stefano, J., Dickinson, D., & Wikesjo, U. (2015). Wound healing following surgical and regenerative periodontal therapy. *Periodontology 2000*, 68, 83–98. <https://doi.org/10.1111/prd.12057>
- Takallu, S., Kakian, F., Bazargani, A., Khorshidi, H., & Mirzaei, E. (2024). Development of antibacterial collagen membranes with optimal silver nanoparticle content for periodontal regeneration. *Scientific Reports*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57951-w>

- Takayama, T., Imamura, K., & Yamano, S. (2023). Growth Factor Delivery Using a Collagen Membrane for Bone Tissue Regeneration. *Biomolecules*, *13*(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/biom13050809>
- Toledano, M., Manzano, F., Ruiz, C., Toledano, M., & Osorio, R. (2021). Testing active membranes for bone regeneration: A review. *Journal of Dentistry*, *105*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2021.103580>
- Toledano, M., Vallecillo, C., Vallecillo, M., Manzano, F. J., & Osorio, R. (2022). Antibiotic-Loaded Polymeric Barrier Membranes for Guided Bone/Tissue Regeneration: A Mini-Review. *Polymers*, *14*(4), 1–11. <https://doi.org/10.3390/polym14040840>
- Toledano, M., Vallecillo, M., Osorio, M., Muñoz, E., Toledano, M., Vallecillo, C., Toledano, R., Lynch, C., Serrera, M., & Osorio, R. (2021). Zn-containing membranes for guided bone regeneration in dentistry. *Polymers*, *13*(11), 1–22. <https://doi.org/10.3390/polym13111797>
- Urban, I., & Monje, A. (2019). Guided Bone Regeneration in Alveolar Bone Reconstruction. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, *31*(2), 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2019.01.003>
- Vallecillo, C., Osorio, M., Infante, N., Ávalos, M., Vallecillo, M., Lynch, C., & Toledano, M. (2024). In Vitro Degradation of Collagen-Based Membranes for Guided Bone Regeneration After Zn-Ions or Doxycycline Functionalization. *Polymers*, *16*(22), 1–14. <https://doi.org/10.3390/polym16223109>
- Verboket, R., Henrich, D., Janko, M., Sommer, K., Neijhoft, J., Söhling, N., Weber, B., Frank, J., Marzi, I., & Nau, C. (2024). Human Acellular Collagen Matrices—Clinical Opportunities in Tissue Replacement. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(13), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms25137088>
- Weitkamp, J., El Hajjami, S., Acil, Y., Spille, J., Sayin, S., Okudan, E., Saygili, E., Veziroglu, S., Flörke, C., Behrendt, P., Wiltfang, J., Aktas, O., & Gülses, A. (2024). Antibacterial properties of marine algae incorporated polylactide acid membranes as an alternative to clinically applied different collagen membranes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *35*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10856-024-06778-y>
- Weyermann, J., Lochmann, D., & Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, *288*(2), 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.09.018>
- Yang, D., Xu, Z., Huang, D., Luo, Q., Zhang, C., Guo, J., Tan, L., Ge, L., Mu, C., & Li, D. (2025). Immunomodulatory multifunctional janus collagen-based membrane for advanced bone regeneration. *Nature Communications*, *16*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-59651-z>
- Yang, Z., Wu, C., Shi, H., Luo, X., Sun, H., Wang, Q., & Zhang, D. (2022). Advances in Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration Techniques. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.921576>

Zelikman, H., Slutzkey, G., Rosner, O., Levartovsky, S., Matalon, S., & Beitlitum, I. (2022). Bacterial Growth on Three Non-Resorbable Polytetrafluoroethylene (PTFE) Membranes—An In Vitro Study. *Materials*, 15(16), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ma15165705>

Anexos

Anexo 1. Solicitud al Comité de Ética



Quito, 5 de febrero de 2026

Estimado,
Comité de ética para aprobación de trabajos de titulación
Universidad de Los Hemisferios

Yo Jimmy Humberto Zambrano Sánchez, estudiante del Posgrado de Cirugía Oral, solicito la revisión de mi tema de titulación titulado: **"Análisis microbiológico de la formación de biofilm en membranas de colágeno y sintéticas reabsorbibles, empleadas en regeneración ósea guiada."** por parte del Comité de ética de la Universidad de Los Hemisferios.

Una vez completada la selección de mi tema de investigación para el trabajo de titulación, el cual ha sido debidamente inscrito en la Dirección Académica de Posgrados Odontología, solicito su análisis y aprobación para el siguiente proyecto: **"Análisis microbiológico de la formación de biofilm en membranas de colágeno y sintéticas reabsorbibles, empleadas en regeneración ósea guiada."**

Adjunto el documento correspondiente para su revisión.

Agradezco de antemano la atención prestada a esta solicitud y quedo a la espera de su respuesta.

Atentamente,



Jimmy Humberto Zambrano Sánchez
Firma del Estudiante



Ing. Boris Hernán Villacrés Granda
Firma del Tutor



Dr. Patricio Unda Jaramillo
Firma del Director



Anexo 2. Aprobación del Comité de Ética



CEUHE25-175

Universidad Hemisferios
Programa de Odontología – Postgrado
Comité de Ética para la Aprobación de Propuestas de Trabajo de Titulación

Quito, 24 de febrero de 2026

Señor/a

Jimmy Humberto Zambrano Sánchez

Presente. –

De mi consideración:

Por medio de la presente, me permito informarle que en la sesión del **Comité de Ética para la Aprobación de Propuestas de Trabajo de Titulación** del programa de **Odontología – Postgrado** de la Universidad de Los Hemisferios, celebrada el 24 de febrero del 2026, su propuesta de trabajo de titulación titulada “Análisis microbiológico de la formación de biofilm en membranas de colágeno y sintéticas reabsorbibles, empleadas en regeneración ósea guiada”, dirigida por el/la tutor/a Boris Hernán Villacrés Granda ha sido **APROBADA**.

El comité ha revisado detalladamente su propuesta y ha determinado que cumple con los principios éticos y metodológicos establecidos, por lo que puede proceder con el desarrollo de su investigación.

En consecuencia, a partir de esta aprobación, adquiere usted la **responsabilidad** de desarrollar su investigación con el máximo rigor académico y ético. Se espera que la ejecución de su tesis se realice de acuerdo con las normas vigentes y en estricto apego a las directrices establecidas por su tutor/a y por el comité. El compromiso con la rigurosidad científica y el respeto a los principios éticos que rigen nuestra institución es primordial para el éxito de su investigación.

A partir de esta aprobación, usted asume las siguientes **obligaciones**:

1. **Rigor académico y ético:** La investigación deberá ser desarrollada con el máximo rigor académico, respetando los estándares éticos establecidos por la Universidad de Los Hemisferios.
2. **Cumplimiento de plazos y normativas:** Es su responsabilidad cumplir con los plazos establecidos para la entrega de avances, así como ajustarse a las normativas vigentes del programa de postgrado, en cuanto a la metodología, presentación de resultados y requisitos formales del trabajo de titulación.

Paseo de La Universidad Nro. 300
 & Juan Díaz (Iñaquito Alto)

uhemisferios.edu.ec



uhemisferios



uhe.official



uhe_oficial



Universidad Hemisferios

1. **Colaboración con su tutor/a:** Deberá mantener una comunicación constante y fluida con su tutor/a, asegurando que todas las fases de la investigación sean supervisadas y aprobadas por este/a, conforme a las directrices del Comité de Ética.
2. **Confidencialidad y uso responsable de la información:** Todo el material y datos obtenidos durante la investigación deberán ser manejados con absoluta confidencialidad, observando las disposiciones legales aplicables, en especial si se trata de sujetos humanos o información sensible.

El incumplimiento de estas obligaciones podría dar lugar a la revisión o suspensión del proceso de titulación, de acuerdo con las políticas de la Universidad.

Le felicitamos por este importante paso y le deseamos éxito en la ejecución de su trabajo de titulación.

Atentamente,



Ph.D Ana del Carmen Armas

Profesor de la Facultad de Ciencias de la Salud



Mtr María Soledad Peñaherrera

Profesor de la Facultad de Ciencias de la Salud



PhD César Alfonso Ulloa Tapia

Director de Docencia e Investigación

Paseo de La Universidad Nro. 300
& Juan Díaz (Iñaquito Alto)

uhemisferios.edu.ec