



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS, MECÁNICAS Y
ADHESIVAS DE UN CEMENTO DE IONÓMERO DE VIDRIO MODIFICADO CON
NANOPARTÍCULAS DE COBRE COMO AGENTE ANTIBACTERIAL

Tesis que presenta

M.I.S. DAVID ALEJANDRO AGUILAR PÉREZ

En opción al título de
DOCTOR EN CIENCIAS
(MATERIALES POLIMÉRICOS)

Mérida Yucatán, México. Enero de 2020.



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **David Alejandro Aguilar Pérez** titulado “**Evaluación de las propiedades físico químicas, mecánicas y adhesivas de un cemento de ionómero de vidrio modificado con nanopartículas de cobre como agente antibacterial**” fue realizado en la Unidad de Materiales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez y codirección del Dr. Cristian Covarrubias Gallardo, y pertenece al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro.

Atentamente.

Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 07 de enero de 2020.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT): proyectos 248378 y 1360 y beca de manutención 483616.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY).

A mi familia y amigos.

A mis maestros.

A mis directores de tesis, Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez, y Dr. Cristian Covarrubias Gallardo de la Universidad de Chile.

A mi comité tutorial; Dr. José Manuel Cervantes Uc y Dr. Conrado Aparicio, por su valioso apoyo en todo momento a lo largo de mi formación.

A los revisores; Dr. Ricardo Peñaloza Cuevas y al Dr. Fernando Hernández Sánchez por sus aportaciones y sugerencias respecto a la tesis.

A la I.Q. Rossana Faride Vargas Coronado, por el apoyo técnico y logístico para las caracterizaciones físico-químicas, así como a los técnicos Silvia Andrade, Javier Cauich, Hugo Carrillo, para las caracterizaciones microscópicas, mecánicas y fisicoquímicas, respectivamente.

A la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes por su contribución para las pruebas celulares.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez, responsable del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Al Dr. Víctor García Pérez y la Dra. Miryam Martínez Hernández del Laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Al proyecto CONACYT No. 268595, convocatoria 2016 de Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica, Fortalecimiento de la Infraestructura Científica del Sureste en el área de Nanomateriales y Nanocompuestos mediante la adquisición de un equipo Raman-AFM.

A la Dra. Patricia Quintana por el acceso al LANNBIO, al M.C. Daniel Aguilar Treviño por su apoyo técnico en la obtención de los difractogramas y al Ing. Wilian Cauich Ruiz por los espectros XPS realizados en el Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales (Financiado por Fomix-Yucatán 2008-108160, CONACYT LAB-2009-01-123913, 292692, 294643, 183445 y 204822), CINVESTAV-IPN. Unidad Mérida.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS	4
General	4
Específicos	4
CAPÍTULO 1	5
ANTECEDENTES	5
1.1 Cementos dentales para aplicaciones como adhesivos	5
1.2 Cemento de fosfato de zinc	5
1.3 Cemento de policarboxilato de zinc	6
1.4 Cemento de ionómero de vidrio	6
1.4.1 Composición del ionómero de vidrio.....	8
1.5 Técnica restaurativa atraumática	10
1.6 Incorporación de agentes antimicrobianos a los CIV	13
1.6.1 Clorhexidina	13
1.6.2 Triclosán	13
1.6.3 Nano partículas de dióxido de titanio.....	14
1.6.4 Propóleo.....	14
1.6.5 Sales de amonio cuaternario	14

CAPÍTULO 2.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.1 Síntesis de las NCu.....	19
2.1.1 Síntesis de partículas de cobre con Polivinilpirrolidona (PnCu).....	19
2.1.2 Síntesis de partículas de cobre con Almidón (AnCu)	19
2.1.3 Síntesis de partículas de cobre mediante reflujo (CuR).....	20
2.2 Caracterización fisicoquímica de las NCu, CIV y CIVM.	20
2.2.1 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	20
2.2.2 Espectroscopia Raman (Raman).....	20
2.2.3 Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS)	21
2.2.4 Microanálisis por energía dispersiva de Rayos X (EDX).....	21
2.2.5 Difracción de rayos X (DRX)	21
2.2.6 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	22
2.2.7 Dispersión de luz (DLS)	22
2.3 Modificación de ionómero de vidrio	22
2.4 Espectrofotometría de absorción atómica de llama	23
2.5 Viabilidad celular de Fibroblastos humanos de pulpa dental (FHPD).....	23
2.6 Pruebas microbiológicas con las cepas <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus sanguinis</i>	24
2.7 Caracterización mecánica.....	25
2.7.1 Compresión.....	25
2.7.2 Flexión	26
2.7.3 Adhesión	27
2.8 Determinación de liberación de flúor	29
2.9 Análisis de Resultados.....	29
CAPÍTULO 3.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1 Caracterización fisicoquímica de las NCu	30
3.1.1 Espectroscopia infrarroja para las PnCu, AnCu y CuR.....	30
3.1.2 Composición elemental obtenida por EDX para las PnCu, AnCu y CuR.....	31

3.1.3 Composición elemental obtenida mediante XPS para las PnCu, AnCu y CuR.....	32
3.1.4 DRX para las PnCu, AnCu y CuR.....	35
3.2 Medición del tamaño de partícula mediante Dispersión de luz para las PnCu, AnCu y CuR.....	38
3.3 Caracterización microscópica de TEM de las PnCu, AnCu y CuR.....	39
3.4 Caracterización fisicoquímica del CIV y CIVM.....	41
3.4.1 FTIR.....	41
3.4.2 Raman.....	43
3.4.3. EDX.....	44
3.4.4 XPS.....	46
3.4.5 DRX.....	49
3.5 Espectrofotometría de absorción atómica de llama	50
3.5 Viabilidad de fibroblastos humanos de pulpa dental.....	51
3.6 Ensayos microbiológicos	52
3.7 Caracterización mecánica.....	55
3.7.1 Ensayos mecánicos de compresión del CIV y CIVM.....	55
3.7.2 Ensayos mecánicos de flexión del CIV y CIVM	57
3.7.3 Ensayo de adhesión.....	58
3.8 Liberación de fluoruro	59
CONCLUSIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Composición de algunos CIV comerciales [18].....	9
Tabla 3.1. Contenido elemental en porcentaje atómico (%) de las PnCu, AnCu y CuR obtenido por EDX.....	32
Tabla 3.2. Contenido elemental en porcentaje atómico (%) de las PnCu, AnCu y CuR obtenidos mediante XPS.....	34
Tabla 3.3. Tamaño de partícula (nm) determinado por la ecuación de Deby-Scherrer.....	37
Tabla 3.4. Contenido elemental (% atómico) del CIV y CIVM con NCu.....	45
Tabla 3.5. Concentración de Cu en eluciones del CIV y CIVM incubadas a 72 h (ppm)...	51
Tabla 3.6. Crecimiento promedio de las UFC del CIV y CIVM contra <i>S. mutans</i> y <i>S. sanguinis</i>	53
Tabla 3.7. Propiedades mecánicas de compresión del CIV y CIVM con NCu. E =módulo elástico (GPa), σ =Esfuerzo máximo (MPa).	55
Tabla 3.8. Propiedades mecánicas de flexión del CIV y CIVM con NCu. E_f =módulo de flexión (GPa), σ =Esfuerzo máximo (MPa).	57
Tabla 3.9. Propiedades mecánicas de adhesión del CIV y CIVM con NCu (MPa).	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Reacción química del polvo de fluoraluminosilicato con el poli(ácido acrílico) para formar el cemento de ionómero de vidrio [16].....	8
Figura 1.2. Mecanismo de acción antibacterial de los iones metálicos afectando la membrana celular [51].....	16
Figura 2.1 Prueba mecánica de esfuerzo máximo de compresión del CIV.....	26
Figura 2.2. Prueba mecánica de esfuerzo máximo de flexión del CIV.....	27
Figura 2.3. Ensayo de adhesión a esfuerzo cortante de un cilindro del CIV adherido al premolar desgastado.....	28
Figura 3.1. Espectros FTIR de nano partículas de cobre sintetizado por diferentes rutas. .	30
Figura 3.2. Vista general del espectro de XPS de PnCu, AnCu y CuR.....	33
Figura 3.3. Espectro de XPS del Cu para las PnCu, AnCu y CuR.....	34
Figura 3.4. Difractograma de partículas de PnCu, AnCu y CuR.....	36
Figura 3.5. Distribución de tamaños de partículas para las PnCu, AnCu y CuR, obtenidas mediante dispersión de luz.....	38
Figura 3.6. Micrografía por TEM de las (a) PnCu, (b) AnCu y (c) CuR, donde se observan partículas de forma esférica con un tamaño promedio de 12.78 nm, 15.38 nm y 10.87 nm, respectivamente.....	40
Figura 3.7. Espectros FTIR de CIV y CIV modificado con NCu a diferentes porcentajes.	43
Figura 3.8. Espectro Raman del CIV y CIV modificado con NCu a diferentes porcentajes.....	44
Figura 3.9. Mapeo por EDX para el elemento Cu en las muestras de CIV y CIVM con diferentes concentraciones de NCu. (a) CIV, (b) CIV + 1% NCu, (c) CIV + 2% NCu, (d) CIV + 3% NCu, (e) CIV + 4% NCu.....	46
Figura 3.10. Espectro de XPS del CIV y CIV modificado con NCu a diferentes porcentajes. 30 segundos de erosión.....	47
Figura 3.11. Espectro XPS del C1s de los CIV y CIVM.....	48
Figura 3.12. Espectro XPS del O1s de los CIV y CIVM.....	49

Figura 3.14. Viabilidad fibroblastos pulpaes en presencia de extractos de CIV modificados con NCu.	52
Figura 3.15. Conteo de las UFC en la difusión en caldo del CIV y CIVM a diferentes concentraciones de NCu. (a) CIV, (b) CIV + 1% NCu, (c) CIV + 2% NCu, (d) CIV + 3% NCu y (e) CIV + 4% NCu. * = conteo de UFC > 1000.	54
Figura 3.16. Curva de esfuerzo máximo y deformación de los ensayos de compresión para los CIV y CIVM con 1, 2, 3 y 4% p/p NCu.	56
Figura 3.17. Curva de esfuerzo máximo y deformación de los ensayos de flexión para los CIV y CIVM con 1, 2, 3 y 4% p/p NCu.	58
Figura 3.18. Liberación de fluoruro en función del tiempo para CIV y CIVM con diferentes concentraciones de NCu.	60

RESUMEN

El Cemento de Ionómero de Vidrio (CIV) es un biomaterial utilizado en Odontología por los beneficios que ofrece, tales como la adherencia química al tejido dental, módulo elástico similar al esmalte y dentina, liberación de flúor (F), entre otros. Sin embargo, existe evidencia de que las restauraciones se pierden por la aparición de caries secundaria y, por tanto, se han hecho esfuerzos por agregarle compuestos antibacteriales como antibióticos, sales de amonio cuaternario, propóleos y nano partículas (NP) de metales. Así, el objetivo del estudio, fue sintetizar partículas nanométricas de cobre (NCu), agregarlas al CIV y evaluar la viabilidad celular y propiedades antibacteriales, sin modificar negativamente las propiedades mecánicas, adhesivas y de liberación de F.

Las nano partículas de cobre (NCu) fueron sintetizadas mediante 3 métodos, basados en la reducción del acetato de Cu con ácido ascórbico y la caracterización se llevó a cabo mediante FTIR, EDX, XPS, DRX, DLS y TEM. Una vez modificado el material con 4 concentraciones diferentes de NCu, se caracterizó por FTIR, mapeo EDX, XPS, DRX y Raman. La viabilidad celular se determinó utilizando fibroblastos humanos de pulpa dental (FHPD) en contacto con los extractos del CIV y CIV modificado (CIVM) con NCu, siendo evaluado con AlamarBlue a distintos tiempos (0-48 h); las propiedades antibacteriales fueron evaluadas con las cepas *S. mutans* y *S. sanguinis* mediante el crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por el método de difusión en caldo y la caracterización mecánica evaluó los esfuerzos máximos a compresión, flexión y adhesión. Al final, se comprobó la liberación de flúor para el material comercial y el modificado con las 4 concentraciones de NCu.

El método para la síntesis de NCu produjo óxido cuproso (Cu_2O), observándose en el espectro de IR residuos del L-ácido ascórbico. Además, el XPS presentó una energía de enlace en 933 y 953 eV que indica la presencia de Cu^{2+} y Cu^0 , respectivamente. La caracterización mediante TEM confirmó el diámetro nanométrico de algunas partículas, con un promedio de 10.87 nm. La viabilidad de los FHPD se redujo al entrar en contacto con todas las muestras, sin embargo, esta viabilidad se mantuvo superior al 74% después de 48 h. Además, se obtuvo un porcentaje de viabilidad superior a 68% cuando las células

estuvieron en contacto con el CIVM. La actividad antibacterial se registró con una reducción del 80% al entrar en contacto con el CIVM a una concentración superior al 1% p/p para ambas cepas. La resistencia a la flexión y compresión resultaron similares entre todos los grupos de CIV y CIVM y la liberación de F se vio reducida cuando se incorporaron las NCu al CIVM.

El CIVM con NCu es un material con potencial antibacterial cuando se modifica en un porcentaje superior al 1% p/p y ésta adición, no compromete significativamente la viabilidad celular en presencia de fibroblastos de origen pulpar. Todo esto, sin afectar el comportamiento mecánico del material.

ABSTRACT

Glass Ionomer Cement (GIC) is a biomaterial used in dentistry due to its benefits such as chemical adherence to both, enamel and dentin, elastic modulus similar to dental tissue and fluoride release. However, there is evidence that these restorations fail due to secondary caries, therefore, efforts have been made to give an antibacterial behavior by incorporating antibiotics, quaternary ammonium salt, propolis and metal nano-particles. Thereby, the aim of this study was to synthesize copper nano-particles (NCu) and to incorporate it to a commercial GIC matrix and to assess its cellular viability against human dental pulp fibroblast (HDPF) and its antibacterial activity against oral cavity strains, as *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*, without negatively affecting both, mechanical and adhesive properties and the fluoride release.

NCu were synthesized using copper acetate reduction with ascorbic acid and its characterization was carried out by FTIR, EDX, XPS, DRX, DLS and TEM. Once obtained a nanometric copper particle, the GIC was modified at 1, 2, 3 and 4 wt.% of NCu and then characterized by FTIR, EDX mapping, XPS, DRX and Raman. HDPF viability was evaluated by AlamarBlue test up to 48 h while antibacterial activity was assessed by CFU growth in broth diffusion test. Mechanical properties were measured by both compressive and flexural strength and by adhesion to dental tissue by shear bond strength test. Finally, fluoride release for CIV and CIVM was tested.

The method of NCu synthesis rendered cuprous oxide (Cu_2O) with L-ascorbic acid residues as observed by FTIR. However, XPS exhibited peaks at 933 and 953 eV, which indicates the presence of Cu^{2+} and Cu^0 , respectively. TEM confirmed the nano-metric size of the particles, with 10.87 nm average size. HDPF viability was reduced after contact with extracts of modified MGIC although it remained up to 74% after 48 h, being this value similar to unmodified GIC extracts (68%). Antibacterial activity showed an 80% reduction in UFC count when both, *S. mutans* and *S. sanguinis* comes into contact with the MCIV at a concentration higher than 1 wt.%, after 48 h. Moreover, bending and compression strength showed similar values between GIC and GICM when 1 and 2 wt.% of NCu were

added. Fluoride release was also reduced when NCu were incorporated into CIVM at concentration greater than 2 wt.%.

In summary, MGIC is a material with antibacterial potential when used at concentrations higher than 1 wt.% of NCu and this modification does not significantly compromise pulp fibroblasts viability and mechanical behavior but only fluoride release.

INTRODUCCIÓN

Con el advenimiento de avances en el área de investigación científica para las diferentes áreas del conocimiento humano, se han descubierto campos de estudio y aplicaciones que se complementan entre sí. En este constante intercambio interdisciplinario, se van abriendo posibilidades para el desarrollo de tecnología, estableciendo con ello la generación de conocimiento *de novo*. Estas virtudes son características del área de la ciencia de la salud, en donde actualmente existe el intercambio de conocimientos multi e interdisciplinarios, haciendo importantes aportaciones para el mejoramiento de implementos médicos, donde hasta hace algunos años, los mejores esfuerzos estaban relacionados con la supervivencia del paciente posterior a la remoción de algún tejido u órgano dañado para después ocuparse de la rehabilitación. Ahora la meta es limitar el daño con la mínima intervención e incluso, establecer medidas preventivas para no permitir que la enfermedad comience.

En el área de la odontología, la ciencia de los materiales dentales ha tenido interacción con la química desde el principio de los tiempos, sin embargo, el desarrollo ha llevado a adaptaciones de los biomateriales según las necesidades. Así, actualmente encontramos en el mercado todo tipo de material que puede usarse, metales, cerámicos y polímeros, incluyendo materiales compuestos. En estos biomateriales, se comenzaron a utilizar antibióticos como aditivos para reducir los casos de infección posquirúrgica, y tan pronto se extendió el uso, surgió el problema de resistencia bacteriana y alergias asociadas. Tal fue el problema que actualmente se han hecho esfuerzos por encontrar otros compuestos para obtener los beneficios de usar agentes antibacteriales, pero sin utilizar antibióticos; así se han incorporado productos sintéticos como las sales de amonio cuaternario y productos naturales como el propóleo.

La caries dental, es una enfermedad que afecta a más del 95% de la población mundial y es la principal causa de extracciones dentales [1]. Está presente en todas las regiones geográficas, estratos socioeconómicos, afectando por igual a todos los niveles etarios y géneros. Existen tres etapas de la caries dental (I a III) en la cual el diente puede ser restaurado afectando al esmalte, dentina, cemento radicular o a los tres juntos. Cuando la enfermedad, que destruye tejidos dentales, es detectada a tiempo, se puede restaurar con

diversos materiales dentales para sustituir el tejido natural degradado. Existen materiales cerámicos llamados cementos de ionómero de vidrio que son utilizados debido a la similitud con el módulo elástico de la dentina, haciéndolo un excelente reemplazo para este tejido. Se utiliza en algunas técnicas restaurativas en las que es imposible utilizar materiales adhesivos que involucran sustancias hidrófobas. Además, existe evidencia de que las restauraciones dentales fallan y se pierden por efectos físicos y químicos que ocurren en el medio bucal constantemente, observándose restauraciones defectuosas que hay que cambiar o reparar en grandes porcentajes. Tal es la relevancia de este problema, que actualmente es necesaria la incorporación de aditivos que mejoren las propiedades mecánicas o antibacteriales de los materiales para evitar el sobre tratamiento de los mismos órganos dentales (OO.DD).

Entre las ventajas de adicionar sustancias antibacteriales como las nano partículas de cobre, es que se utilizan a una baja concentración debido a su mayor área superficial, sin afectar las propiedades mecánicas. En comparación con la modificación tradicional con antibióticos, estos aditivos no generan resistencias bacterianas ni se han reportado reacciones alérgicas secundarias. Por ello, la filosofía de la odontología máximamente preventiva y mínimamente invasiva, ha traído beneficios clínicos favorables al utilizar la técnica restaurativa atraumática (TRA). Sin embargo, existen mejoras que se pretenden resolver con aditivos para evitar la replicación bacteriana, pues se deja tejido potencialmente afectado, con carga bacteriana viable para la proliferación.

Considerando todo lo anterior, en esta investigación se propone la modificación de un cemento de ionómero de vidrio (CIV) con nano partículas de cobre (NCu), como aditivo antibacterial. Se medirán las propiedades antibacteriales, mecánicas y adhesivas previo y posterior a la modificación con las NCu para evaluar los cambios que pudieran encontrarse y reportar las ventajas o desventajas de esta modificación.

HIPÓTESIS

El cemento de ionómero de vidrio modificado con nano partículas de cobre, tendrá acción antibacterial y no modificará las propiedades fisicoquímicas, mecánicas o adhesivas del material.

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de la incorporación de NCu, como inhibidor de la actividad bacteriana, sobre las propiedades físico químicas, mecánicas y adhesivas del CIV.

Específicos

1. Sintetizar nanopartículas de cobre (NCu)
2. Caracterizar fisicoquímicamente NCu mediante FTIR, XPS, SEM-EDX, DRX y TEM.
3. Modificar el cemento de ionómero de vidrio (CIV) con NCu a distintas concentraciones (CIVM)
4. Caracterizar fisicoquímicamente y ópticamente al CIV y CIVM, mediante FTIR, Raman, XPS, SEM-EDX y DRX.
5. Evaluar la viabilidad celular sobre fibroblastos humanos de pulpa dental en contacto con extractos de CIV y CIVM.
6. Evaluar el potencial antibacterial del CIV y CIVM contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*
7. Comparar las propiedades mecánicas de compresión, flexión y adhesión del CIV y CIVM
8. Comparar la liberación de fluoruro del CIV y CIVM.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

Las restauraciones utilizadas en odontología tienen como objetivo principal mantener o reemplazar el tejido dañado o perdido por la caries dental, propiciando una correcta masticación y fonación además de cubrir los requerimientos estéticos cuando sea necesario. Cualquier material en boca debe ser biocompatible y resistir las condiciones del medio ambiente oral.

Existen cuatro grupos posibles de materiales para restaurar tejido dental perdido: metales, cerámica, polímeros y materiales compuestos. A pesar de los avances en el desarrollo de las propiedades físicas de estos materiales, ninguno se puede considerar permanente, debido a la aparición de caries dental posterior a la restauración, llamada caries secundaria [2]. Esta lesión se presenta en la porción adyacente a la obturación por la presencia de biofilm en la interfase de la restauración y el tejido dental, provocando el fracaso de la mitad de las restauraciones dentro de los 10 años posteriores a la colocación [3].

1.1 Cementos dentales para aplicaciones como adhesivos

Los cementos en odontología incluyen al fosfatos de zinc, policarboxilato de zinc y ionómeros de vidrio (CIV), los cuales se clasifican en: a) liners y bases, b) provisionales o temporales y c) permanentes [4].

1.2 Cemento de fosfato de zinc

Está clasificado como un cemento de reacción ácido-básica. La porción básica de esta reacción la constituye el óxido de zinc, además el óxido de magnesio es usado como modificador y puede contener otros óxidos, como el óxido de bismuto y óxido de silicio.

La porción líquida está compuesta esencialmente de ácido fosfórico, agua, fosfato de aluminio y a veces fosfato de zinc.

Cuando se mezcla el polvo con el líquido, se genera una cantidad considerable de calor (reacción exotérmica) y cuando la mezcla se completa, el cemento alcanza un pH de 3.5.

Aunque el material puede ser biocompatible, existen síntomas de hipersensibilidad como efecto secundario desfavorables después de la cementación [4].

1.3 Cemento de policarboxilato de zinc

La mezcla es también una reacción ácido-básica. El polvo está compuesto principalmente de óxido de zinc, óxido de magnesio, bismuto y óxido de aluminio. Puede contener también fluoruro de estaño, lo que aumenta la resistencia a la compresión y flexión. El líquido está compuesto por una solución acuosa de poli(ácido acrílico) o un copolímero de ácido acrílico y otros ácidos carboxílicos [5].

Después de mezclado, la apariencia es más viscosa que el cemento de fosfato de zinc, además las propiedades bioactivas de este cemento son deseables y puede causar poca reacción de la pulpa dental [4].

1.4 Cemento de ionómero de vidrio

El cemento de silicato fue desarrollado por Thomas Fletcher en Inglaterra en 1873, sin embargo, se hace popular hasta 1904 y en 1908 Shoenbeck le añade fluoruro. Estos cementos sílico-fosfatos fueron desarrollados únicamente para cementación [6].

Cuando se comenzó a investigar el problema de la adhesión a los tejidos dentales en 1961, se hizo evidente que se requería de materiales hidrófilos capaces de humectar y reaccionar con la hidroxiapatita (HA) y/o la fase colagénica del tejido del diente para una unión duradera .

El poli(ácido acrílico) fue elegido por la capacidad de formar complejos con calcio y la formación de enlaces de hidrógeno con polímeros orgánicos, como el colágeno. Al

principio, la capacidad de adhesión a esmalte y dentina fue probada *in vitro* e *in vivo* en problemas de ortodoncia.

La investigación y el desarrollo de CIV y materiales que contienen componentes de fluoro-alumino-silicato de calcio, además de una solución acuosa de poli(ácido acrílico), ácido itacónico y ácido tartárico han derivado en modificaciones por motivos de patentes y razones prácticas (Figura 1) [7].

La necesidad de encontrar técnicas económicas, en los lugares donde la tecnología que se utiliza en un consultorio dental no es posible obtenerla, ha tenido el advenimiento de la odontología de mínima intervención, como la restaurativa atraumática y la quimio mecánica para la remoción de caries, debido a que los materiales dentales se adecuarán a estos requerimientos [8].

El CIV es un material basado en agua y conocido como cemento de polialquenoato de vidrio [9], fue introducido por Wilson y Kent en 1971 debido a sus características únicas; como el coeficiente de expansión térmica similar al de la estructura dental, liberación de flúor, propiedades anti cariogénicas, adhesión a la estructura dental, mínima microfiltración y baja citotoxicidad [2,3,10–12]. Sin embargo, aún hay algunas desventajas al utilizar estos materiales, pues tienen baja resistencia a la deformación [13,14].

Actualmente, los cementos de ionómero de vidrio tienen gran significancia en la odontología restaurativa, debido a la adhesión química al tejido dental y liberación de flúor [3]. No solo es utilizado para restauraciones pequeñas, ya que puede ser utilizado para reparar defectos de resinas compuestas, restauraciones con aleaciones cerámicas-metálicas, cementación de coronas y puentes protésicos [15]. Se unen al tejido dental químicamente por medio de quelación, como resultado de una acción ácido-básica con el calcio contenido en el tejido dental [4].

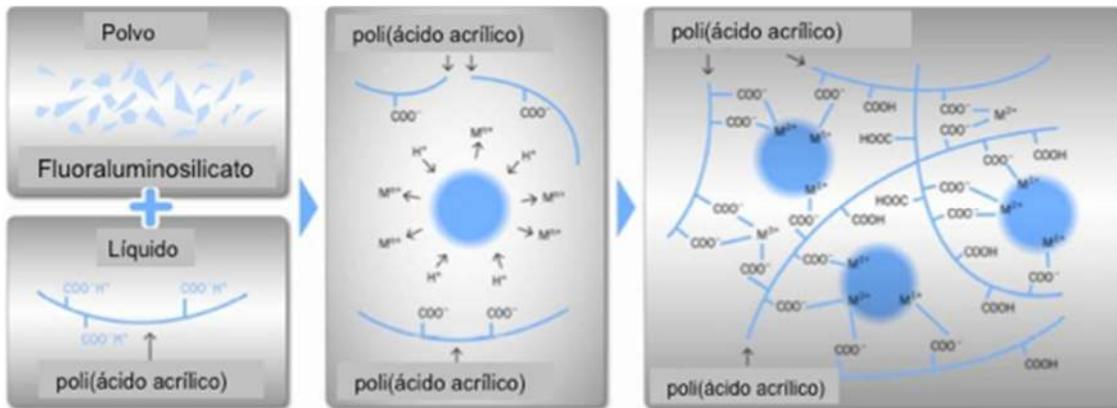


Figura 1.1. Reacción química del polvo de fluoraluminosilicato con el poli(ácido acrílico) para formar el cemento de ionómero de vidrio [16].

1.4.1 Composición del ionómero de vidrio

Los CIV forman parte del grupo de los materiales cerámicos y como tal, está formado por polvo de vidrio de fluoraluminosilicato de calcio. Este material está compuesto por la fusión de cuarzo, criolita, fluorita, trifluoruro de aluminio y fosfato de aluminio a temperaturas de 1100°C a 1300°C [4].

El líquido lo constituye una solución acuosa de poli(ácido acrílico) y ácido tartárico, éste último, incrementa el tiempo de mezclado y la reacción de fraguado. En la Tabla 1 se muestra la composición del polvo y líquido de algunos CIV comerciales.

La reacción ácido-básica de la mezcla causa descomposición, migración, solidificación, ajuste posterior al endurecimiento y maduración más lenta. El poli (ácido acrílico) reacciona con la superficie exterior de las partículas resultantes de la liberación de calcio, aluminio, y iones de fluoruro. Cuando una cantidad suficiente de iones metálicos ha sido liberado, se produce la solidificación y el endurecimiento continúa durante 24 horas aproximadamente [4,17,18].

Tabla 1.1. Composición de algunos CIV comerciales [18].

Material	Composición líquido	Composición polvo
Ketac N100 3M-ESPE, St. Paul, USA	Agua desionizada, ácido polialquenoico modificado con metacrilato	HEMA, FAS
Fuji II LC, GC Corporation, Tokyo, Japan	Agua destilada, poli(ácido acrílico)	HEMA, dimetacrilatouretano, dióxido de silicio, vidrio de aluminosilicato
Fuji IX, GC Corporation, Tokyo, Japan	Agua, poli(ácido acrílico)	Vidrio polibásico de FAS
Ionofil Molar, Voco, Cuxhaven, Germany	Agua, poli(ácido acrílico) puro, ácido tartárico	Vidrio de FAS y pigmentos
Aqua Ionofil Plus, Voco, Cuxhaven, Germany	Agua, poli(ácido acrílico) puro, ácido tartárico	Vidrio de FAS y pigmentos
Argion Molar, Voco, Cuxhaven, Germany	poli(ácido acrílico), ácido de vino	Partículas de plata, vidrio de FAS alcalino

HEMA = Hidroxietilmetacrilato, FAS = fluoraluminosilicato

Existen tres tipos de CIV, dependiendo de las formulaciones y usos: tipo I para aplicación de cementación; tipo II, como material de restauración y tipo III, para usarse como forro o base cavitario.

En estudios *in vitro*, se han evaluado las propiedades físicas de los CIV tipo II de baja y alta viscosidad, coincidiendo en que el de alta viscosidad es significativamente mejor, por lo

que es, el más apropiado para usar en la técnica restaurativa atraumática (TRA) como material restaurador [19].

El CIV tipo II, o de alta viscosidad, fue creado para usar en la TRA debido al tiempo de polimerización relativamente lento y mejores propiedades físico-mecánicas, derivando en un mayor tiempo de vida del material [20]. En un análisis realizado por Van't Hof, *et al.* en 2006 concluyen que aunque el número de estudios acerca del efecto preventivo para caries dental de los CIV es bajo, la retención y efecto preventivo a caries dental de los CIV de alta viscosidad es mayor que la de los de baja viscosidad [21].

Algunas modificaciones posteriores se han hecho para mejorar las propiedades mecánicas como la resistencia al desgaste, una de las propiedades más desafiantes en las restauraciones. Hasta ahora, solo dos materiales con alta resistencia al desgaste se han utilizado: la amalgama y las resinas compuestas. Actualmente, la primera se ha dejado de utilizar debido a los efectos tóxicos del mercurio. Sin embargo, las resinas tienen desventajas propias como una complicada técnica de manipulación, falta de adhesión química al tejido dental, contracción, absorción de agua y alto coeficiente de expansión térmica. Por esta razón, los cementos de ionómero de vidrio se han considerado como un candidato para solucionar los inconvenientes antes mencionados, aunque se ha limitado el uso para sitios con escaso desgaste y bajo estrés, como cavidades en dientes anteriores o cuellos de molares [22].

Los esfuerzos para mejorar la resistencia al desgaste de los CIV incluyen la incorporación de plata y el uso de CIV de alta viscosidad modificados con resina. Por desgracia, ninguno de los anteriores ha mostrado mejoras significativas [22]. Teniendo esto en cuenta, el uso de CIV en la odontología restaurativa pediátrica todavía serían adecuados por las bajas fuerzas oclusales aplicadas a las restauraciones y el tiempo reducido de uso en la cavidad oral [23].

1.5 Técnica restaurativa atraumática

Definida por Frencken y Holmgren en 1999, como la aproximación “máximamente preventiva y mínimamente invasiva para detener el más remoto avance de la caries dental”. Involucra la remoción del tejido dental cariado, reblandecido y completamente desmineralizado con instrumentos manuales, seguido por la restauración de la cavidad con un material adhesivo que selle simultáneamente las fosas y fisuras que pudieran estar en riesgo [24]. Fue presentada en una reunión internacional en Dar es Saalam, Tanzania en la década de los 80. Al inicio, se utilizó con éxito en países de medio y bajo ingreso económico, para finalmente llegar incluso a países de alto nivel de ingreso. La TRA resulta menos incómoda para adultos como niños, observando una respuesta positiva al tratamiento [25,26].

En los primeros años del uso de esta técnica se utilizaba un CIV de viscosidad intermedia, debido a que era el único disponible. A mediados de los años 90, los fabricantes desarrollaron un ionómero de alta viscosidad, el cual tenía mayor resistencia al desgaste. Actualmente, es el ionómero de vidrio indicado para esta técnica [20,23,25,26].

Varios estudios se han realizado para averiguar cuál es el mejor sistema para eliminar la mayor cantidad de tejido afectado; uso de excavadores dentinarios con y sin agentes químicos como el Carisolv, pieza de alta velocidad, etc. De estos estudios, unos son realizados en dientes primarios y otros en dentición permanente.

Estudios concluyen que la remoción incompleta de la dentina afectada por caries y posterior restauración con un material que selle la cavidad ajustadamente resulta en el arresto de la lesión [24].

En un artículo publicado en 2006, Hien Ngo estudia el intercambio químico que existe entre el CIV y el tejido cariado residual en dientes permanentes, utilizando 13 primeros molares permanentes a los cuales les habían hecho tratamientos bajo los lineamientos de TRA. Como sugiere, existen dos capas en la dentina cariada; la externa, altamente infectada por microorganismos que no puede ser remineralizada y la interna, adyacente a la dentina sana, que puede estar parcialmente desmineralizada. Esta última puede contener flora bacteriana que puede ser sellada y tratada con CIV. Los resultados del estudio fueron alentadores, pues reporta que mientras más profunda era la cavidad cariada, mejor condiciones de re mineralización tenía [27].

Desde el inicio, a la composición de los ionómeros de vidrio se les han agregado elementos que ofrezcan no solo mayor resistencia al desalajo, en las pruebas de adhesión al tejido dental o compresión, sino que contribuyan al control bacteriano debajo de las restauraciones [28].

La tendencia actual se ha dirigido hacia el aumento de las propiedades antimicrobianas y biológicas debido a que se ha demostrado que la fuga de iones de flúor debilita la matriz del material y, además de la corta duración y liberación súbita de flúor, ha demostrado ser clínicamente insatisfactorio en la prevención de la descalcificación [29,30].

En algunos ensayos clínicos se ha concluido que los sistemas adhesivos liberadores de flúor no reducen significativamente la descalcificación del esmalte; 50% de los pacientes y 13.5% de los dientes tuvieron descalcificación pos tratamiento [30].

Varios estudios han planteado la problemática que surge tras eliminar parcialmente el tejido dental cariado, pues los materiales tienden a degradarse y volverse rugosos cuando están en contacto con la acumulación de bacterias [31]. Por lo tanto, la adición de ciertos agentes antibacteriales es una estrategia para erradicar la propagación de la caries dental [30].

El agregado más frecuente ha sido la clorhexidina, sin embargo, hay otras sustancias que se han probado; como el triclosán, hclato de doxicilina, dióxido de aluminio, etc.

Estudios recientes buscan cambiar la composición de la matriz del ionómero de vidrio, sustituyendo o adicionando elementos poliméricos con factores antimicrobianos [32]. Se sugiere que con algunos agregados hay diferencias significativas en la actividad anticariogénica, sin modificar las características de adhesión, tal es el caso de la clorhexidina [33], sales de amonio cuaternario [34], fosfato de calcio fosfopéptido amorfo, etc. [35], sabiendo que no es suficiente la liberación de flúor para garantizar la actividad anticariogénica [2,34].

En un estudio de 2010, Mo *et al.*, describieron la microflora existente en las lesiones de caries secundaria; resultando predominantes las cepas *Prevotella*, *Veillonella*, *Lactobacilli*, *Streptococcus mutans*, *Neisseriae* y *Actinomyces*; seguidas por *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* y *Porphyromonas gingivalis* [36].

1.6 Incorporación de agentes antimicrobianos a los CIV

1.6.1 Clorhexidina

Conociendo la concentración mínima inhibitoria de la clorhexidina, cuyo valor es de 1.56 µg/mL [34], en un estudio de Ahluwalia en 2012, agregó 1% p/p de clorhexidina al CIV Fuji IX, evaluando la fuerza de compresión y sellado marginal. No se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P>0.05$), concluyendo que las características de fuerza de adhesión y sellado marginal entre el CIV convencional y el modificado con clorhexidina era similar [37]. Du, en otro estudio de 2012, utiliza un CIV convencional y otro modificado con resina, ambos con 2% p/p de clorhexidina mezclado al polvo del CIV; concluye que después de 24 horas, la vitalidad de las bacterias era menor en el CIV y el CIV modificado con resina al agregar clorhexidina, en comparación con los CIV sin aditivo [33].

Tüzüner, en 2012 publica un estudio en el cual evalúa la dureza de la superficie del CIV Fuji IX. Agrega cetrimida (CT), cloruro de cetilpiridinio (CCP) y clorhexidina (CHX) al polvo del CIV Fuji IX a una concentración de 1 y 2% en masa. Ellos obtuvieron resultados desfavorables en la dureza de la superficie al agregar estos aditivos y concluyeron que estas alteraciones fueron tolerables dentro de las limitantes de la investigación y que convendría evaluar las concentraciones apropiadas en estudios futuros para no alterar las propiedades físicas en situaciones clínicas [38].

1.6.2 Triclosán

Wicht et al., en un estudio de 2005, utiliza el triclosan para evaluar el efecto antimicrobiano en un compómero, al estar en contacto con la dentina excavada de manera incompleta. Concluye que reduce el número de *Lactobacillus*, aún después de 6 semanas, pero no reduce las cuentas totales en cavidad oral. Además, demuestra que la cantidad de bacterias en contacto con el ionómero con agregado de triclosán pueden reducir en número pero no

eliminar por completo los microorganismos asociados a la dentina excavada parcialmente [39].

1.6.3 Nano partículas de dióxido de titanio

Elsaka, evaluó la resistencia a la fractura, resistencia a la compresión, resistencia a la flexión y resistencia de la unión de microtensión, además del potencial antibacteriano en contacto directo contra *Streptococcus mutans*, de un CIV convencional al agregar nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂). Los resultados al agregar 3% de TiO₂ mostraron inhibición del crecimiento bacteriano y mejoraron las propiedades mecánicas. Se encontró que mientras más pequeña la partícula del TiO₂ causa daño intracelular más rápido y que las partículas nanométricas del TiO₂ maximizan el efecto bactericida [40].

1.6.4 Propóleo

Un estudio realizado por Topcuoglu *et al.*, publicado en 2012, utiliza extractos de propóleos para evaluar las propiedades antibacterianas contra el *S. mutans* al agregarse a un cemento de ionómero de vidrio. La MIC obtenida fue de 25 µg/mL. Concluyen que el conteo bacteriano obtenido del ionómero de vidrio convencional, en comparación con el adicionado con propóleos, no tuvo diferencias estadísticamente significativas, además no se evaluó el desempeño en pruebas mecánicas y adhesivas [41]. Otro estudio evaluó *in vitro* la efectividad de extractos de propóleos modificando la fase líquida del CIV en proporciones de 10, 25 y 50% y concluyeron que estas concentraciones aumentaban la micro dureza del material y no afectaban negativamente la micro-filtración [42].

1.6.5 Sales de amonio cuaternario

Hasta ahora, la incorporación de sales de amonio cuaternario ha sido estudiada en resinas compuestas, adhesivos dentinarios y ionómeros de vidrio [43].

Los compuestos de amonio cuaternario han mostrado efectividad en la reducción del crecimiento bacteriano, algunas sales como el cloruro dimetil cetil metacriloxietil amonio y el bromuro de metacrililoiloxidodecilpiridinio son dos monómeros que incluso demostraron actividad bactericida en adhesivos dentales [44].

El efecto del amonio cuaternario con nano partículas de plata tiene un efecto antibacterial potente contra el microcosmo de la placa dental [45]; otro estudio revela la reducción en 5/6 partes al agregarle una sal de amonio cuaternario, en comparación con CIV de uso convencional [46]. En otro estudio, donde evaluaban la actividad anti cariogénica, el amonio cuaternario reveló niveles medios de prevención en caries incipientes [47].

1.7 Aplicación de las partículas de cobre

El cobre es uno de los pocos metales esenciales para la salud humana. En el cuerpo de un adulto se encuentran entre 1.4 y 2.1 mg de cobre por kilogramo de peso, además se estima que una persona ingiere entre alimentos y bebidas cerca de 1 mg de cobre todos los días y al completar los requerimientos nutricionales, el exceso de cobre es liberado dentro de la bilis y excretado en las heces.

El uso del cobre se remonta al 5° y 6° milenio antes de cristo, siendo el primer metal utilizado debido a que se encuentra en forma nativa y no requiere fundición.

Se reporta que los egipcios, en un texto médico de papiro mencionan la aplicación de cobre para esterilizar el agua; además, los griegos, los romanos, los aztecas, entre otros, utilizaron el cobre o los compuestos para el tratamiento de dolencias como dolores de cabeza, quemaduras, parásitos intestinales e infecciones del oído y el mantenimiento de la higiene en general [48,49].

El cobre se considera seguro para los seres humanos como se ha demostrado entre otras cosas por el uso generalizado y prolongado de dispositivos intrauterinos de cobre (DIU) y en contraste con la baja sensibilidad del tejido humano al cobre, los microorganismos son extremadamente susceptibles [49].

La manera en que funciona como agente antibacterial (**Figura 1.2**) se debe a que posee un electrón donador/receptor por la alternancia entre los estados redox Cu (I) y Cu (II), lo que podría causar daño celular [48,50] y según Grass *et al.*, en un estudio de 2005, tiene las siguientes capacidades:

1. Los iones de cobre se liberan y causa daño celular
2. La ruptura de la membrana celular debido al cobre y otros fenómenos de estrés, lleva a la pérdida del potencial de membrana y contenido citoplásmico.
3. Los iones de cobre inducen la generación de especies reactivas de oxígeno, lo que causa daño celular
4. El ADN genómico y plasmático se degrada debido a la entrada de iones de cobre

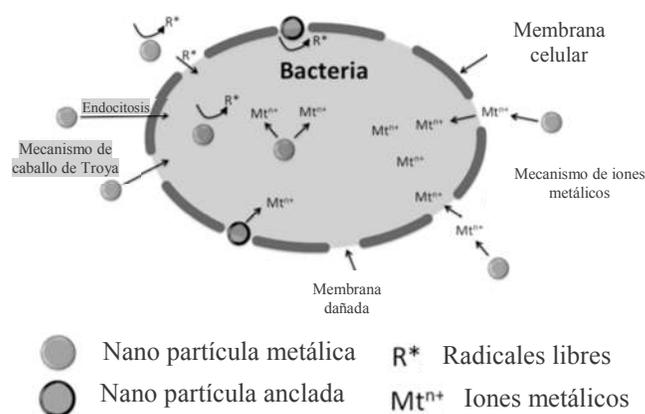


Figura 1.2. Mecanismo de acción antibacteriana de los iones metálicos afectando la membrana celular [51].

Mathewus, en un estudio de 2015 en el que el cobre entraba en contacto con una superficie de acero, concluye que la reducción de Cu^{+2} a Cu^+ por la superficie del acero juega un papel importante en el proceso de la muerte celular. Estos hallazgos subrayan la mayor toxicidad de Cu^+ en comparación con Cu^{+2} y sugiere materiales antimicrobianos novedosos basados en aleaciones de hierro capaces de liberar el cobre [52].

Toda vez conocido el potencial de acción de este elemento, la necesidad de utilizar partículas de tamaño nanométrico se vuelve fundamental debido a que al reducir el tamaño, aumenta la bioactividad [53–55].

Las nano partículas se pueden sintetizar por tres diferentes métodos: Químicos, físicos y biológicos. Todos con la finalidad de proporcionar un tamaño y forma controlado. Entre estos métodos, el método de reducción química se ha encontrado para ser el más versátil para la obtención de nanopartículas metálicas [54].

El pequeño tamaño y alta relación de superficie a volumen les permite interactuar estrechamente con las membranas microbianas. Las nanopartículas de metales con actividad bactericida se pueden inmovilizar en recubrimientos superficiales, que pueden encontrar aplicación en diversos campos, es decir, instrumentos y dispositivos médicos.

Uno de los aspectos más desafiantes en la síntesis de las nano partículas es la alta tendencia a la oxidación. A diferencia del oro y la plata, el cobre es extremadamente sensible al aire.

Por lo tanto, la formación de una capa superficial de óxido de cobre en nanopartículas es difícil de evitar. Raramente se puede obtener un método en la literatura que produzca nanopartículas de cobre puro, a menos que todo el procedimiento se lleve a cabo bajo una atmósfera inerte o reductora. Por ello, la encapsulación de las partículas con cubiertas orgánicas o inorgánicas como carbón o silicio, pueden ser utilizadas para evitar la oxidación [54].

Los materiales que contienen cobre y los recubrimientos con actividad antimicrobiana puede encontrar aplicación: en la medicina para reducir las infecciones en los hospitales, en el tratamiento de quemaduras, así como para evitar que las bacterias y los hongos colonicen sobre prótesis, catéteres, injertos vasculares, materiales dentales, etc. [53,56].

Actualmente, el uso de partículas metálicas nanométricas como el Cu se encuentran entre los materiales que han sido estudiados debido a que permiten la liberación de iones a través de soluciones, aportando actividad antibacterial [57], pues la reducción del tamaño incrementa el área de interacción con las bacterias [53].

El óxido de cobre II (CuO) ha sido utilizado en el área biomédica debido a la propiedad antibacterial de los iones Cu [58] contra algunas cepas bacterianas como *E. coli* (Gram negativa) y *S. aureus* (Gram positiva), siendo más efectivo contra las primeras [59] e

incluso contra el “super microbio” *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés) [58], aunque se reporta como principal desventaja la potencial acción tóxica [60–62].

El propósito de este estudio experimental *in vitro*, será evaluar la capacidad antimicrobiana realizando pruebas de difusión en caldo de un CIV modificado con nano partículas de cobre. Una vez adicionadas las NCu, se evaluaron las propiedades físico químicas, mecánicas y adhesivas del material.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Síntesis de las NCu

Se siguieron 3 métodos para la síntesis de las nanopartículas de cobre.

2.1.1 Síntesis de partículas de cobre con Polivinilpirrolidona (PnCu)

Siguiendo la metodología propuesta por Wei *et al.* [63], se preparó una solución de acetato de cobre al 0.2 mmol/L. Posteriormente se disolvieron 10 g de PVP y 17.259 g de ácido ascórbico en 1 L de agua desionizada en agitación constante a una temperatura de 80°C durante 8 horas. Las partículas obtenidas se dejaron decantar durante 12 h y finalmente, se retiró el sobrenadante para recuperar las PnCu y se llevaron a 3 ciclos de 15 minutos de redispersión en etanol en una centrífuga (Sorvall RC 5B Plus, Dupont, Michigan, Estados Unidos) a 8000 revoluciones por minuto (rpm). Una vez obtenida la muestra se evaporó el etanol y se secó en una estufa Yamato modelo ADP300C (Yamato Scientific America Inc, Santa Clara, California, Estados Unidos) a 60°C bajo condiciones de vacío (-70 kPa).

2.1.2 Síntesis de partículas de cobre con Almidón (AnCu)

Para esta síntesis, se utilizó L-ácido ascórbico y almidón como agentes reductores y estabilizantes, respectivamente. Como precursor del cobre se usó una solución de acetato de cobre. El almidón (1 g) se disolvió en una solución de ácido ascórbico al 10% (92.1 mg en 100 mL) para alcanzar un pH de 2. Una vez homogenizado el almidón, se hizo reaccionar durante 20 segundos en el microondas y posteriormente se le agregaron 7.9 mL de la solución de acetato de cobre a 0.2 M (0.91 g en 25 mL de agua desionizada). Esta mezcla, se hizo reaccionar durante 60 segundos en el microondas y las partículas se decantaron después de 24 h. Al día siguiente se realizaron 5 ciclos de re dispersión y lavado con agua

desionizada por medio de centrifugación durante 45 minutos a 8000 rpm. El sólido obtenido se congeló a -80°C y luego se desecó mediante liofilización durante 48 h.

2.1.3 Síntesis de partículas de cobre mediante reflujo (CuR)

Para la obtención de las partículas sin estabilización con polímero se utilizó una solución de acetato de cobre 1 mM (46.33 mg en 250 mL de agua desionizada) y se calentó en reflujo hasta llegar a 80°C y después se le agregó una solución de L-ácido ascórbico en una relación 2:1 mM al acetato de cobre (88 mg en 25 mL de agua desionizada). Esta mezcla se hizo reaccionar en agitación constante durante 30 min y posteriormente se centrifugó a 8000 rpm, para la recuperación de las partículas, en 5 ciclos de 20 minutos. El sólido obtenido se congeló a -80°C y luego se secó mediante liofilización durante 48 h.

2.2 Caracterización fisicoquímica de las NCu, CIV y CIVM.

2.2.1 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Las NCu obtenidas fueron analizadas por FTIR, utilizando pastillas de KBr. Los espectros fueron obtenidos en el intervalo espectral de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, con 100 barridos y resolución de 4 cm^{-1} , empleando un espectrofotómetro con transformada de Fourier de Nicolet modelo Thermoscientific Nicolet 8700 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

2.2.2 Espectroscopia Raman (Raman)

Los espectros Raman del CIV y CIVM fueron obtenidos mediante un espectrómetro inVia Renishaw (Renishaw, Wotton-under-Edge, Reino Unido) sobre muestras de CIV y CIVM. El sistema obtuvo datos en un intervalo espectral entre 3300 cm^{-1} y 100 cm^{-1} . La fuente de radiación de excitación utilizada fue un láser de argón de 633 nm al 5% y 3 acumulaciones.

2.2.3 Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS)

Para la validación de la composición química y grado de oxidación de las NCu se realizó el análisis por XPS, con un equipo Thermo Scientific K-Alpha X-ray Photoelectron Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), con una fuente monocromática de Al K α con una energía de 1486.6 eV. Las muestras se corrieron con 30 s de erosión con iones de Argón (Ar). Se bajó la presión hasta 5e-9 mbar y se aplicó compensación de cargas estáticas con un haz de iones de Ar, lo que eleva la presión hasta 1e-7 mbar. El área elíptica de análisis tuvo un diámetro mayor de 0.4 mm.

2.2.4 Microanálisis por energía dispersiva de Rayos X (EDX)

La composición elemental de las NCu, del CIV y del CIVM, fue obtenida mediante microanálisis EDX. Para este fin se empleó un equipo X-sight Model 7582 (Oxford Instruments, Abingdon, Reino Unido), acoplado al MEB utilizando un haz de 20 keV.

2.2.5 Difracción de rayos X (DRX)

Los difractogramas de rayos X de las nano partículas fueron obtenidos en un difractómetro Siemens D5000 (Siemens AG, Múnich, Alemania), con radiación CuK α ($\lambda = 1.5416 \text{ \AA}$ o 0.154 nm), con un tamaño de paso de 0.02° y un tiempo de conteo de 3 s, en el intervalo 2θ de 5° a 60°.

2.2.5.1 Determinación de tamaño de partícula por ecuación de Debye Scherrer

El diámetro de la partícula (d) en nanómetros, se calcula sustituyendo los valores, donde K es la constante para partículas esféricas (0.9), λ es la longitud de onda del Rayos X en

Angstroms, β es el ancho de la altura media de los picos de difracción y θ es el ángulo de Bragg [64].

$$d = \frac{\kappa\lambda}{\beta_{1/2} \cos \theta} \quad (1)$$

2.2.6 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión se realizó con un equipo JEOL, modelo JEM-ARM200F (Laboratorio japonés de energía óptica Co. Ltd., Tokio, Japón), aplicando técnicas CTEM y STEM a 200 keV con una apertura de 50 μm con un nivel de vacío de 2×10^{-5} Pa.

2.2.7 Dispersión de luz (DLS)

El tamaño (diámetro hidrodinámico) y distribución de tamaño de las NCu fue determinado por dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) con el equipo Nano Zetasizer Malvern, modelo nano ZS (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, Reino Unido). Se utilizó el índice de refracción del Cu de 0.637 disperso en agua con densidad a 25 °C de 1.0031 g/cm^3 y un índice de refracción $n=1.33$.

2.3 Modificación de ionómero de vidrio

Después de la caracterización de las 3 vías de síntesis de las NCu, se decidió utilizar las CuR debido al porcentaje atómico del elemento Cu cuantificado y por no tener contenido polimérico en las paredes de la partícula que reduciría la superficie en contacto directo con las membranas bacterianas una vez mezclado en la matriz del CIV. Así, el CIV (Fuji IX, GC Corporation, Tokio, Japón) se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante

(proporción polvo/líquido 3.4/1 mg/mg) y al CIV se incorporó para la modificación 1%, 2%, 3% y 4% p/p de NCu. Estos especímenes serán denominados como CIV + 1% NCu, CIV + 2% NCu, CIV + 3% NCu y CIV + 4% NCu y estas composiciones serán conformadas con las dimensiones que requiera cada ensayo. Ej. Para los cilindros de 4 mm de diámetro con 6 mm de altura se utilizaron 230 mg de polvo y 67.64 mg de líquido y para la modificación al 1% se agregaron 2.97 mg de las NCu, todas las muestras fueron pesadas en una balanza analítica.

2.4 Espectrofotometría de absorción atómica de llama

Se determinó la concentración de cobre (ppm) en cinco muestras líquidas con eluciones del CIV y CIVM incubadas a 72 h, mediante espectrofotometría de absorción atómica de llama, en un instrumento marca Thermo Scientific modelo Serie M 650718 v1.27 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). La señal analítica fue obtenida en el modo de absorbancia, a una longitud de onda de 343.8 nm, con rendija de 0.5 nm y lámpara de deuterio como corrección de fondo. Para la llama, se empleó una mezcla de gases aire-acetileno, con flujo de combustión de 1.1 L/min, con una altura de mechero de 7.0 mm. Se realizó una calibración externa con un estándar de cobre para espectrofotometría de absorción atómica, marca Sigma-Aldrich TraceCERT, lote BCBT4020, en un intervalo de concentraciones de 0.1 a 10 mg/L. Los resultados tuvieron un ajuste de 0.9998 para la función cuadrática $Y = -0.001711x^2 + 0.08041x + 0.0004$. Las muestras fueron acidificadas al 1% con ácido nítrico marca Fermont "trace ppb", lote PB01413.

2.5 Viabilidad celular de Fibroblastos humanos de pulpa dental (FHPD)

Los fibroblastos fueron aislados de terceros molares extraídos por indicaciones en el diagnóstico de ortodoncia. Posterior a la extracción dental, los molares fueron almacenados en un tubo de 50 mL con medio de cultivo Dulbecco modificado (DMEM; Thermo Scientific HyClone, Logan, UT, USA), antibiótico y antimicótico (100 IU/mL de

penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 0.3 µg/mL de fungizona). La pulpa se obtuvo mediante un corte cervical de la corona del tercer molar utilizando un disco de diamante en un micromotor, para acceder al conducto radicular y extraer la pulpa con una lima de endodoncia número 20. Después, la pulpa se colocó en un tubo de 5 mL con trispina-EDTA al 0.25% durante 5 minutos en incubación a 37°C. Así, los tubos fueron centrifugados a 5000 rpm y luego el sobrenadante se removió para obtener el contenido celular y re-suspender nuevamente con 1.5 mL de DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco, Carlsbad, CA, USA), antibiótico y antimicótico (100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 0.3 µg/mL de fungizona). El contenido obtenido, se colocó en una placa de 6 pozos con 2 mL de DMEM y se dejó incubar a 37°C en un ambiente con 5% de CO₂ y 100% de humedad. Las células obtenidas después de 3 semanas (con cambio de medio cada tercer día) hasta alcanzar un 80% de confluencia fueron transferidas como el primer pasaje a un frasco de cultivo de 75 cm².

Los ensayos de viabilidad se realizaron con discos de CIV y CIVM (6.35 mm de diámetro y 1 mm de espesor) esterilizados bajo UV durante 30 minutos por lado y luego depositados en tubos de 5 mL conteniendo 2.5 mL de DMEM e incubados a 37°C durante 72 h para obtener los extractos. La siembra de los fibroblastos se realizó 24 h antes del ensayo y se sembraron en 100 µL del DMEM ajustado a 1.5×10^3 células/mL en una placa de 96 pozos incubados a 37°C con 5% CO₂ y 100% de humedad. Después de la incubación, el medio fue desechado y se agregaron 100 µL de DMEM fresco y 100 µL de los extractos experimentales. Para el seguimiento de la viabilidad, se depositaron 20 µL de Alamar-Blue en cada pozo y se realizaron las lecturas en un lector de placas (Cytation 3, Biotek) a 570 nm a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h.

2.6 Pruebas microbiológicas con las cepas *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*

El ensayo fue realizado utilizando discos (6.35 mm de diámetro y 1 mm de espesor) de CIV y CIVM con concentraciones de 1, 2, 3 y 4% p/p de NCu. Se probaron 5 grupos de 3 especímenes cada uno contra las cepas bacterianas liofilizadas obtenidas de la colección de

cultivos de naturaleza americana (ATCC, por sus siglas en inglés, Rockville, MD, USA), *S. mutans* (ATCC 23175) y *S. sanguinis* (ATCC 10556), las cuales fueron rehidratadas en caldo de Mycoplasma suplementado al 5% de sangre de cordero desfibrinada, 5 mg/mL de Hemina y 0.3 mg/mL de Menadiona bajo condiciones de anaerobiosis (80% N₂, 10% CO₂, and 10% H₂). Después de 5 días de incubación, se recolectaron las cepas y se almacenaron en caldo a una densidad óptica (DO) 600 nm = 1 en un espectrofotómetro (Eppendorf BioPhotometer D30, Germany). Los discos de CIV y CIVM esterilizados en UV fueron colocados individualmente en una caja de 48 pozos y se agregaron sobre las muestras 1x10⁶ células/mL de una suspensión para cada cepa en un volumen de 1000 µL. Las placas fueron incubadas durante 48 h a 35°C bajo condiciones de anaerobiosis y después de este tiempo, el medio de cultivo fue desechado y las muestras se transfirieron a una nueva placa con 1000 µL de caldo estéril para después sonicar en 3 ciclos de 5 segundos. Así, se tomó una alícuota de 100 µL de la suspensión sonicada para luego sembrarla en una caja de Petri con Agar de Mycoplasma, esparciendo en la superficie y dejando incubar durante 48 h en condiciones anaeróbicas. Después de la incubación, el número total de unidades formadoras de colonias (UFC) fue contada en cada plato para determinar el efecto antibacterial de las muestras experimentales.

2.7 Caracterización mecánica

2.7.1 Compresión

El ensayo a compresión se realizó de acuerdo a la norma ISO 9917 [65], en una máquina de pruebas universales Shimadzu AG1-100 (Shimadzu Co., Kioto, Japón) (Figura 2.1), con una celda de carga de 5 kN, a una velocidad de cabezal de 1 mm/min., ensayándose 5 grupos con 5 muestras experimentales cada uno. De acuerdo con el estándar, se usaron cilindros de 4 mm de diámetro y 6 mm de alto. La prueba de compresión consiste en colocar el cilindro entre dos placas planas, una fija y otra móvil sujeta al cabezal de la máquina de pruebas universales. Con esta prueba se determinó el esfuerzo máximo (MPa),

el módulo elástico a compresión y el porcentaje de deformación, mismos que fueron graficados con el programa Origin.

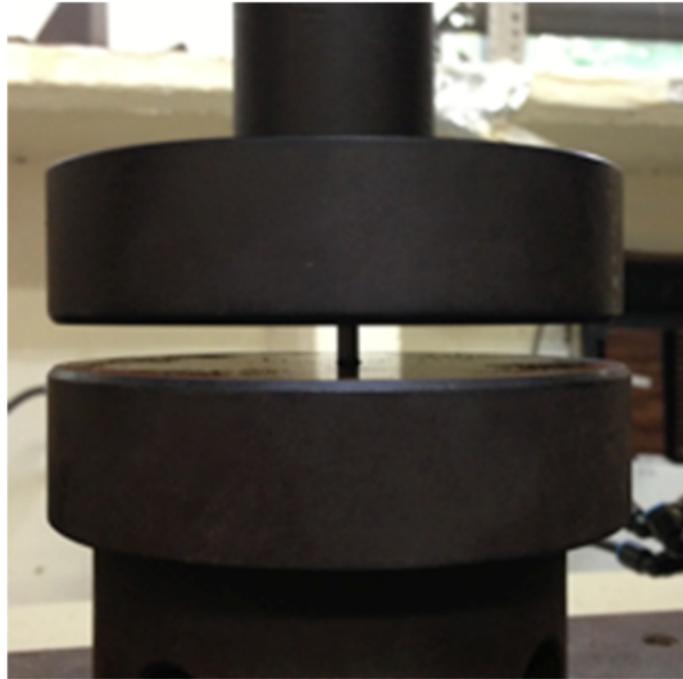


Figura 2.1 Prueba mecánica de esfuerzo máximo de compresión del CIV.

2.7.2 Flexión

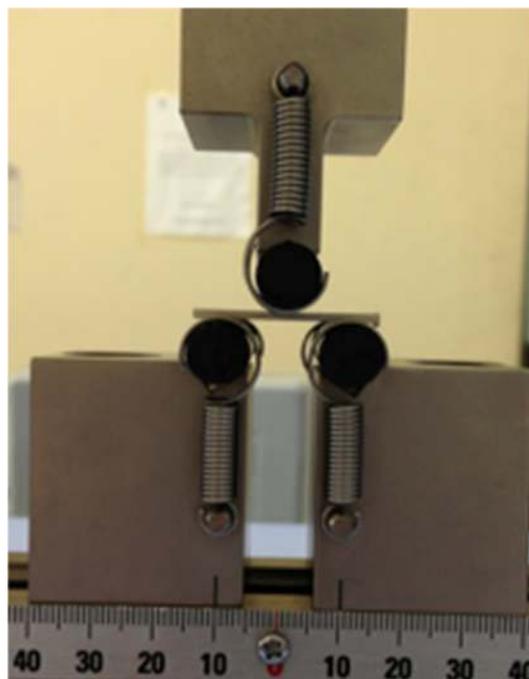


Figura 2.2. Prueba mecánica de esfuerzo máximo de flexión del CIV.

El ensayo a flexión a tres puntos (20 mm entre mordazas) se realizó de acuerdo a la norma ISO 9917-2 (Shimadzu Co., Kioto, Japón) [66], empleando igualmente una máquina de pruebas universales mini Shimadzu AG1-100 con una celda de carga de 1 kN y una velocidad de cabezal de 1 mm/min, ensayándose 5 grupos con 5 muestras experimentales cada uno, deteniéndose la prueba cuando se alcanzó la falla del material. Los especímenes tuvieron una forma rectangular con dimensiones de 25 mm de largo, 5 mm de ancho y 2 mm de espesor. El ensayo a flexión consiste en colocar la probeta entre dos apoyos simples y aplicando una carga vertical en el centro longitudinal de la probeta (Figura 2.2). Con esta prueba se determinó el esfuerzo máximo (MPa), el módulo elástico a flexión y porcentaje de deformación.

2.7.3 Adhesión

La selección de las muestras se basó en las recomendaciones de la especificación ISO/TS 11405:2015 [65] y los especímenes fueron preparados y evaluados según la norma ISO 29022:2015 [68].

Para la obtención de los premolares se elaboró una carta de consentimiento informado, la cual fue proporcionada a cada paciente donador, procedentes de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán (FOUADY).

Siguiendo las indicaciones de la norma para las pruebas de adhesión, se utilizaron 5 premolares por grupo (n=5) extraídos sanos y completos; se limpiaron, eliminando tejido blando remanente para la posterior conservación y se almacenaron en un recipiente de vidrio con agua destilada, a una temperatura de 5°C en un refrigerador.

Se prepararon las muestras colocando la parte más plana del molar en contacto con una superficie lisa en el centro de un anillo de aluminio de 1 pulgada de diámetro. Se rellenó el interior del anillo con polímero Nic-Tone y monómero de la misma marca. Para evitar que la exotermia de la polimerización afecte al tejido dental, se aisló con plastilina un área de 3 mm². La mezcla polimerizada se retiró del anillo y se realizaron desgastes de 2 mm por la parte en contacto con la superficie plana hasta descubrir dentina con un área mayor a 5 mm². Para esto, se utilizó papel abrasivo de carburo de silicio de grano 600, en un pulidor metalográfico Buehler Ltd. a 500 rpm. Se almacenaron en agua a 5°C durante 24 h. Al día siguiente, se montaron las muestras en un aditamento para determinar la fuerza de adhesión utilizando el CIV y CIVM con las NCu siguiendo las especificaciones de mezcla del fabricante y previo acondicionamiento de los tejidos durante 20 s con el poli(ácido acrílico). Se almacenaron las muestras en agua a 37±2°C en una estufa de convección marca Felisa durante 24 horas. Pasado este tiempo se eliminaron los excedentes con hoja de bisturí #5 y se realizó la prueba de adhesión en una máquina de pruebas universales Shimadzu AG1-100 con una celda de carga de 1 kN a una velocidad de cabezal de 1 mm/min (Figura 2.3), deteniéndose la prueba cuando ocurrió el desprendimiento del material.

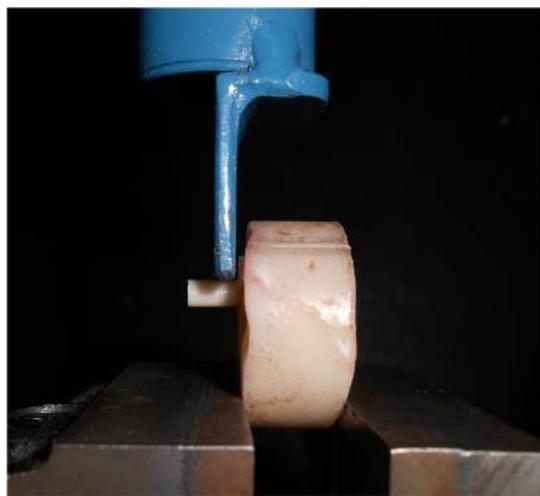


Figura 2.3. Ensayo de adhesión a esfuerzo cortante de un cilindro del CIV adherido al premolar desgastado.

2.8 Determinación de liberación de flúor

Para evaluar la liberación de fluoruro se prepararon especímenes con una geometría cilíndrica (altura de 7.16 mm y diámetro de 3.87 mm y un peso promedio de 0.17 g). La determinación de la cantidad de fluoruros liberados se realizó en 5 grupos con n=3 por grupo para las diferentes concentraciones del CIV y CIVM. Estas muestras fueron almacenadas para recuperar la liberación de fluoruro en una incubadora a 37°C durante 48 h, 7, 14, 21 y 28 días.

La liberación se midió en un equipo pH/Ion Oakton modelo 510 (Oakton Instruments, IL, USA) con una curva de calibración preparada con cuatro soluciones estándar ajustadas a 1, 10 y 100 ppm de fluoruro. Posteriormente en un vaso de precipitado de 50 ml se depositaron las eluciones a los diferentes tiempos de almacenamiento (48 h, 7, 14, 21 y 28 días) en 5 ml de agua desionizada, posteriormente se agregó 100 µL de una solución ajustadora de fuerza iónica (ISA, por sus siglas en inglés) para obtener el potencial en ppm y anotarlos en un documento de la base de datos Excel.

2.9 Análisis de Resultados

Los datos fueron evaluados utilizando el software Minitab (Minitab Limited Coventry, Reino Unido). Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con post-hoc Tukey con un nivel de significancia de $p = 0.05$ para realizar comparaciones múltiples.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización fisicoquímica de las NCu

3.1.1 Espectroscopia infrarroja para las PnCu, AnCu y CuR

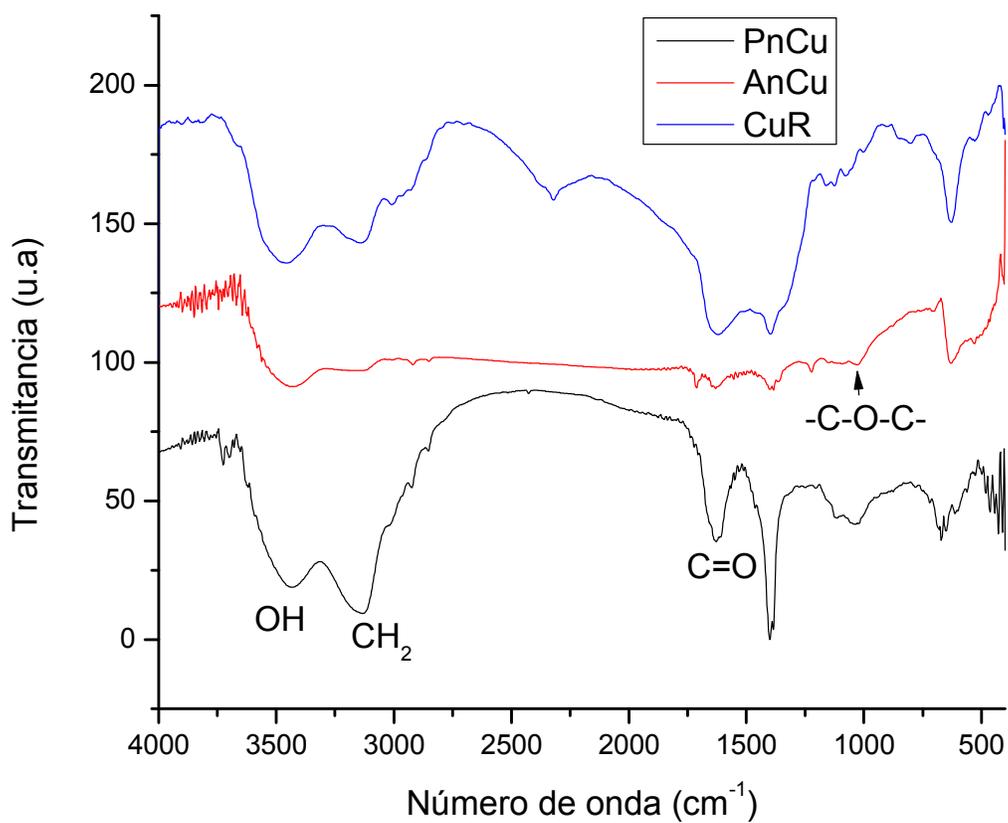


Figura 3.1. Espectros FTIR de nano partículas de cobre sintetizado por diferentes rutas.

La figura 3.1 muestra el espectro de IR para las partículas sintetizadas por 3 rutas, en donde las obtenidas a partir de la polivinilpirrolidona (PnCu) mostraron absorciones a 3448 cm^{-1} asociada al estiramiento del grupo funcional OH, mientras que a 2923 cm^{-1} se asigna al estiramiento simétrico del grupo CH_2 de la PVP. El análisis del Cu sintetizado con PVP como estabilizador, mostró bandas en 1629 cm^{-1} debido a la flexión del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$). No se encontraron bandas cercanas a 1292 cm^{-1} (estiramiento de C-N-C) como lo reporta Anasuya *et al.* [63].

También se observa que en el espectro de las partículas sintetizadas con almidón (AnCu) hay una banda en 3290 cm^{-1} asociada al estiramiento del grupo funcional OH, mientras que a 2921 cm^{-1} se asigna al estiramiento simétrico del grupo CH_2 del almidón. El análisis del Cu sintetizado con almidón como estabilizador, mostró bandas en 1027 cm^{-1} debido al estiramiento $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ correspondiente al grupo éter del almidón. Además, de acuerdo con Castaño *et al.*, reportan que las bandas registradas entre $700\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ se asignan a las vibraciones Cu-O, confirmando la formación de Cu_2O [69,70].

El análisis, comparado con lo publicado por Valodkar M en 2012, solo muestra bandas en 1650 cm^{-1} y 1015 cm^{-1} y no hay cambios que indiquen la unión del cobre con el almidón pues no se observaron en nuestro espectro, bandas en 1605 cm^{-1} y 1085 cm^{-1} [57].

En el espectro para las CuR, de acuerdo con lo reportado por Umer *et al.*, se observa la presencia del L-ácido ascórbico. La vibración del estiramiento del $\text{C}=\text{C}$ y la banda flexión del grupo hidroxilo, O-H, se observaron en 1620 y 1398 cm^{-1} respectivamente, mientras que para el autor fueron observados en 3312 , 1635 , 1567 y 1377 cm^{-1} [71].

3.1.2 Composición elemental obtenida por EDX para las PnCu, AnCu y CuR

El análisis elemental EDX se utilizó para cuantificar el porcentaje atómico (Tabla 3.1) de los elementos que se detectaron en las tres síntesis de las partículas de Cu, donde se confirmó la presencia de Cu, C y O [72–74]. Los picos encontrados en 0.52 keV corresponden al OK_α , en 0.27 keV al carbón (CK_α) y los picos en 0.85 , 0.94 , 8.04 y 8.94 keV corresponden a CuL_1 , CuL_α , CuK_α y CuK_β respectivamente, como lo describe Khan *et al.* al sintetizar NCu a partir de sulfato de cobre pentahidratado, ácido ascórbico como

reductor y almidón como agente estabilizante [64]. Así, como reporta Valodkar *et al.*, el C y O están relacionados con las moléculas que recubren a las partículas de Cu durante la síntesis [57].

Tabla 3.1. Contenido elemental en porcentaje atómico (%) de las PnCu, AnCu y CuR obtenido por EDX.

Elemento	PnCu	AnCu	CuR
C	53.78 (± 21.00)	47.65 (± 27.27)	20.86 (± 6.7)
O	4.62 (± 1.65)	5.56 (± 1.57)	33.17 (± 7.54)
Cu	41.60 (± 22.56)	46.79 (± 26.52)	45.97 (± 10.34)
Total	100	100	100

3.1.3 Composición elemental obtenida mediante XPS para las PnCu, AnCu y CuR

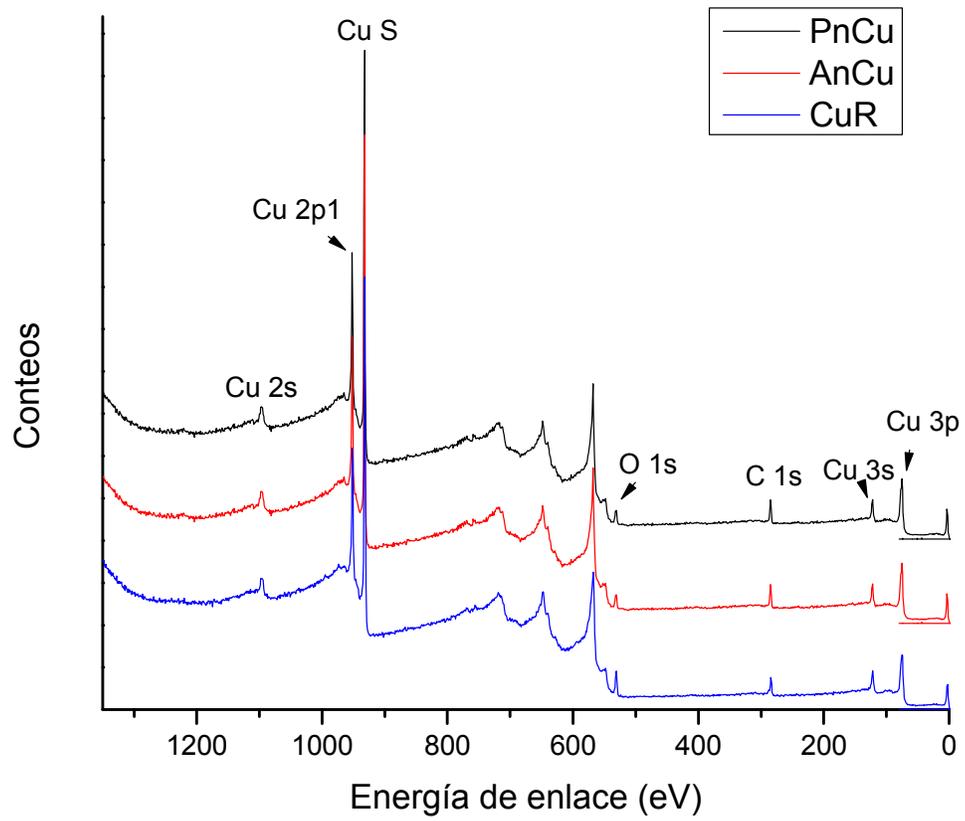


Figura 3.2. Vista general del espectro de XPS de PnCu, AnCu y CuR.

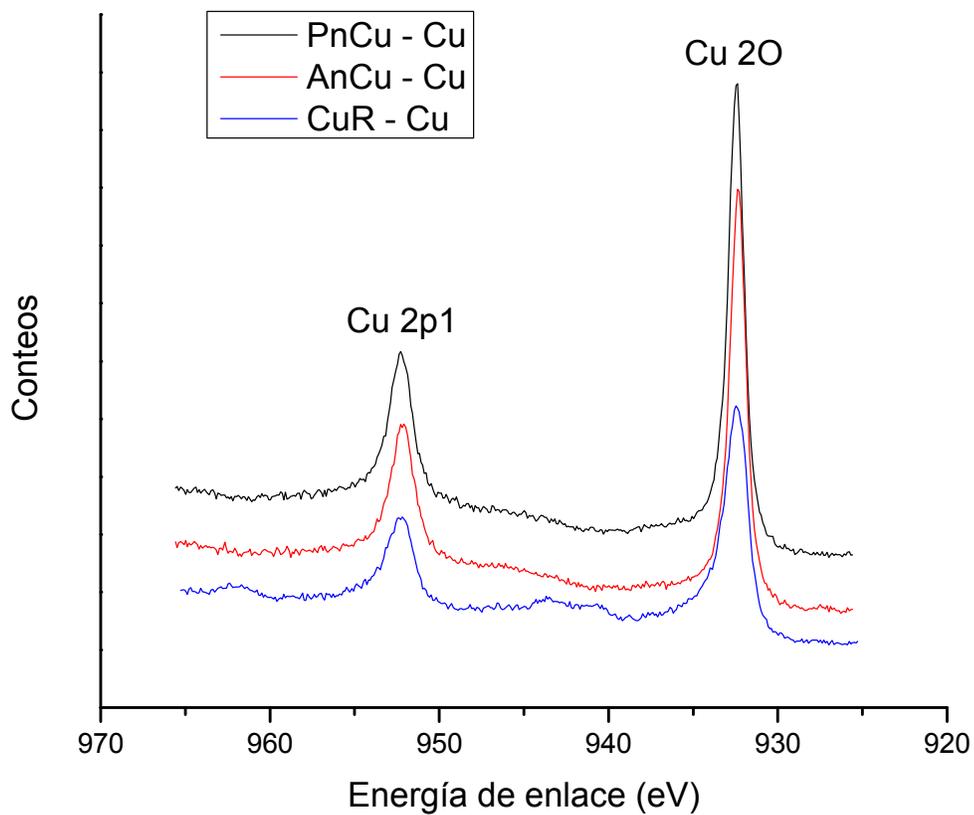


Figura 3.3. Espectro de XPS del Cu para las PnCu, AnCu y CuR.

Tabla 3.2. Contenido elemental en porcentaje atómico (%) de las PnCu, AnCu y CuR obtenidos mediante XPS.

Elemento	PnCu	AnCu	CuR
C	41.83	49.29	28.11
O	10.72	10.78	11.16
Cu	47.45	39.93	60.72
Total	100	100	100

Los resultados del análisis XPS se encuentran en la Figura 3.2 y los porcentajes atómicos de los elementos en la Tabla 3.2. Para las CuR, el elemento de mayor contenido en la muestra corresponde al Cu, con un porcentaje atómico de 60.72%, seguido del C con 28.11% y O con 11.16%, coincidiendo con lo reportado por Kruk *et al* [53].

En la Figura 3.3 se observan picos que corresponden a la presencia de Cu 2p [73,75], con un porcentaje en peso atómico promedio de 49.36% en promedio para las 3 partículas y para el C y O, 39.74% y 10.88% respectivamente. Además, una mayor intensidad para el Cu en la energía de enlace (BE, por sus siglas en inglés), presentando una señal en 932 eV, indica la presencia de Cu²⁺, así como la presencia de Cu con una BE en los 952 eV o bien, que el Cu cubierto por componentes orgánicos moviera la BE del elemento, como lo muestra la Figura 3.3 [53]. Sin embargo, Gawande *et al.* indica que los satélites propios de un acomodo del Cu²⁺ se encuentran en un intervalo de BE entre 938-946 eV [76].

El pico registrado en 531 eV se asigna al O en las formas de O-C=O (grupos carboxílicos) o al C-O cuando existen grupos éter o alcohol hidroxilo. Además se reporta que el pico de enlace Cu-O puede verse en 933.7 eV, asociado a la unión del Cu con complejos de grupos funcionales como carbonilos, carboxilos y grupos hidroxilo alifáticos/fenólicos, además, los picos para el C 1s se registraron en 285 eV y son asignados a los grupos C-C, C-O y O-C=O, como lo refiere Zhao *et al.* en 2017 [73].

3.1.4 DRX para las PnCu, AnCu y CuR

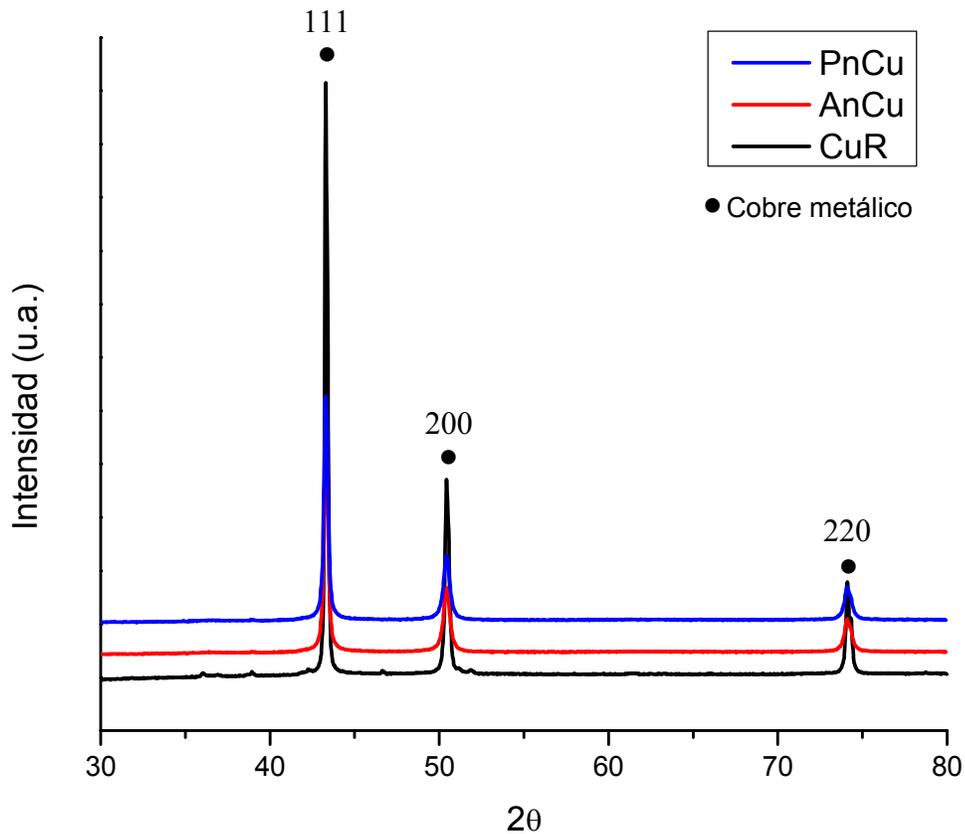


Figura 3.4. Difractograma de partículas de PnCu, AnCu y CuR.

En el análisis de los difractogramas se observa la presencia de Cu y Cu_2O debido a la poca estabilidad que tiene el Cu y a la potencial oxidación del elemento. En la Figura 3.4 se señalan los patrones de los planos encontrados en 43.3° (111), 50.44° (200) y 74° (220) para el Cu y en 36° correspondiente al plano 110 del Cu_2O [63,72,77,78]. Estos picos fueron consistentes con el estándar JCPDS No. 04-0836, asignado al cobre metálico (cúbico centrado en las caras, FCC por sus siglas en inglés) [64,69,79].

3.1.4.1 Tamaño de partícula a partir de la ecuación Debye Scherrer

Sustituyendo en la Ecuación (1) nuestros valores, obtuvimos tamaños de partículas para correspondientes a los picos ubicados en 2θ : 43.29 y 50.43 (Tabla 3.3) para las PnCu de 40.82 nm, 26.55 nm para AnCu y 36.12 nm para CuR. Otros autores reportan utilizando esta fórmula, haber obtenido partículas de entre 34.5-36 nm [79], 22-32 nm [72], 20 nm [80], 24 nm [81], 50-60 nm [71].

Tabla 3.3. Tamaño de partícula (nm) determinado por la ecuación de Deby-Scherrer.

2θ	PnCu	AnCu	CuR
43.29	45.02	31.68	40.73
50.43	36.62	21.43	31.52
Media	40.82	26.55	36.12

3.2 Medición del tamaño de partícula mediante Dispersión de luz para las PnCu, AnCu y CuR

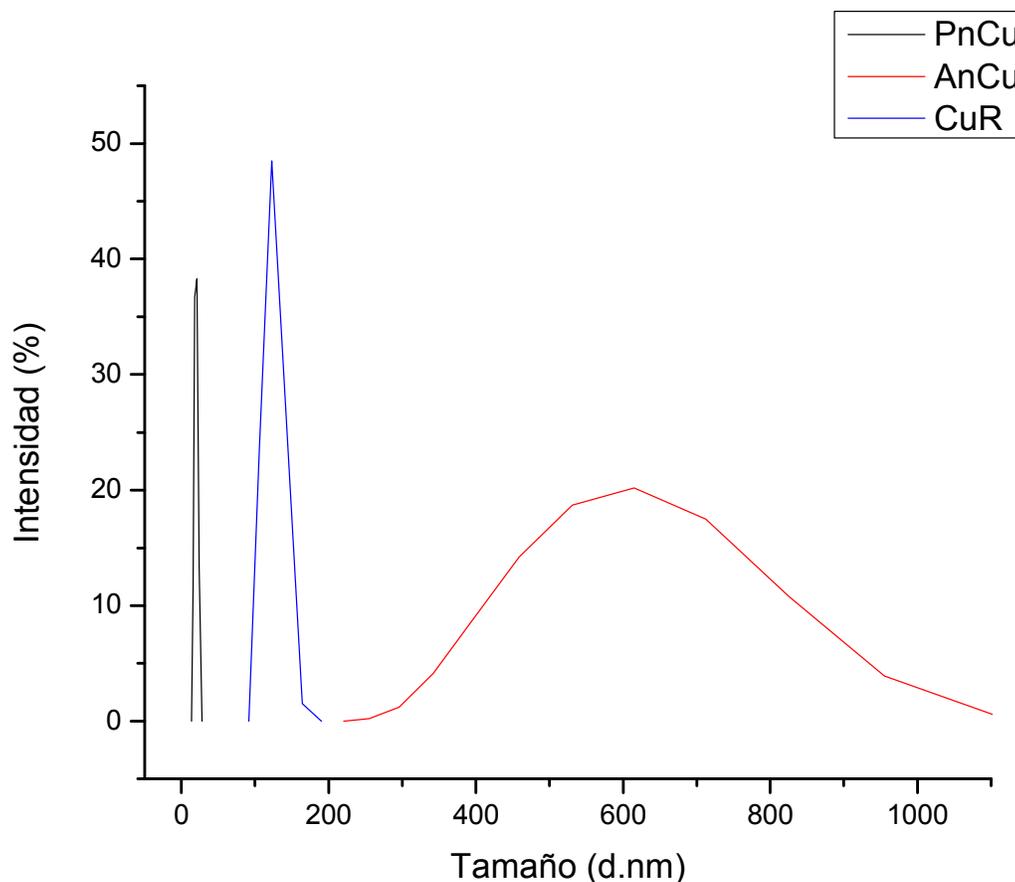


Figura 3.5. Distribución de tamaños de partículas para las PnCu, AnCu y CuR, obtenidas mediante dispersión de luz.

La distribución del tamaño de partícula se encuentra graficado en la Figura 3.5, observándose para las PnCu que en la muestra existen partículas no homogéneas en tamaño, observándose un pico con media en 21 nm [53]. Yu *et al.* al usar PVP como estabilizador del tamaño y forma de la partícula de Cu reportaron tamaños entre 1-7 nm al utilizar diferentes concentraciones del reductor (CuSO_4) y disolvente (agua y etileno glicol). En otro reporte, al sintetizar nanotubos de Cu utilizando ácido ascórbico como

agente reductor y poli(vinil pirrolidona) como estabilizador, obtuvieron tamaños de 100 ± 25 nm [82].

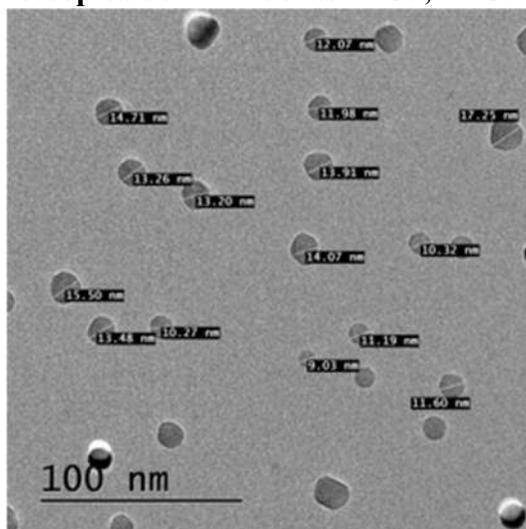
Grigore *et al.* en 2016 realizó un reporte de varios métodos para la obtención de nano partículas de cobre, en los cuales obtenían tamaños entre 3-30 nm, dependiendo de la síntesis; siendo la irradiación por microondas la de menor tamaño (3 nm) y la sonoquímica con mayor tamaño (30 nm) [59].

Por otra parte Eversole y Broida concluyen que el análisis por dispersión de luz es un pobre elemento para determinar la uniformidad de las partículas; esto debido a la forma esférica, que es diferente la dispersión obtenida a partir de partículas reales [83].

Las AnCu mostraron un tamaño disperso con media en 615 nm. Castaño et al. en 2016 utilizaron almidón y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ para la obtención de nano partículas y a partir de los valores de DRX obtuvieron por medio de la fórmula de Scherrer un tamaño de 11.41 nm en promedio [69]. El mismo método utilizó Khan et al., obteniendo valores de 28.73 y 25.19 nm para el Cu y Cu_2O respectivamente [64].

Para la síntesis de CuR, el tamaño de partícula en promedio tiene un diámetro de 122 nm. Esta síntesis fue basada en lo reportado por Umer *et al.* en 2014, en donde reportan valores de tamaño de partícula entre 50-60 nm, calculado a partir del DRX por medio de la fórmula de Debye Scherrer [71,72].

3.3 Caracterización microscópica de TEM de las PnCu, AnCu y CuR



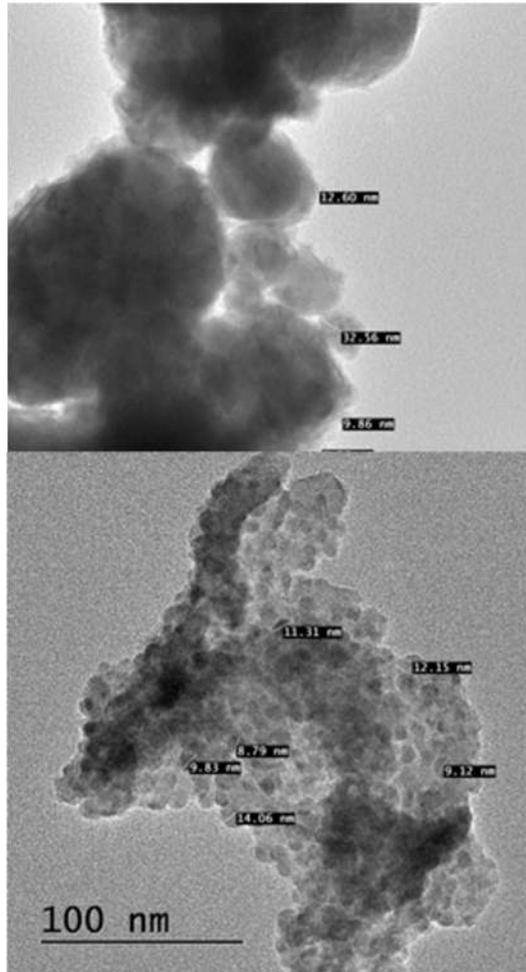


Figura 3.6. Micrografía por TEM de las (a) PnCu, (b) AnCu y (c) CuR, donde se observan partículas de forma esférica con un tamaño promedio de 12.78 nm, 15.38 nm y 10.87 nm, respectivamente.

Las NCu sintetizadas a partir de varios métodos fueron medidas mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 3.6) y determinado el tamaño promedio de cada una. Las PnCu tuvieron un tamaño promedio de 12.78 nm de diámetro de acuerdo a las micrografías, siendo más grandes que las obtenidas por Yu *et al.* y Wu *et al.* al utilizar el mismo método de síntesis que en este trabajo [63,78]. Por otro lado, coincide con el tamaño de partícula

reportado por Khodashenas *et al.*, donde obtuvieron un tamaño promedio de 15 nm al utilizar un método similar a lo que se reporta aquí y donde concluyen que la concentración de PVP es directamente proporcional con el tamaño de la partícula [54]. Otro estudio donde fue utilizada la PVP reporta un tamaño de entre 50-60 nm determinado por la ecuación de Scherrer, a partir del patrón de difracción de rayos X (DRX) [71].

Para las AnCu se obtuvo un tamaño promedio de 15.38 nm, coincidiendo con la síntesis y caracterización de Valodkar *et al.* al utilizar nitrato de cobre como precursor y ácido ascórbico y almidón como agente reductor y estabilizador, respectivamente [57,84]. En otro método utilizado por Ceja-Romero *et al.*, donde se utilizó sulfato de cobre pentahidratado, almidón y D-Glucosa anhidra, se reportaron tamaños de partícula entre 6 y 25 nm [69].

La síntesis de nanopartículas de cobre sin polímero (CuR) condujo a partículas con un tamaño promedio de 10.87 nm obtenido mediante TEM. Estos resultados difieren en el tamaño obtenido por Kobayashi *et al.*, con un promedio de 57.75 nm cuando no utilizaron polímeros como agentes estabilizantes [79,85]. En otro estudio utilizaron ácido oleico como surfactante y obtuvieron un tamaño de partícula promedio de 15.3 nm utilizando 1 M de ácido ascórbico como agente reductor. Sin embargo, cuando se aumentó a 2 M el ácido ascórbico, el tamaño de partícula aumentó a 67 nm en promedio [86].

3.4 Caracterización fisicoquímica del CIV y CIVM

3.4.1 FTIR

Las partículas de NCu (CuR) mostraron absorciones a 3473 (OH), 3149 (OH), 3012 (=CH), 1627 (C=C conjugados), 1398 (C-OH) y 628 (Cu-O) (Figura 3.7). Estas son similares a lo reportado por Umer *et al.* [71], donde se observaron absorciones predominantemente del L-ácido ascórbico. El ascórbico puro tiene cuatro absorciones intensas a 3303 cm^{-1} (OH), 1754 (C=O), 1673 (C=C) y 1322 (C=C-OH).

El CIV sin modificar mostró absorciones a 3436 (OH), 3124, 2965 (CH_2), 1720 (COOH), 1635 (C=C vinílico), 1602 ($\text{COO}_{\text{asim}}^- \text{Al}$), 1463 (C-H o $\text{COO}_{\text{sim}}^-$), 1401 ($\text{COO}_{\text{sim}}^-$), 1166 (C-O en el poliacrílico o en el tartárico), 1076 (C-O), 796 y 644 cm^{-1} . Estas asignaciones, sin

embargo, deben considerar que en los poliacrilatos puros de calcio aparecen absorciones de estiramiento asimétrico a 1550 cm^{-1} , los de aluminio a 1599 cm^{-1} , el tartrato de calcio a 1595 cm^{-1} y el tartrato de aluminio a 1670 cm^{-1} [87]. Del mismo modo a 1410 , 1460 , 1385 y 1410 cm^{-1} se aprecian los enlaces COO^- de los estiramientos simétricos de los mismos compuestos. Por lo tanto, las absorciones entre 1401 y 1463 cm^{-1} también pueden deberse a de sales (polycarboxilatos o tartratos) de Ca y Al [5]. Finalmente, las bandas localizadas entre 400 a 800 cm^{-1} corresponden a las estructuras cristalinas como Al_2O_3 , fluoruros metálicos, Cu_2O , etc. [88].

Las bandas correspondientes al CIV modificado con NCu se observan en 1712 cm^{-1} y se atribuyen al estiramiento del grupo carboxilo ($\text{C}=\text{O}$) [9], mientras que el $\text{C}=\text{C}$ vinílico (o COOAl) se encuentra en 1631 cm^{-1} . En esta figura también se observa que las absorciones a 1635 y 1602 cm^{-1} se mantienen con la misma intensidad independientemente de la cantidad de cobre añadida mientras que las absorciones a 1463 cm^{-1} y 1401 cm^{-1} variaron en intensidad. Esto es, en el ionomero sin modificar, la banda a 1463 cm^{-1} es de menor intensidad que la banda de 1401 cm^{-1} mientras que en los CIV modificados con cobre estas intensidades se invierten. Esto significa que el poliacrilato de aluminio (1463 cm^{-1}) se produce menos debido a la presencia del cobre.

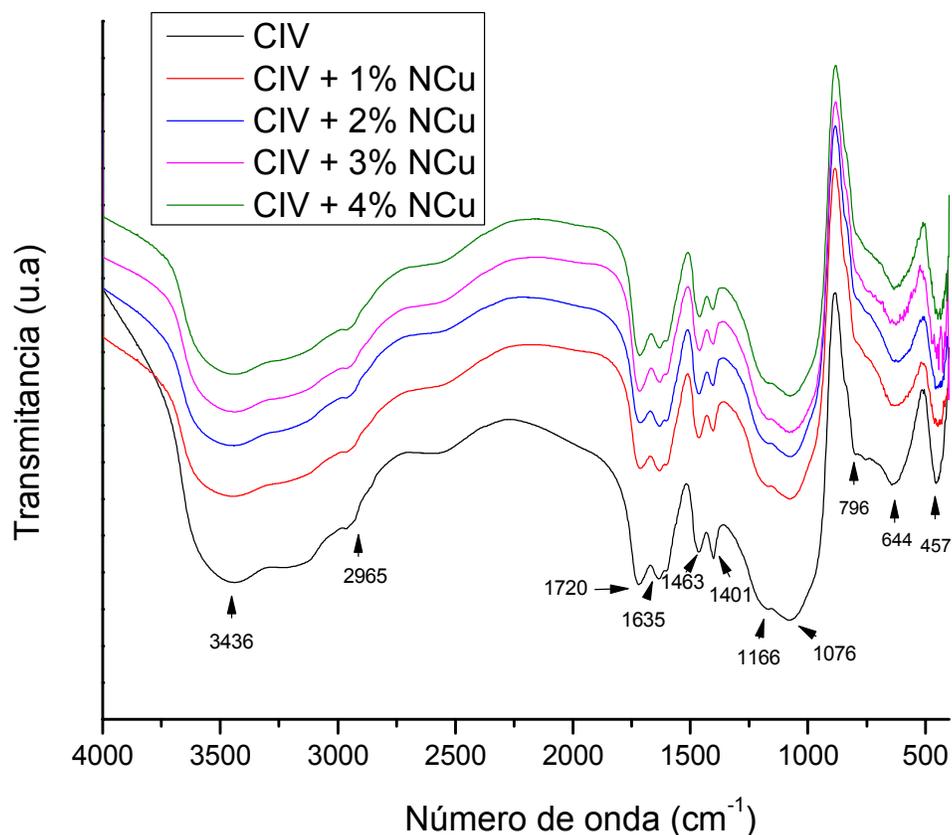


Figura 3.7. Espectros FTIR de CIV y CIV modificado con NCu a diferentes porcentajes.

3.4.2 Raman

Los espectros Raman del CIV modificado se muestra en la Figura 3.8, donde se observaron picos entre 2930 y 2940 cm^{-1} los cuales fueron atribuidos a estiramientos enlaces CH_2 del poli(ácido acrílico) [89]. Del mismo modo, se observaron dos picos intensos, uno a 1370 cm^{-1} y otro a 1402 cm^{-1} pudiendo atribuirse a flexiones del enlace CH del poli(ácido acrílico). Dos absorciones poco intensas a 1657 cm^{-1} y 1806 cm^{-1} podrían deberse a $\text{C}=\text{O}$ en ésteres (carboxilatos) o anhídridos de ácidos (tartárico).

Los picos correspondientes al Cu aparecen en la región de 529-620 cm^{-1} , siendo visibles únicamente en el CIV modificado con 2 y 4% de NCu [90].

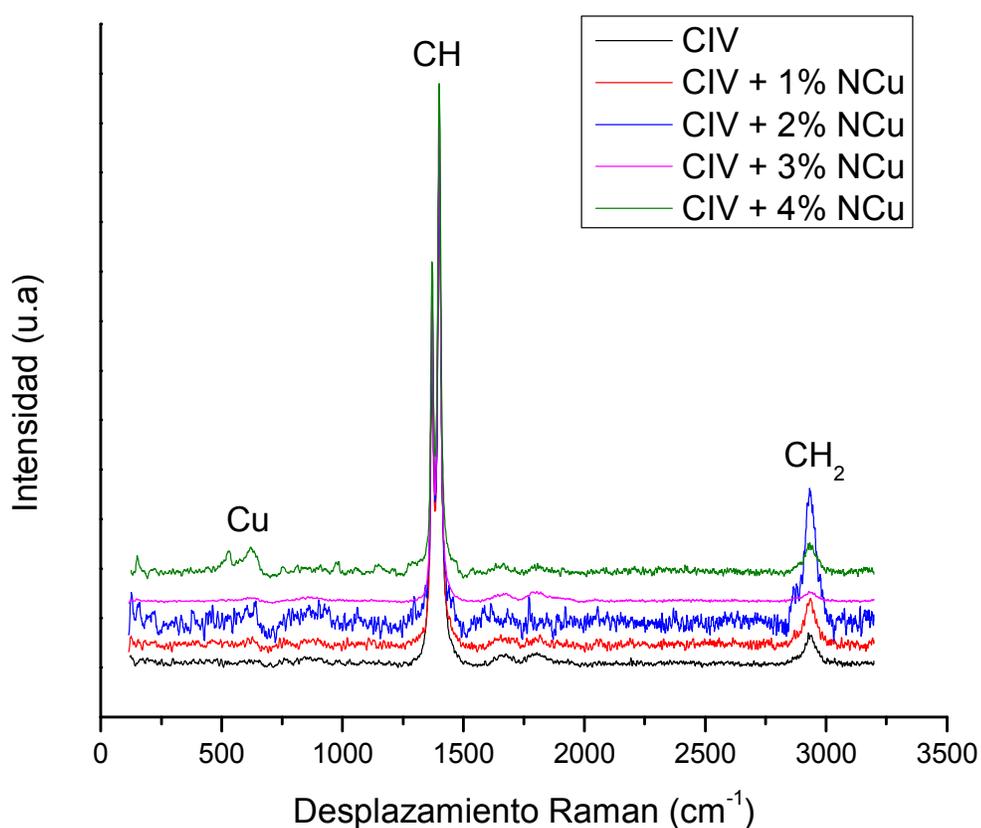


Figura 3.8. Espectro Raman del CIV y CIV modificado con NCu a diferentes porcentajes.

3.4.3. EDX

El contenido elemental del CIV y CIVM se muestra en la tabla 3.4, en donde se aprecian todos los elementos que contiene el CIV. Además de los componentes principales C (43.5-46.5 at%) y O (31.6-36.2 at%) se observaron cantidades apreciables de Si (3.86 at%) y Al (5.02 at%) correspondientes al vidrio de aluminio-silicato. Además, se registró la presencia

de Sr (1.57 at.%) usado como agente de contraste y F (7.75 at.%) probablemente en forma de fluoruro de sodio adicionado para la prevención de caries [91,92].

Además, se nota el incremento del elemento Cu al ir aumentando la concentración de NCu entre el 1 y 4 % p/p dentro de la matriz de CIV. Sin embargo, de los resultados de este análisis queda claro que la cantidad cuantificada por EDX no corresponde a la cantidad incorporada en peso sugiriendo que en la superficie existe una proporción diferente a la del interior o total en el CIV [93].

Tabla 3.4. Contenido elemental (% atómico) del CIV y CIVM con NCu.

Elemento	CIV	CIV + 1% NCu	CIV + 2% NCu	CIV + 3% NCu	CIV + 4% NCu
C	43.77 (±0.16)	45.44 (±0.25)	44.82 (±0.81)	46.56 (±1.06)	43.5 (±0.87)
O	36.2 (±0.49)	34.64 (±0.29)	34.32 (±0.72)	31.67 (±0.76)	35.67 (±1.02)
F	7.75 (±0.28)	6.92 (±0.46)	7.05 (±0.22)	7.04 (±0.11)	6.93 (±0.34)
Na	1.6 (±0.12)	1.52 (±0.14)	1.59 (±0.07)	1.68 (±0.06)	1.56 (±0.05)
Al	5.02 (±0.15)	5.06 (±0.09)	5.36 (±0.12)	5.65 (±0.3)	5.16 (±0.06)
Si	3.86 (±0.22)	3.92 (±0.2)	4.1 (±0.2)	4.44 (±0.24)	3.9 (±0.17)
P	0.09 (±0.15)	0	0.09 (±0.14)	0.17 (±0.15)	0
Ca	0.14 (±0.01)	0.09 (±0.01)	0.22 (±0.05)	0.03 (±0.05)	0.18 (±0.04)
Cu	0	0.76 (±0.16)	0.85 (±0.08)	0.98 (±0.07)	1.53 (±0.2)
Sr	1.57 (±0.08)	1.65 (±0.01)	1.6 (±0.03)	1.78 (±0.08)	1.57 (±0.02)

En la Figura 3.9, se presenta el mapeo de cobre realizado al CIV y CIVM, en el que se comprueba la dispersión homogénea del elemento Cu, incrementando la concentración de CIV + 1% NCu al CIV + 4% NCu, comparado con lo reportado por Zanata en 2011, donde reportó los mismos elementos pero con porcentajes atómicos superiores para el Al con 17 at.%, Si con 15 at.%, Sr 13 at.%, e inferiores para el F con 4.6 at.% y similares para el Ca con 0.1 at.% [91].

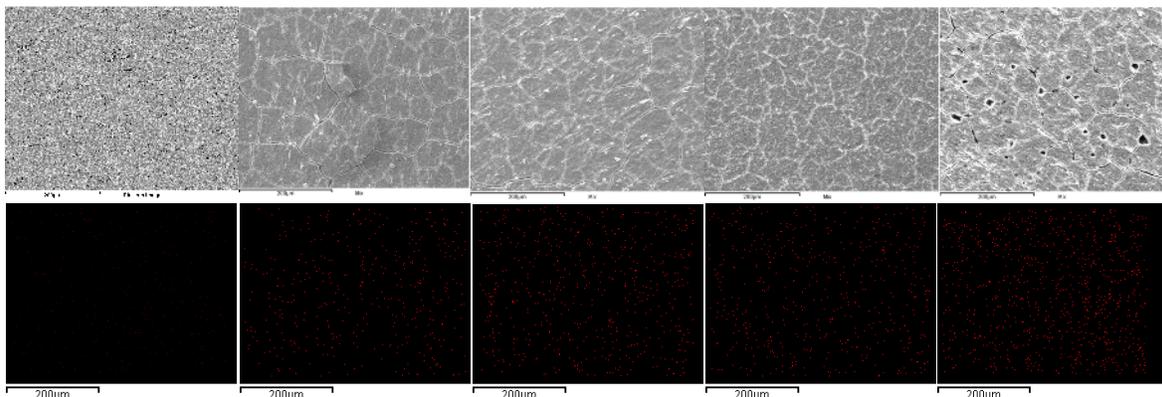


Figura 3.9. Mapeo por EDX para el elemento Cu en las muestras de CIV y CIVM con diferentes concentraciones de NCu. (a) CIV, (b) CIV + 1% NCu, (c) CIV + 2% NCu, (d) CIV + 3% NCu, (e) CIV + 4% NCu.

3.4.4 XPS

Los espectros del análisis XPS de la Figura 3.10, muestran la aparición del Cu_2O ($\text{Cu}2p$ a 933.4 eV) para los CIV modificados con 2-4% de NCu, coincidiendo con lo reportado por Kruk *et al.*, cuando caracterizó partículas de Cu [53,94,95]. En la muestra con 4% de NCu se detectó un contenido de cobre superficial de 0.38 at.%, lo cual fue menor al detectado mediante EDX para la misma composición.

Uno de los picos de mayor intensidad corresponde al carbono ($\text{C}1s$) y se observó a 284.8 eV correspondiente a enlaces C-C (55.85 at.%) mientras que a 289 eV se localizó el C unido al oxígeno ($\text{C}=\text{O}$) asociada al ácido poli(acrílico) (ver figura 3.11). Esto muestra que no hay diferencia entre poliacrilatos de calcio, aluminio o cobre.

El oxígeno ($\text{O}1s$) se localizó en 531.8 eV [96,97] con un contenido de aproximadamente 24.0 at.% para el CIV y CIVM. El pico correspondiente a este elemento fue simétrico y no se detectaron hombros correspondientes a óxidos metálicos (ver figura 3.12). Además, de acuerdo con lo reportado por Laiteerapong, nuestros resultados coinciden para el F en 682.2 eV [98,99] con un contenido aproximado de 6.5 at%. También se detectaron Si (102.9 eV),

Al (74.7 eV) y Ca (347.8 eV) con contenidos aproximados de 2.0 at%, 8.9 at% y 0.4 at% respectivamente.

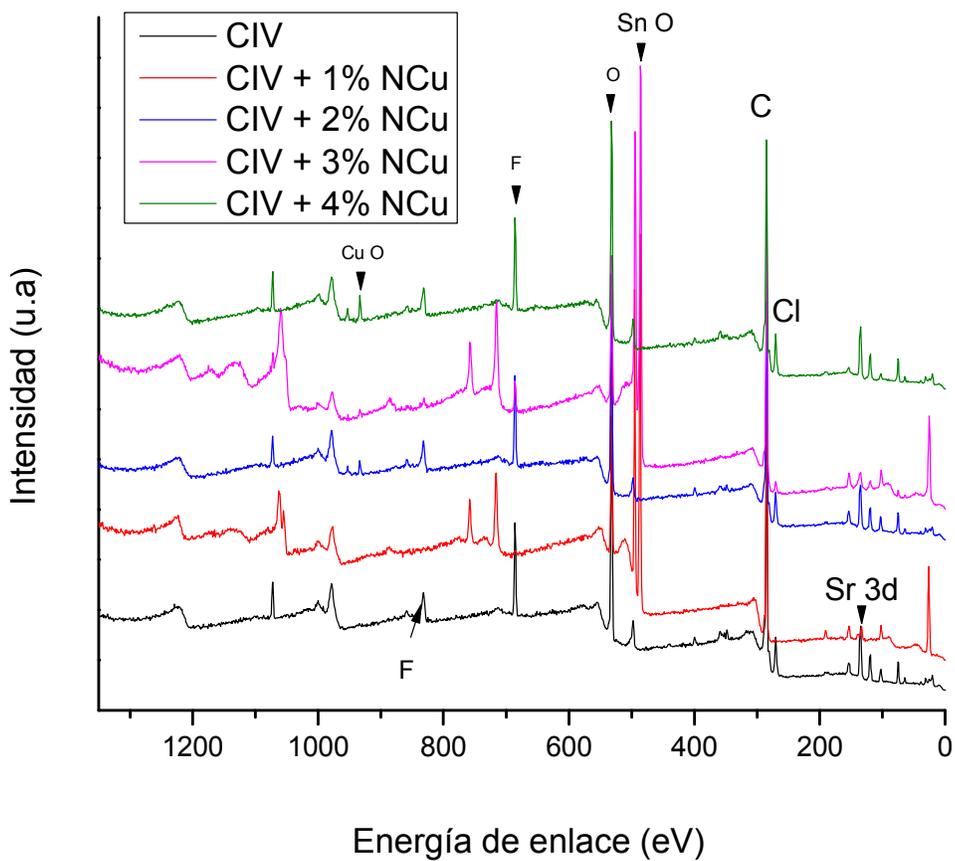


Figura 3.10. Espectro de XPS del CIV y CIV modificado con NCu a diferentes porcentajes. 30 segundos de erosión.

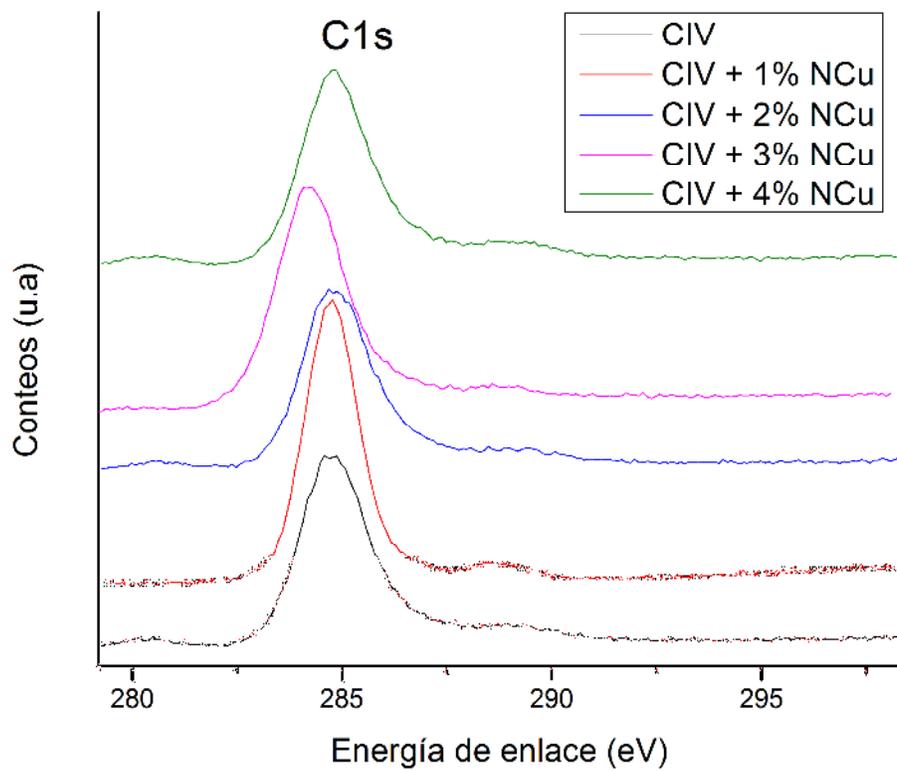


Figura 3.11. Espectro XPS del C1s de los CIV y CIVM.

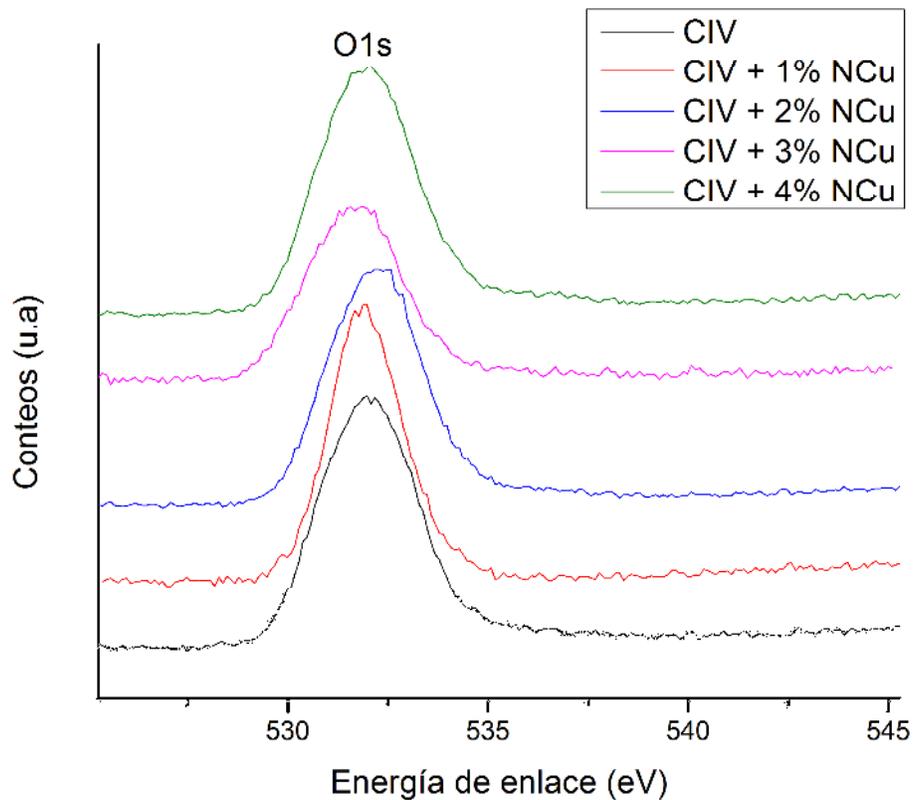


Figura 3.12. Espectro XPS del O1s de los CIV y CIVM.

3.4.5 DRX

La Figura 3.13 muestra el difractograma del CIV con NCu donde se observa la presencia de Cu y Cu₂O debido a la poca estabilidad que tiene el Cu y a la potencial oxidación del elemento. De igual manera se señalan los patrones de los planos encontrados en 43.3° (111), 50.44° (200) y 74° (220) para el Cu y en 36° correspondiente al plano 110 del Cu₂O [63,72,77,78]. Estos picos fueron consistentes con el estándar JCPDS No. 04-0836 [64,69]. En esta figura se observa claramente como los picos correspondientes al cobre van

aumentando en intensidad conforme se incrementa la concentración en el cemento de ionómero de vidrio.

Para el difractograma correspondiente al CIV sin modificar, no aparecen picos sobresalientes, debido a la composición amorfa del material [100]. Así, se puede concluir que todos los componentes han reaccionado completamente [101].

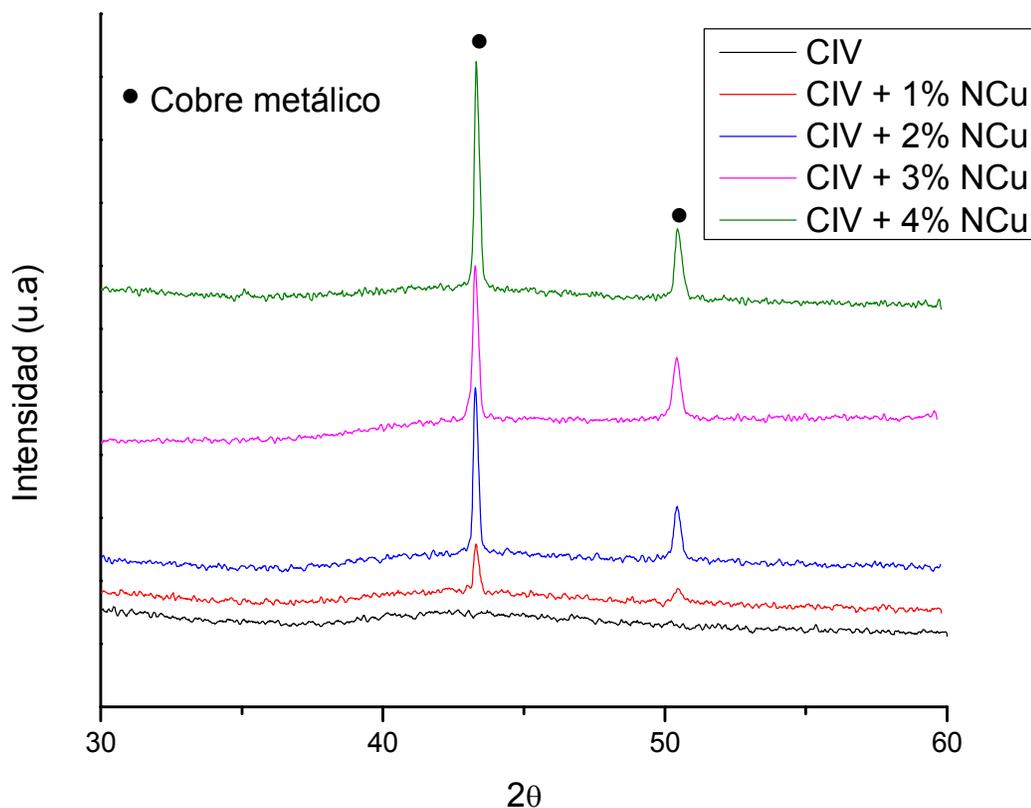


Figura 3.13. Difractograma del CIV y CIV modificado con NCu a diferentes porcentajes.

3.5 Espectrofotometría de absorción atómica de llama

De las muestras analizadas, se reportó como valor cuantificable la correspondiente al CIV + 4% NCu (Tabla 3.5). En un estudio, Foley y Blackwell analizan un cemento con metales como el Cu y determinan que los metales con alto número atómico, tendrán un efecto

antibacterial, sin que se atribuya a la liberación de iones. Así, describen que la liberación de Zinc y Magnesio, además del Cu, descendía significativamente entre los 2 días a 6 meses, independientemente de pH utilizado (7, 4 y 2) [102].

Tabla 3.5. Concentración de Cu en eluciones del CIV y CIVM incubadas a 72 h (ppm).

Muestra	Concentración
CIV	0.00
CIV + 1% NCu	0.07
CIV + 2% NCu	0.03
CIV + 3% NCu	0.03
CIV + 4% NCu	0.45

3.5 Viabilidad de fibroblastos humanos de pulpa dental

Los resultados indican una disminución en el metabolismo celular, derivado de una disminución en la población al entrar en contacto con los extractos de las muestras experimentales, como se describe en la Figura 3.14 y descrito por Laiteerapong *et al.*, el crecimiento y proliferación de las células de pulpa dental humanas, dependerá del acomplamiento inicial en el medio [98]. Los resultados son diferentes con lo reportado para la misma prueba realizada por Kanjevac *et al.*, cuando se utilizó la misma marca de CIV contra células mesenquimales de pulpa dental [103]. Otro estudio realizado por Siqueira *et al.*, utilizó odontoblastos inmortalizados MDPC-23 en contacto indirecto con CIV y CIV modificados con nano partículas de plata, en el cuál reportan una viabilidad celular de entre 60-95%, coincidiendo con nuestros resultados [104].

El análisis estadístico ANOVA para el ensayo no encontró diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h y el post-hoc no encontró diferencias entre los grupos de CIV y cada concentración de CIVM.

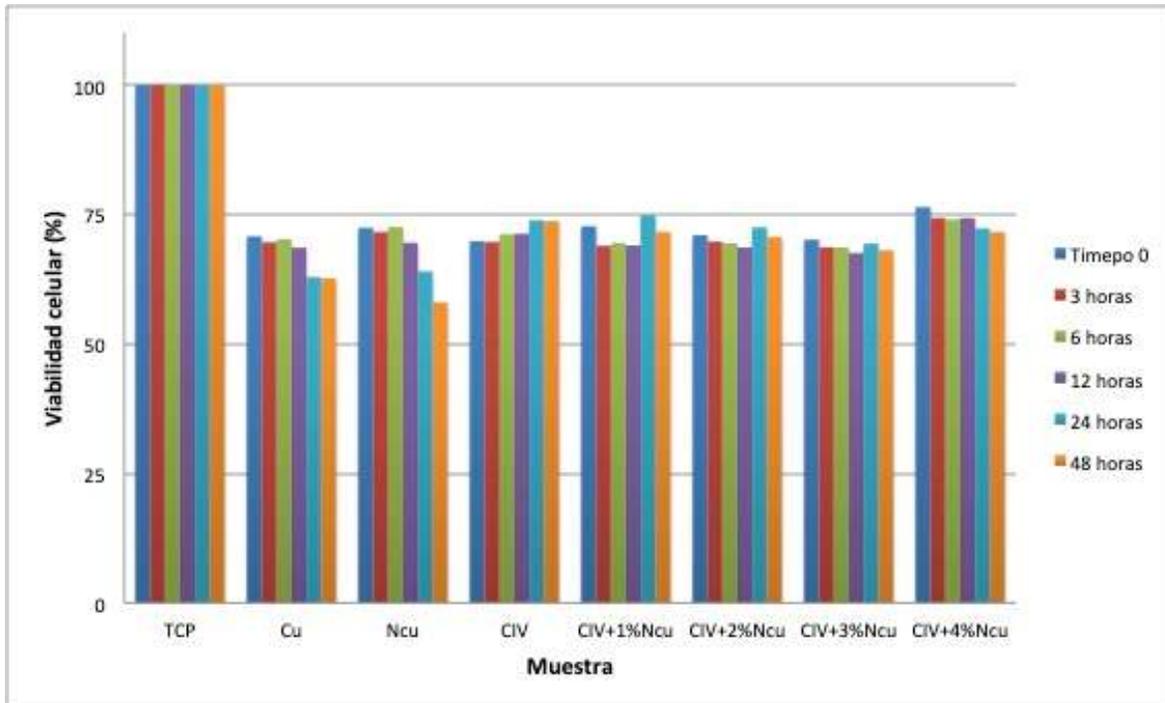


Figura 3.14. Viabilidad fibroblastos pulpaes en presencia de extractos de CIV modificados con NCu.

3.6 Ensayos microbiológicos

La actividad antibacteriana medida mediante CFU se muestra en la Tabla 3.6 y Figura 3.15. Ambas cepas mostraron una reducción del crecimiento bacteriano superior al 80% cuando estuvieron en contacto con el CIVM con NCu a una concentración mayor al 1% p/p. Los valores para el conteo de CFU contra *S. mutans* del CIV y CIVM con 1% p/p de NCu fue estadísticamente mayor ($p=0.001$) que aquellos CIVM con 2-4% p/p de NCu. De igual manera la diferencia fue mayor entre los grupos de 2% comparado a los de 3 y 4% p/p. El análisis estadístico mostró que el CIV y CIVM contra *S. mutans* y *S. sanguinis* fueron diferentes ($p=0.042$) en el análisis post-hoc entre 1 y los de 4% p/p.

Covarrubias *et al.* describieron la capacidad inhibitoria del crecimiento en el número de colonias de *S. mutans* para las NCu cuando utilizaron un método similar al nuestro. Ellos

concluyeron que las NCu tuvieron una mayor capacidad cuando se unían con quitosano para prevenir la formación de biofilm y reducir la viabilidad bacteriana [105]. En otro estudio Toodehzaeim *et al.* incorporaron 1% p/p de NCu a un adhesivo ortodóntico y determinaron que podía tener una inhibición en el crecimiento bacteriano contra *S. mutans* con un halo de 9.2 mm [56]. De igual forma, NCu agregadas a un adhesivo de grabado y enjuagado mostró un comportamiento antibacteriano contra *S. mutans* [106]. Fúcio *et al.* evaluaron varios CIV y CIVM con resina contra *S. mutans* y observaron halos inhibitorios de 7.8 mm para el Fuji IX, por método de difusión en agar, lo cual fue diferente a nuestro estudio que no reveló actividad para CIV sin modificar [31]. En concordancia con esto, Zalewska reportó zonas de inhibición de 11 y 12.3 mm contra el *S. mutans* y *S. sanguinis* respectivamente cuando fue evaluado un CIV comercial [107].

Tabla 3.6. Crecimiento promedio de las UFC del CIV y CIVM contra *S. mutans* y *S. sanguinis*.

	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>
CIV	>1000	>1000
CIV+1%NCu	>1000	226.33
CIV+2%NCu	152.00	63.50
CIV+3%NCu	5.67	44.00
CIV+4%NCu	6.67	18.67

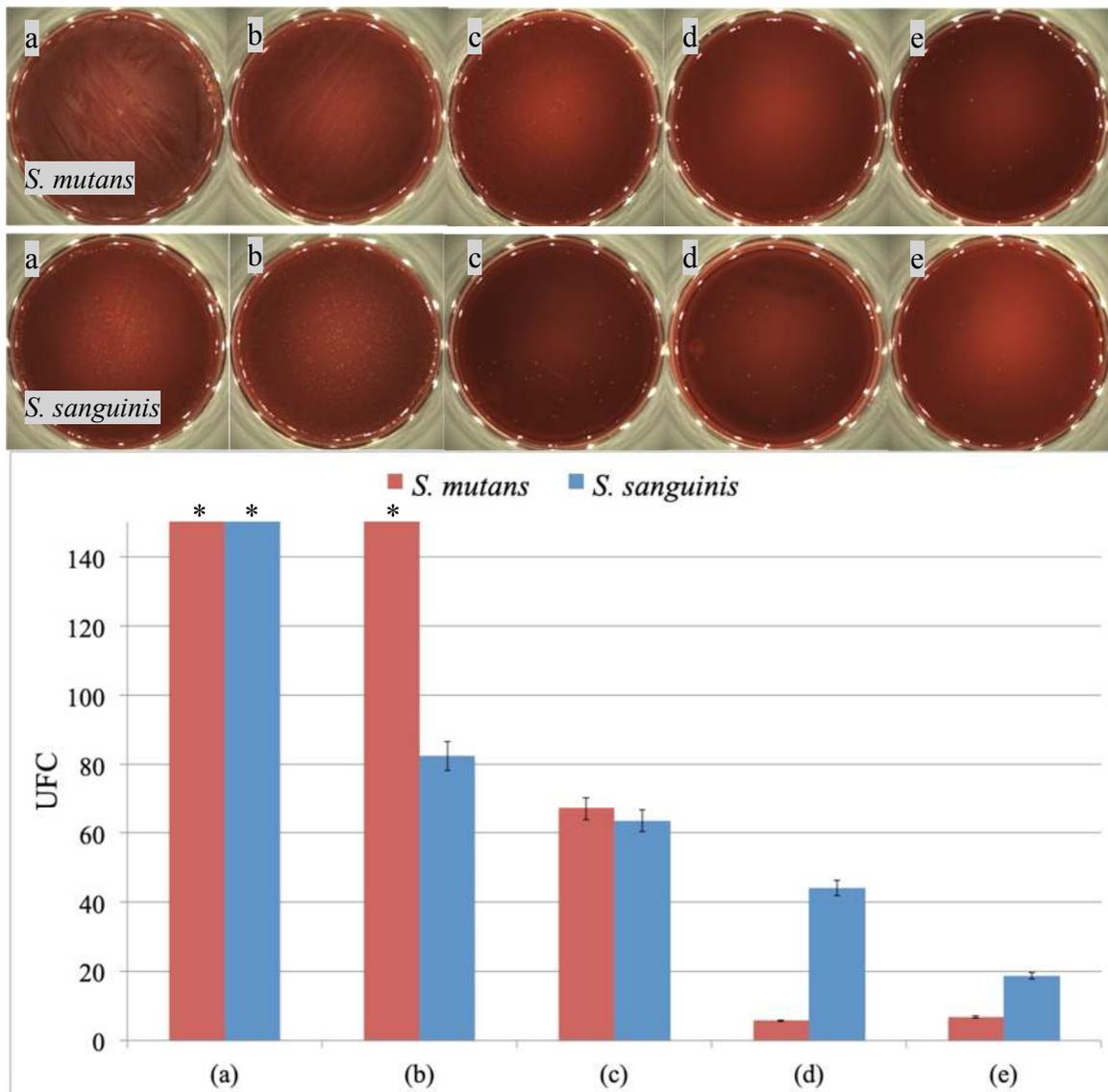


Figura 3.15. Conteo de las UFC en la difusión en caldo del CIV y CIVM a diferentes concentraciones de NCu. (a) CIV, (b) CIV + 1% NCu, (c) CIV + 2% NCu, (d) CIV + 3% NCu y (e) CIV + 4% NCu. * = conteo de UFC > 1000.

3.7 Caracterización mecánica

3.7.1 Ensayos mecánicos de compresión del CIV y CIVM

Los resultados de las pruebas de compresión de los CIV y CIVM con NCu se muestran en la Tabla 3.7 y en la Figura 3.16. Los valores del CIV alcanzaron esfuerzos máximos promedio de 134 MPa, con una desviación estándar de ± 29 MPa. Además, los CIVM con 1 y 2% p/p de NCu se obtuvieron valores máximos promedio de 139 MPa y para los modificados con 3 y 4% p/p, los esfuerzos máximos fueron de 130 MPa en promedio. Estos resultados son comparables con lo reportado por Zelmer *et al.* en 2016, quienes reportan valores promedio de 123 MPa cuando evaluaron sin modificaciones el CIV Fuji IX [108], siendo que la norma de referencia ISO 9917-1 indica que 4 de los 5 especímenes deben obtener esfuerzos máximos superiores a 100 MPa para considerarse válidos los resultados [5,14,109].

Además, el módulo elástico (E) reportado por Naoum *et al.*, mostraron valores para el CIV Fuji IX en un rango entre 4.5 y 5.5 GPa [110]. Otro estudio en el que utilizaron otra marca de ionómero de alta viscosidad, reportan valores entre 2 y 5 GPa al someterlo a ensayos de compresión [111].

El análisis estadístico ANOVA para el ensayo a compresión no encontró diferencias estadísticamente significativas ($p=0.05$) entre los grupos de CIV y las concentraciones de CIVM.

Tabla 3.7. Propiedades mecánicas de compresión del CIV y CIVM con NCu. E=módulo elástico (GPa), σ =Esfuerzo máximo (MPa).

Muestra	CIV		CIV 1% NCu		CIV 2% NCu		CIV 3% NCu		CIV 4% NCu	
	E	σ	E	σ	E	σ	E	σ	E	σ
1	6.2	138.82	5.2	139.28	5.58	137.41	5.5	129.16	4.1	123.56
2	5.54	129.53	6.4	140.16	6.72	142.21	5.32	124.86	4.52	129.52
3	6.54	140.66	6.22	149.36	5.4	144.2	5.52	130.28	5.7	137.19
4	6.2	128.22	6.81	143.44	5.98	137.13	6.21	139.44	5.28	121.64
5	6.5	134.06	5.8	127.71	6.21	134.91	6.48	138.94	5.5	127.42
\bar{x}	6.20	134.258	6.58	139.99	5.98	139.17	5.81	132.53	5.02	127.86

Des Est	0.36	4.91	0.63	7.08	0.47	3.46	0.45	5.72	0.61	5.42
---------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

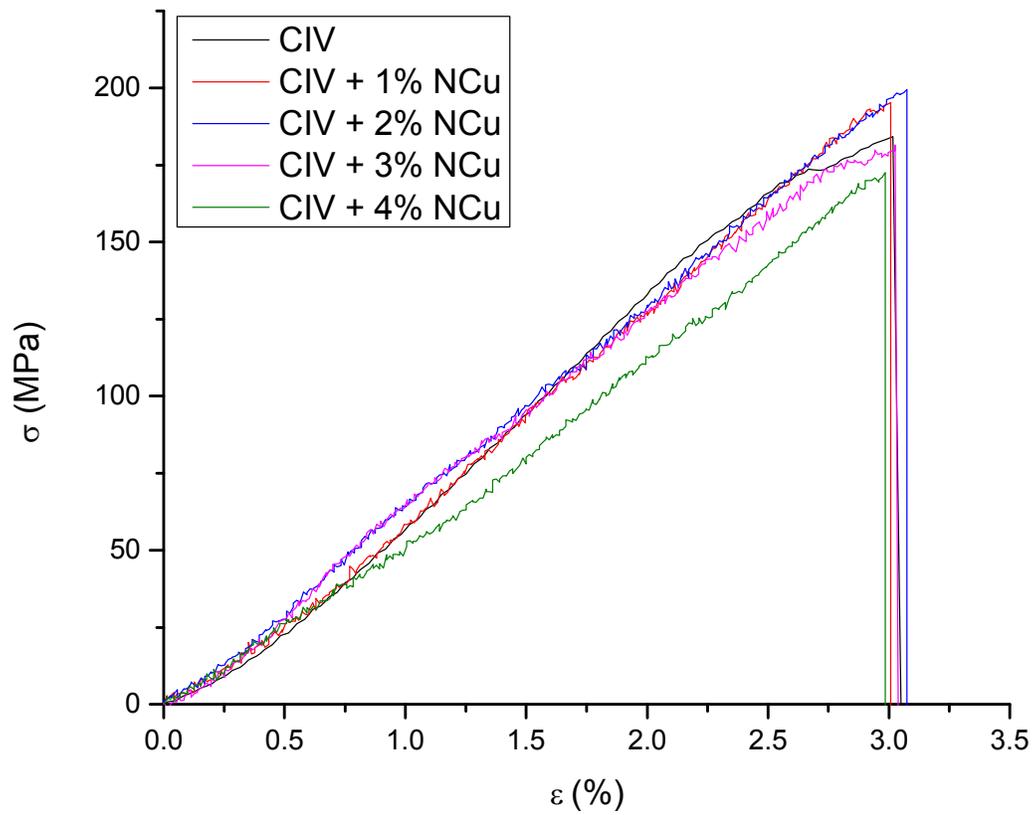


Figura 3.16. Curva de esfuerzo máximo y deformación de los ensayos de compresión para los CIV y CIVM con 1, 2, 3 y 4% p/p NCu.

3.7.2 Ensayos mecánicos de flexión del CIV y CIVM

Los resultados de las pruebas de compresión de los CIV y CIVM con NCu se muestran en la Tabla 3.8 y en la Figura 3.17. Los valores CIV alcanzaron esfuerzos máximos promedio de 21.00 MPa, con una desviación estándar de ± 2.31 MPa. Para los CIVM con 1%, 2% y 3% p/p de NCu se obtuvieron valores máximos promedio de 24.18 MPa y para el modificado con 4% p/p, los esfuerzos máximos fueron de 22.88 MPa en promedio [112]. Por otro lado, el módulo de flexión (E_f) se mantuvo por debajo del rango promedio reportado por Moberg *et al.*, quienes obtuvieron valores entre 9.7 GPa y 11.1 GPa al utilizar CIV de alta viscosidad [113]. Otro estudio reportado por Garoushi *et al.*, utilizando el CIV Fuji IX, reporta valores en el rango entre 1 y 4 GPa, coincidiendo con nuestros resultados [13].

Nuestros resultados comparados con lo reportado por Garoushi *et al.* representa una disminución en el desempeño promedio por 2.5 MPa cuando fue evaluado sin modificarse [13], mientras que Faridi reporta resultados en donde solo difiere negativamente en 2 MPa en promedio [112].

El análisis estadístico ANOVA para el ensayo a flexión no encontró diferencias estadísticamente significativas ($p=0.05$) entre los grupos de CIV y las concentraciones de CIVM.

Tabla 3.8. Propiedades mecánicas de flexión del CIV y CIVM con NCu. E_f =módulo de flexión (GPa), σ =Esfuerzo máximo (MPa).

Muestra	CIV		CIV 1% NCu		CIV 2% NCu		CIV 3% NCu		CIV 4% NCu	
	E_f	σ								
1	3.48	24.83	4.06	25.82	3.82	26.54	2.65	25.28	3.23	27.02
2	3.33	21.36	3.67	28.64	3.64	22.08	2.80	28.58	2.79	19.17
3	3.16	20.95	2.83	24.95	3.95	31.09	3.25	20.30	2.42	20.26
4	3.80	18.91	3.08	21.05	3.05	21.97	3.66	18.25	3.55	26.17
5	3.12	19.52	3.03	18.02	3.02	21.5	2.66	28.62	3.61	21.77
\bar{x}	3.38	21.11	3.33	23.70	3.50	24.64	3.00	24.21	3.12	22.88
Des Est	0.28	2.31	0.51	4.18	0.44	4.15	0.44	4.76	0.51	3.53

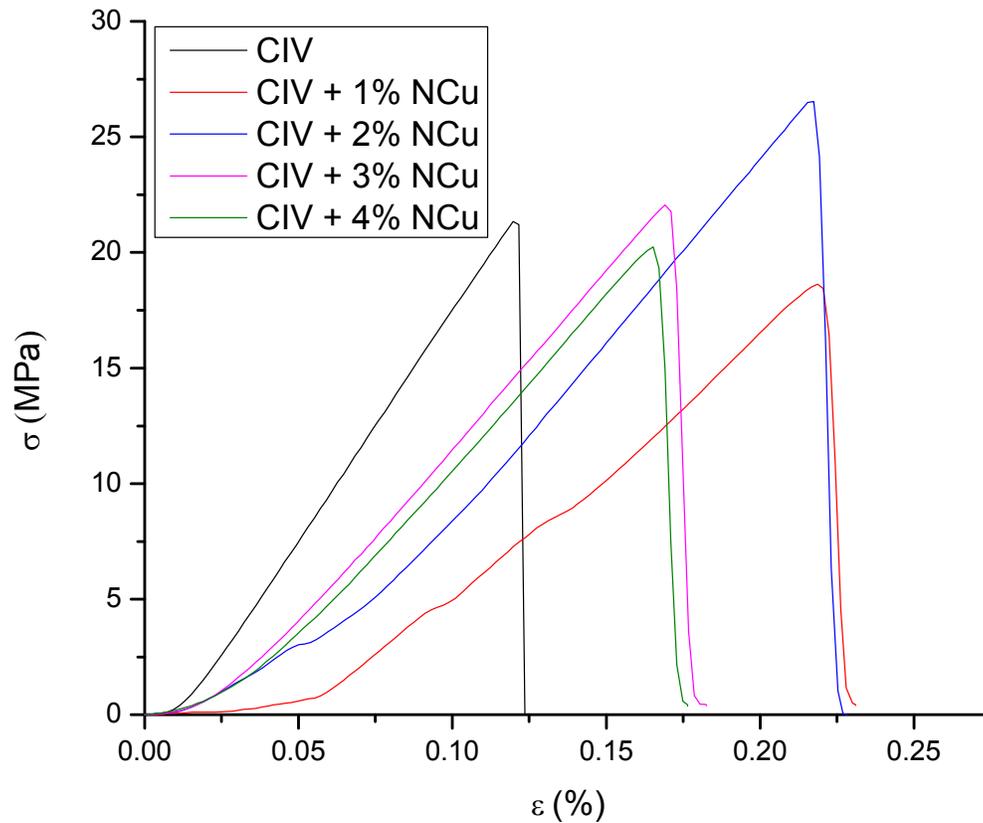


Figura 3.17. Curva de esfuerzo máximo y deformación de los ensayos de flexión para los CIV y CIVM con 1, 2, 3 y 4% p/p NCu.

3.7.3 Ensayo de adhesión

Los resultados de las pruebas de adhesión de los CIV y CIVM con NCu se muestran en la Tabla 3.9. Los valores CIV alcanzaron esfuerzos máximos promedio de 3.72 MPa, con una desviación estándar de ± 0.65 MPa [10]. En un estudio realizado por García-Contreras *et. al.*, concluyeron que el CIV sin modificar tenía una resistencia al desalajo promedio de

1.32 MPa y cuando se incorporaron nano partículas de Ti al 3 y 5% p/p obtuvieron 1.5 y 0.99 MPa, respectivamente [114]. Los resultados de Carvalho *et al.*, para el CIV sin modificar obtuvieron valores de 6 MPa cuando fueron probados en dentina [115].

Para nuestros CIVM con 1 y 2% p/p de NCu se obtuvieron valores máximos promedio de 3 MPa y para los modificados con 3 y 4% p/p, una media de 3.9 MPa.

El análisis estadístico ANOVA para el ensayo de adhesión encontró diferencias estadísticamente significativas, $p=0.015$, entre los grupos de CIV + 2% NCu y el CIV + 4% NCu.

Tabla 3.9. Propiedades mecánicas de adhesión del CIV y CIVM con NCu (MPa).

Muestra	CIV	CIV 1% NCu	CIV 2% NCu	CIV 3% NCu	CIV 4% NCu
1	4.13	3.24	2.87	3.25	4.49
2	3.25	2.82	2.83	3.40	4.79
3	3.24	3.61	2.76	4.90	3.80
4	4.66	3.14	2.84	3.75	4.20
5	3.32	3.24	3.20	3.45	3.13
\bar{x}	3.72	3.21	2.90	3.75	4.08
Des Est	0.65	0.28	0.17	0.67	0.65

3.8 Liberación de fluoruro

La liberación de fluoruro de las muestras (n=3 por grupo) se realizó con el CIV y CIVM con las 4 concentraciones de NCu y se siguió durante 28 días. Como se muestra en la Figura 3.18, en las primeras 24 horas ocurre una liberación promedio de 14.72 ppm y los siguientes días la liberación se encuentra en un promedio de 0.8 ppm hasta finalizar los 28 días. La primera medición fue realizada a las 48 h y las siguientes cada 7 días. Al final, el CIV alcanzó una liberación total de 62.17 ppm, el CIV + 1% NCu 44 ppm, el CIV + 2% NCu 33 ppm, el CIV + 3% NCu 26.2 ppm y el CIV + 4% NCu 27.3 ppm. Este patrón de liberación obtenido, y valores obtenidos se asemejan a lo reportado por Delgado- Muños *et al.*, en 2014, analizando el cemento de ionómero de vidrio Fuji II y Ketac Molar.

El análisis ANOVA para la liberación de fluoruro resultó estadísticamente significativo ($p=0.001$) en todos los tiempos evaluados y para el tiempo de 48 h resultaron sin diferencia el CIV + 3% NCu para los otros grupos, para el tiempo de 7 días resultaron diferentes los grupos excepto entre el CIV + 3% NCu y CIV + 4% NCu. A los 14 días, los grupos resultaron diferentes entre ellos el CIV, CIV+1%NCu e iguales los CIV+2%NCu CIV+3%NCu y CIV+4%NCu; finalmente de los tiempos 21 y 28 días resultaron iguales los CIV+3%NCu y CIV+4%NCu.

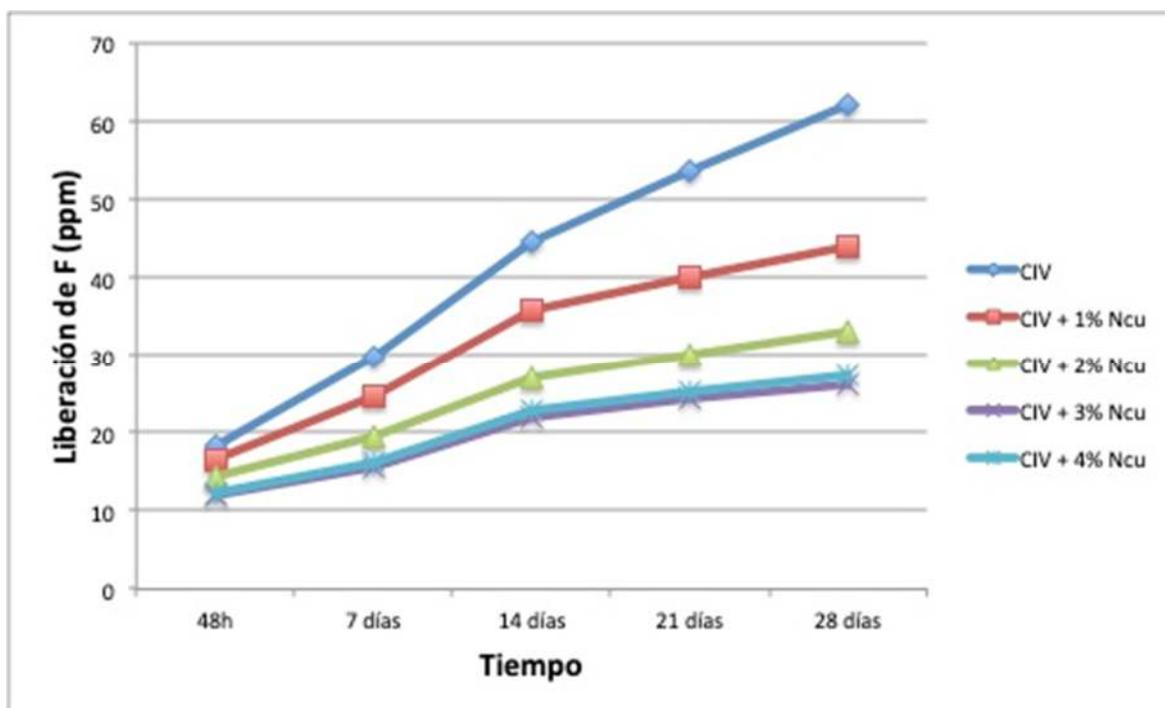


Figura 3.18. Liberación de fluoruro en función del tiempo para CIV y CIVM con diferentes concentraciones de NCu.

CONCLUSIONES

1. La caracterización de las NCu mostró mediante FTIR, EDX, XPS, DRX y MET, que están compuestas de Cu^{+2} , Cu_2O y Cu^0 , debido a la reducción del acetato de cobre por medio del ácido ascórbico, sin embargo, este antioxidante no es suficiente para evitar la capa superficial de óxido en las partículas, además se confirmó el tamaño nano métrico.
2. El CIVM fue caracterizado y demostró que el elemento Cu era detectable en la superficie, además de comprobarse su distribución homogénea mediante el mapeo por EDX.
3. El ensayo de viabilidad celular demostró que no existe diferencias en la reducción al entrar en contacto con el extracto de CIV y los CIVM, lo cuál indica que no existiría una contraindicación para el uso del material en cuanto a su composición.
4. Las pruebas microbiológicas concluyeron que para los CIVM con 2%, 3% y 4% NCu en contacto con las bacterias, la reducción de las UFC era mayor al 80%.
5. Para las pruebas mecánicas, hubo diferencias entre los grupos de CIVM, sin embargo, para el grupo con actividad antibacterial, el CIVM con 2% NCu, no era diferente al CIV.
6. Al final, se comprobó la liberación constante de fluoruro durante 28 días, debido a que esta liberación es fundamental para garantizar su acción como biomaterial.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. G. Ribeiro Targino; M. A. Pelagio Flores; V. E. Dos Santos Junior; F. de G. Bené Bezerra; *et al.*, An innovative approach to treating dental decay in children. A new anti-caries agent, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 25(8), 2041–2047, 2014.
2. C. Farrugia; J. Camilleri, Antimicrobial properties of conventional restorative filling materials and advances in antimicrobial properties of composite resins and glass ionomer cements-A literature review, *Dent. Mater.* 31(4), 89–99, 2015.
3. N. P. T. Chau; S. Pandit; J.-N. Cai; M.-H. Lee; *et al.*, Relationship between fluoride release rate and anti-cariogenic biofilm activity of glass ionomer cements, *Dent. Mater.* 31(4), 100–108, 2015.
4. C. H. Pameijer, A review of luting agents, *Int. J. Dent.* 2012(3), 1–7, 2012.
5. M. A. Fareed; A. Stamboulis, Effect of nanoclay dispersion on the properties of a commercial glass ionomer cement, *Int. J. Biomater.* 2014, 1–10, 2014.
6. D. C. Smith, Development of glass-ionomer cement systems, *Biomaterials* 19(6), 467–478, 1998.
7. A. F. Calvo Bissoto; A. Kicuti; T. K. Tedesco; M. M. Braga; *et al.*, Evaluation of the relationship between the cost and properties of glass ionomer cements indicated for atraumatic restorative treatment, *Braz. Oral Res.* 30(1), 3–9, 2016.
8. A. F. Calvo Bissoto; F. B. T. Alves; T. L. Lenzi; T. K. Tedesco; *et al.*, Glass ionomer cements bond stability in caries-affected primary dentin, *Int. J. Adhes. Adhes.* 48, 183–187, 2014.
9. A. Moshaverinia; S. Ansari; Z. Movasaghi; R. W. Billington; *et al.*, Modification of conventional glass-ionomer cements with N-vinylpyrrolidone containing polyacids, nano-hydroxy and fluoroapatite to improve mechanical properties, *Dent. Mater.* 24(10), 1381–1390, 2008.
10. P. Francois; E. Vennat; S. Le Goff; N. Ruscassier; *et al.*, Shear bond strength and interface analysis between a resin composite and a recent high-viscous glass ionomer cement bonded with various adhesive systems, *Clin. Oral Investig.* 23(6), 2599–2608, 2019.

11. J. W. Nicholson, Adhesion of glass-ionomer cements to teeth: A review, *Int. J. Adhes. Adhes.* 69, 33–38, 2016.
12. A. P. D. Ribeiro; N. T. Sacono; D. G. Soares; E. A. F. Bordini; *et al.*, Human pulp response to conventional and resin-modified glass ionomer cements applied in very deep cavities, *Clin. Oral Investig.* , 1–10, 2019.
13. S. K. Garoushi; J. He; P. K. Vallittu; L. V. J. Lassila, Effect of discontinuous glass fibers on mechanical properties of glass ionomer cement, *Acta Biomater. Odontol. Scand.* 4(1), 72–80, 2018.
14. M. S. Baig; G. J. P. Fleming, Conventional glass-ionomer materials: A review of the developments in glass powder, polyacid liquid and the strategies of reinforcement, *J. Dent.* 43(8), 897–912, 2015.
15. Ramashanker; R. D. Singh; P. Chand; S. K. Jurel; *et al.*, Evaluation of adhesive and compressive strength of glass ionomer cements, *J. Indian Prosthodont. Soc.* 11(4), 210–214, 2011.
16. U. Lohbauer, Dental Glass Ionomer Cements as Permanent Filling Materials? – Properties, Limitations and Future Trends, *Materials (Basel).* 3(1), 76–96, 2010.
17. N. Ilie, Maturation of restorative glass ionomers with simplified application procedure, *J. Dent.* 79(August), 46–52, 2018.
18. O. Bala; H. D. Arisu; I. Yikilgan; S. Arslan; *et al.*, Evaluation of surface roughness and hardness of different glass ionomer cements, *Eur. J. Dent.* 6(1), 79–86, 2012.
19. L. A. Hilgert; R. G. De Amorim; S. C. Leal; J. Mulder; *et al.*, Is high-viscosity glass-ionomer-cement a successor to amalgam for treating primary molars?, *Dent. Mater.* 30(10), 1172–1178, 2014.
20. C. C. Bonifácio; D. Hesse; R. de Oliveira Rocha; M. Bönecker; *et al.*, Survival rate of approximal-ART restorations using a two-layer technique for glass ionomer insertion, *Clin. Oral Investig.* 17(7), 1745–1750, 2013.
21. M. a van 't Hof; J. E. Frencken; W. H. van Palenstein Helderma; C. J. Holmgren, The atraumatic restorative treatment (ART) approach for managing dental caries: a meta-analysis, *Int. Dent. J.* 56(6), 345–351, 2006.
22. J. Zhao; Y. Weng; D. Xie, A novel high-wear-resistant glass-ionomer cement for

- class I and class II restorations, *Eur. J. Oral Sci.* 117(1), 86–89, 2009.
23. C. Bonifácio; C. Kleverlaan; D. Raggio; A. Werner; *et al.*, Physical-mechanical properties of glass ionomer cements indicated for atraumatic restorative treatment, *Aust. Dent. J.* 54(3), 233–237, 2009.
 24. G. F. Molina; R. J. Cabral; J. E. Frencken, The ART approach: clinical aspects reviewed, *J. Appl. oral Sci.* 17 Suppl, 89–98, 2009.
 25. J. E. Frencken; S. C. Leal; M. F. Navarro, Twenty-five-year atraumatic restorative treatment (ART) approach: a comprehensive overview, *Clin. Oral Investig.* 16(5), 1337–1346, 2012.
 26. J. E. Frencken, Evolution of the the ART approach: highlights and achievements, *J. Appl. oral Sci.* 17 Suppl, 78–83, 2009.
 27. H. C. Ngo; G. Mount; J. Mc Intyre; J. Tuisuva; *et al.*, Chemical exchange between glass-ionomer restorations and residual carious dentine in permanent molars: an in vivo study, *J. Dent.* 34(8), 608–613, 2006.
 28. J. M. C. Boaventura; M. J. Bertolini; G. C. Padovani; M. R. B. De Oliveira; *et al.*, Tissue response to experimental dental cements prepared from a modified power glass composition, *Dent. Mater. J.* 31(4), 583–592, 2012.
 29. Z. Wang; Y. Shen; M. Haapasalo, Dental materials with antibiofilm properties, *Dent. Mater.* 30(2), 1–16, 2014.
 30. G. Holla; R. Yeluri; A. K. Munshi, Evaluation of minimum inhibitory and minimum bactericidal concentration of nano-silver base inorganic anti-microbial agent (Novaron(®)) against streptococcus mutans, *Contemp. Clin. Dent.* 3(3), 288–293, 2012.
 31. S. B. P. Fúcio; A. B. de Paula; J. C. O. Sardi; C. Duque; *et al.*, Streptococcus Mutans biofilm influences on the antimicrobial properties of glass ionomer cements, *Braz. Dent. J.* 27(6), 681–687, 2016.
 32. T. M. Hafshejani; A. Zamanian; J. R. Venugopal; Z. Rezvani; *et al.*, Antibacterial glass-ionomer cement restorative materials: A critical review on the current status of extended release formulations, *J. Control. Release* 262(May), 317–328, 2017.
 33. X. Du; X. Huang; C. Huang; J. E. Frencken; *et al.*, Inhibition of early biofilm

- formation by glass-ionomer incorporated with chlorhexidine in vivo: a pilot study, *Aust. Dent. J.* 57(1), 58–64, 2012.
34. D. Xie; Y. Weng; X. Guo; J. Zhao; *et al.*, Preparation and evaluation of a novel glass-ionomer cement with antibacterial functions, *Dent. Mater.* 27(5), 487–496, 2011.
 35. H. Al Zraikat; J. E. a Palamara; H. H. Messer; M. F. Burrow; *et al.*, The incorporation of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate into a glass ionomer cement, *Dent. Mater.* 27(3), 235–243, 2011.
 36. S. Mo; W. Bao; G. Lai; J. Wang; *et al.*, The microfloral analysis of secondary caries biofilm around Class I and Class II composite and amalgam fillings, *BMC Infect. Dis.* 10(1), 1–6, 2010.
 37. P. Ahluwalia; S. Chopra; A. Thomas, Strength characteristics and marginal sealing ability of chlorhexidine-modified glass ionomer cement: an in vitro study, *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.* 30(1), 41–46, 2012.
 38. T. Tüzüner; T. Ulusu, Effect of antibacterial agents on the surface hardness of a conventional glass-ionomer cement, *J. Appl. oral Sci.* 20(1), 45–49, 2012.
 39. M. J. Wicht; R. Haak; S. Kneist; M. J. Noack, A triclosan-containing compomer reduces *Lactobacillus* spp. predominant in advanced carious lesions, *Dent. Mater.* 21(9), 831–836, 2005.
 40. S. E. Elsaka; I. M. Hamouda; M. V Swain, Titanium dioxide nanoparticles addition to a conventional glass-ionomer restorative: influence on physical and antibacterial properties, *J. Dent.* 39(9), 589–598, 2011.
 41. N. Topcuoglu; F. Ozan; M. Ozyurt; G. Kulekci, In vitro antibacterial effects of glass-ionomer cement containing ethanolic extract of propolis on *Streptococcus mutans*, *Eur. J. Dent.* 6(4), 428–433, 2012.
 42. M. Altunsoy; M. E. Uslu; S. Silici; M. Altunsoy, In Vitro Evaluation of Microleakage and Microhardness of Ethanolic Extracts of Propolis in Different Proportions Added to Glass Ionomer Cement, *J. Clin. Pediatr. Dent.* 40(2), 136–140, 2016.
 43. M. a S. Melo; J. Wu; M. D. Weir; H. H. K. Xu, Novel antibacterial orthodontic

- cement containing quaternary ammonium monomer dimethylaminododecyl methacrylate, *J. Dent.* , 1–9, 2014.
44. J. M. Antonucci; D. N. Zeiger; K. Tang; S. Lin-Gibson; *et al.*, Synthesis and characterization of dimethacrylates containing quaternary ammonium functionalities for dental applications, *Dent. Mater.* 28(2), 219–228, 2012.
 45. K. Zhang; M. A. S. Melo; L. Cheng; M. D. Weir; *et al.*, Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle-containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms, *Dent. Mater.* 28(8), 842–852, 2012.
 46. L. Cheng; M. D. Weir; K. Zhang; E. J. Wu; *et al.*, Dental plaque microcosm biofilm behavior on calcium phosphate nanocomposite with quaternary ammonium, *Dent. Mater.* 28(8), 853–862, 2012.
 47. V. a Lee; R. Karthikeyan; H. R. Rawls; B. T. Amaechi, Anti-cariogenic effect of a cetylpyridinium chloride-containing nanoemulsion, *J. Dent.* 38(9), 742–749, 2010.
 48. G. Grass; C. Rensing; M. Solioz, Metallic Copper as an Antimicrobial Surface, *Appl. Environ. Microbiol.* 77(5), 1541–1547, 2011.
 49. G. Borkow; J. Gabbay, Copper as a Biocidal Tool, *Curr. Med. Chem.* (12), 2163–2175, 2005.
 50. A. S. Abd-El-Aziz; C. Agatemor; N. Etkin, Antimicrobial resistance challenged with metal-based antimicrobial macromolecules, *Biomaterials* 118, 27–50, 2017.
 51. H. Palza, Antimicrobial polymers with metal nanoparticles, *Int. J. Mol. Sci.* 16(1), 2099–2116, 2015.
 52. S. Mathews; R. Kumar; M. Solioz, Copper reduction and contact killing of bacteria by iron surfaces, *Appl. Environ. Microbiol.* 81(18), 6399–6403, 2015.
 53. T. Kruk; K. Szczepanowicz; J. Stefańska; R. P. Socha; *et al.*, Synthesis and antimicrobial activity of monodisperse copper nanoparticles, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 128, 17–22, 2015.
 54. B. Khodashenas; H. R. Ghorbani, Synthesis of copper nanoparticles: An overview of the various methods, *Korean J. Chem. Eng.* 31(7), 1105–1109, 2014.
 55. K. V. T. Nguyen; F. S. Ameer; J. N. Anker; J. L. Brumaghim; *et al.*, Reactive Oxygen Species Generation by Copper(II) Oxide Nanoparticles Determined by DNA

- Damage Assays and EPR Spectroscopy, *Nanotoxicology* 11(2), 278–288, 2017.
56. M. H. Toodehzaeim; H. Zandi; H. Meshkani; A. H. Firouzabadi, The Effect of CuO Nanoparticles on Antimicrobial Effects and Shear Bond Strength of Orthodontic Adhesives, *J. Dent.* 19(1), 1–5, 2018.
 57. M. Valodkar; P. S. Rathore; R. N. Jadeja; M. Thounaojam; *et al.*, Cytotoxicity evaluation and antimicrobial studies of starch capped water soluble copper nanoparticles, *J. Hazard. Mater.* 201–202, 244–249, 2012.
 58. M. Hans; A. Erbe; S. Mathews; Y. Chen; *et al.*, Role of copper oxides in contact killing of bacteria, *Langmuir* 29(52), 16160–16166, 2013.
 59. M. Grigore; E. Biscu; A. Holban; M. Gestal; *et al.*, Methods of Synthesis, Properties and Biomedical Applications of CuO Nanoparticles, *Pharmaceuticals* 75(9), 1–14, 2016.
 60. T. Ostaszewska; M. Chojnacki; M. Kamaszewski; E. Sawosz-Chwalib??g, Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(2), 1621–1633, 2016.
 61. M. Sajid; M. Ilyas; C. Basheer; M. Tariq; *et al.*, Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22(6), 4122–4143, 2015.
 62. A. F. Halbus; T. S. Horozov; V. N. Paunov, Colloid particle formulations for antimicrobial applications, *Adv. Colloid Interface Sci.* 249(January), 134–148, 2017.
 63. W. Yu; H. Xie; L. Chen; Y. Li; *et al.*, Synthesis and Characterization of Monodispersed Copper Colloids in Polar Solvents, *Nanoscale Res. Lett.* 4(5), 465–470, 2009.
 64. A. Khan; A. Rashid; R. Younas; R. Chong, A chemical reduction approach to the synthesis of copper nanoparticles, *Int. Nano Lett.* 6(1), 21–26, 2016.
 65. International Organization for Standardisation ISO 9917- 1:2007. Dentistry – water-based cements Part 1. Powder/ liquid acid–base cements.
 66. International Organization for Standardization. ISO 9917- 2:2007. Water-based cements - Part 2: Resin-modified cements.
 67. International Organization for Standardisation ISO/TS 11405:2015. Dentistry —

Testing of adhesion to tooth structure.

68. International Organization for Standardisation ISO 29022:2013. Dentistry — Adhesion-Notched-edge shear bond strength test.
69. V. M. Castaño; M. A. Aguilar-Méndez; L. Ortega-Arroyo; X. López-Andrade; *et al.*, Green chemistry synthesis of nano-cuprous oxide, *IET Nanobiotechnology* 10(2), 39–44, 2016.
70. K. Vijayalakshmi; T. Gomathi; S. Latha; T. Hajeeth; *et al.*, Removal of copper(II) from aqueous solution using nanochitosan/sodium alginate/microcrystalline cellulose beads, *Int. J. Biol. Macromol.* , 1–13, 2015.
71. A. Umer; S. Naveed; N. Ramzan, A green method for the synthesis of Copper Nanoparticles using L-ascorbic acid, *Rev. Mater.* 19(3), 197–203, 2014.
72. A. Fakhri; M. Pourmand; R. Khakpour; S. Behrouz, Structural, optical, photoluminescence and antibacterial properties of copper-doped silver sulfide nanoparticles, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 149, 78–83, 2015.
73. C. Zhao; C.-C. Wang; J.-Q. Li; P. Wang; *et al.*, Interactions between copper(II) and DOM in the urban stormwater runoff: modeling and characterizations, *Environ. Technol.* 39(1), 1–10, 2017.
74. T. Sinha; M. Ahmaruzzaman, Green synthesis of copper nanoparticles for the efficient removal (degradation) of dye from aqueous phase, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22(24), 20092–20100, 2015.
75. R. A. Popescu; K. Magyari; A. Vulpoi; D. L. Trandafir; *et al.*, Bioactive and biocompatible copper containing glass-ceramics with remarkable antibacterial properties and high cell viability designed for future in vivo trials, *Biomater. Sci.* 4(8), 1252–1265, 2016.
76. M. B. Gawande; A. Goswami; F. X. Felpin; T. Asefa; *et al.*, Cu and Cu-Based Nanoparticles: Synthesis and Applications in Catalysis, *Chem. Rev.* 116(6), 3722–3811, 2016.
77. T. Theivasanthi; M. Alagar, X-Ray Diffraction Studies of Copper Nanopowder, *Arch. Phys. Res.* 1(2), 112–117, 2010.
78. C. Wu; B. P. Mosher; T. Zeng, One-step green route to narrowly dispersed copper

- nanocrystals, *J. Nanoparticle Res.* 8(6), 965–969, 2006.
79. Y. Kobayashi; T. Shirochi; Y. Yasuda; T. Morita, Preparation of metallic copper nanoparticles in aqueous solution and their bonding properties, *Solid State Sci.* 13(3), 553–558, 2011.
 80. A. Sedighi; M. Montazer; N. Samadi, Synthesis of nano Cu₂O on cotton: Morphological, physical, biological and optical sensing characterizations, *Carbohydr. Polym.* 110, 489–498, 2014.
 81. T. Theivasanthi; M. Alagar, Studies of Copper Nanoparticles Effects on Micro-organisms, *Ann. Biol. Res.* 2(3), 368–373, 2011.
 82. F. Parveen; B. Sannakki; M. V. Mandke; H. M. Pathan, Copper nanoparticles: Synthesis methods and its light harvesting performance, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* 144, 371–382, 2016.
 83. B. H. . Eversole J.D, Size and shape effects in light scattering from small silver, copper, and gold particles, *J. Chem. Inf. Model.* 53(9), 1689–1699, 2013.
 84. M. Valodkar; S. Modi; A. Pal; S. Thakore, Synthesis and anti-bacterial activity of Cu, Ag and Cu–Ag alloy nanoparticles: A green approach, *Mater. Res. Bull.* 46(3), 384–389, 2011.
 85. Y. Kobayashi; T. Shirochi; Y. Yasuda; T. Morita, Metal–metal bonding process using metallic copper nanoparticles prepared in aqueous solution, *Int. J. Adhes. Adhes.* 33, 50–55, 2012.
 86. T. Yu; T. Koh; B. Lim, Synthesis of Copper Nanoparticles with Controlled Sizes by Reverse Micelle Method, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 13(5), 3250–3253, 2013.
 87. J. W. Nicholson; P. J. Brookman; O. M. Lacy; A. D. Wilson, of the Role of Tartaric Acid in Glass-ionomer Dental Cements, *J Dent Res* 67(12), 1451–1454, 1988.
 88. E. De Maeyer; R. Verbeeck; C. Vercruysse, Infrared Spectrometric Study of Acid-degradable Glasses, *J Dent Res* 81(8), 552–556, 2002.
 89. L. E. S. Soares; A. L. S. Soares; R. De Oliveira; S. Nahórny, The effects of acid erosion and remineralization on enamel and three different dental materials: FT-Raman spectroscopy and scanning electron microscopy analysis, *Microsc. Res. Tech.* 79(7), 646–656, 2016.

90. R. Hajimammadov; A. Bykov; A. Popov; K. L. Juhasz; *et al.*, Random networks of core-shell-like Cu-Cu₂O/CuO nanowires as surface plasmon resonance-enhanced sensors, *Sci. Rep.* 8(1), 4–11, 2018.
91. R. L. Zanata; A. C. Magalhães; J. R. P. Lauris; M. T. Atta; *et al.*, Microhardness and chemical analysis of high-viscous glass-ionomer cement after 10 years of clinical service as ART restorations, *J. Dent.* 39(12), 834–840, 2011.
92. R. Ahmad Shiekh; I. Ab Rahman; S. Malik Masudi; N. Luddin, Modification of glass ionomer cement by incorporating hydroxyapatite-silica nano-powder composite: Sol–gel synthesis and characterization, *Ceram. Int.* 40(2), 3165–3170, 2014.
93. J. Zoergiebel; N. Ilie, An in vitro study on the maturation of conventional glass ionomer cements and their interface to dentin, *Acta Biomater.* 9(12), 9529–9537, 2013.
94. M. A. Shah, Preparation of Copper (Cu) and Copper Oxide (Cu₂O) Nanoparticles under Supercritical Conditions, *Mater. Sci. Appl.* 02(08), 977–980, 2011.
95. M. C. Biesinger; L. W. M. Lau; A. R. Gerson; R. S. C. Smart, Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and Zn, *Appl. Surf. Sci.* 257(3), 887–898, 2010.
96. H. E. Sennou; A. a. Lebugle; G. L. Grégoire, X-ray photoelectron spectroscopy study of the dentin–glass ionomer cement interface, *Dent. Mater.* 15(4), 229–237, 1999.
97. M. Es-Souni; H. Fischer-Brandies; V. Zaporozhshenko; M. Es-Souni, On the interaction of polyacrylic acid as a conditioning agent with bovine enamel, *Biomaterials* 23(14), 2871–2878, 2002.
98. A. Laiteerapong; Y. Lochaiwatana; I. Hirata; M. Okazaki; *et al.*, A novel glass ionomer cement containing MgCO₃ apatite induced the increased proliferation and differentiation of human pulp cells in vitro, *Dent. Mater. J.* 31(5), 772–778, 2012.
99. P. C. Hadley; E. Milella; C. Gerardi; R. G. Hill; *et al.*, Distribution of fluoride in glass ionomer cement determined using SIMS, *Biomaterials* 22(12), 1563–1569, 2001.

100. M. Khaghani; S. Alizadeh; A. Doostmohammadi, Influence of Incorporating Fluoroapatite Nanobioceramic on the Compressive Strength and Bioactivity of Glass Ionomer Cement, *J. Dent. Biomater.* 3(3), 276–283, 2016.
101. T. De Caluwé; C. W. J. Vercruyse; S. Fraeyman; R. M. H. Verbeeck, The influence of particle size and fluorine content of aluminosilicate glass on the glass ionomer cement properties, *Dent. Mater.* 30(9), 1029–1038, 2014.
102. J. Foley; A. Blackwell, Ion Release from Copper Phosphate Cement and Influence on Streptococcus mutans Growth in vitro: A Comparative Study, *Caries Res.* 37(6), 416–424, 2003.
103. T. Kanjevac; M. Milovanovic; V. Volarevic; M. L. Lukic; *et al.*, Cytotoxic effects of glass ionomer cements on human dental pulp stem cells correlate with fluoride release, *Med. Chem. (Los. Angeles).* 8(1), 40–45, 2012.
104. P.-C. Siqueira; A.-P.-R. Magalhaes; W.-C. Pires; F.-C. Pereira; *et al.*, Cytotoxicity of glass ionomer cements containing silver nanoparticles, *J. Clin. Exp. Dent.* 7(5), 622–627, 2015.
105. C. Covarrubias; D. Trepiana; C. Corral, Synthesis of hybrid copper-chitosan nanoparticles with antibacterial activity against cariogenic Streptococcus mutans, *Dent. Mater. J.* 37(3), 379–384, 2018.
106. M. F. Gutiérrez; P. Malaquias; V. Hass; T. P. Matos; *et al.*, The role of copper nanoparticles in an etch-and-rinse adhesive on antimicrobial activity, mechanical properties and the durability of resin-dentine interfaces, *J. Dent.* 61, 12–20, 2017.
107. E. Łuczaj-Cepowicz; A. Zalewska; G. Marczuk-Kolada; M. Pawińska; *et al.*, Antibacterial activity of selected glass ionomer cements, *Postep. Hig Med Dosw* 68, 23–28, 2014.
108. C. Zelmer; D. K. Wang; I. Keen; D. J. T. Hill; *et al.*, Synthesis and characterization of POSS-(PAA)₈ star copolymers and GICs for dental applications, *Dent. Mater.* 32(4), 82–92, 2016.
109. L. C. Pereira; M. C. P. Nunes; R. G. P. Dibb; J. M. Powers; *et al.*, Mechanical properties and bond strength of glass-ionomer cements, *J. Adhes. Dent.* 4(1), 73–80, 2002.

110. S. Naoum; E. Martin; A. Ellakwa, Long-Term Fluoride Exchanges at Restoration Surfaces and Effects on Surface Mechanical Properties, *ISRN Dent.* 2013, 1–8, 2013.
111. A. H. Dowling; G. J. P. Fleming, Can poly(acrylic) acid molecular weight mixtures improve the compressive fracture strength and elastic modulus of a glass-ionomer restorative?, *Dent. Mater.* 27(11), 1170–1179, 2011.
112. M. A. Faridi; A. Khabeer; S. Haroon, Flexural Strength of Glass Carbomer Cement and Conventional Glass Ionomer Cement Stored in Different Storage Media over Time, *Med. Princ. Pract.* 27(4), 372–377, 2018.
113. M. Moberg; J. Brewster; J. Nicholson; H. Roberts, Physical property investigation of contemporary glass ionomer and resin-modified glass ionomer restorative materials, *Clin. Oral Investig.* 23(3), 1295–1308, 2019.
114. R. Garcia-Contreras; R. J. Scougall-Vilchis; R. Contreras-Bulnes; H. Sakagami; *et al.*, Mechanical, antibacterial and bond strength properties of nano-titanium-enriched glass ionomer cement, *J. Appl. Oral Sci.* 23(3), 321–328, 2015.
115. T. Carvalho; W. van Amerongen; A. de Gee; M. Bonecker; *et al.*, Shear bond strengths of three glass ionomer cements to enamel and dentine, *Med. Oral Patol. Oral y Cir. Bucal* 16(3), 406–410, 2011.