



Universidad
de Concepción



DIRECCIÓN DE
POSTGRADO

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
Facultad de Ingeniería- Departamento de Ingeniería de Materiales,
DIMAT

**DESARROLLO DE GELES BIOCOMPATIBLES A PARTIR SOLES
METÁLICOS PARA REDUCIR EL RIESGO DE INFECCIONES
ENDODÓNTICAS EN PROCEDIMIENTOS DE ENDODONCIA
REGENERATIVA: ESTUDIOS *IN VITRO* Y PRECLÍNICOS *EX VIVO*.**

**Tesis doctoral para optar por el título de
Doctora en Ciencias e Ingeniería de Materiales**

Maria Elizabeth Berrio Niño

Tutor Responsable:
Manuel Melendrez Castro
Profesor Asistente,
Departamento de Ingeniería de Materiales (DIMAT),
Facultad de Ingeniería, Universidad de Concepción,
Concepción, Chile

Cotutor Responsable
Gabriela Sánchez Sanhuesa
Profesor Asociado,
Departamento de Odontología Restauradora,
Facultad de Odontología, Universidad de Concepción
Concepción, Chile

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a:

A la Universidad de Concepción, a todos los profesores que en ella me enseñaron, y en especial a la Dirección de Posgrado, el Programa de Doctorado en Ciencia e Ingeniería de Materiales y al Departamento de Ingeniería de Materiales (DIMAT) por aportar las herramientas necesarias en mi desarrollo y evolución científica.

Al Grupo de Investigación en Nanocompuestos Avanzados (GINA) y por la financiación, acompañamiento y apoyo brindado, a todos sus integrantes por compartir conmigo su conocimiento, experiencias, amistad y confianza.

Al Dr. Manuel Melendrez y a la Dra. Gabriela Sánchez, por acompañarme, guiarme y aconsejarme no solo en el desarrollo de este trabajo de investigación, si no en aspectos personales de mi vida.

A mis padres Ana y Luis, a mi hermano Daniel y a toda mi familia por su compañía, cariño y por brindarme su apoyo incondicional en el largo camino de mi carrera y de mi vida.

Por último, a la agencia nacional de investigación y desarrollo ANID, por el apoyo al desarrollo de este Doctorado por medio de la Beca Doctorado Nacional CONICYT/ANID/Doctorado Nacional 2020-538058 y al Proyecto FONDECYT-IN 2020 No. 11201236.

Resumen

La odontología actual requiere la constante búsqueda de materiales con potenciales propiedades antimicrobianas que potencien la durabilidad de los tratamientos odontológicos. Esto toma gran relevancia en la prevención de infecciones bucales debido a la creciente bioresistencia de los microorganismos involucrados, producida principalmente por el abuso de medicamentos antimicrobianos. Es así que, se hace necesario el desarrollo de materiales preventivos y restaurativos con elevada biocompatibilidad, resistencia mecánica, adhesión, uso confiable tanto en la clínica como en el laboratorio, fácil manipulación, y actividad biocida. Sin embargo, las principales limitaciones son la baja disponibilidad, y dificultad de su aplicación por los equipos y necesidades técnicas para su uso. En este contexto, el uso de sistemas coloidales metálicos es una alternativa viable y confiable para el desarrollo de polímeros nanoestructurados biocompatibles y antibacterianos, que permitan una fácil aplicación y un control o erradicación de las biopelículas bacterianas en la cavidad bucal. Es por ello, que el objetivo de esta investigación se centra en el desarrollo de geles poliméricos nanoestructurados, formados a partir de suspensiones coloidales de plata y cobre. Las estrategias llevadas a cabo para el cumplimiento de este objetivo tienen en cuenta la síntesis electroquímica asistida por gradiente de concentración, síntesis por calentamiento asistido por microondas y su estabilización con sistemas poliméricos funcionales y biocompatibles. Así, se apunta al desarrollo de materiales como potenciales agentes desinfectantes en terapias odontológicas, dentro de ellas específicamente los procedimientos de endodoncia regenerativa, incrementando las posibilidades y oportunidades de minimizar el riesgo de infección y evitar la proliferación de una microbiota oral resistente.

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos	ii
Resumen	iii
Índice de Figuras	iv
Índice de Tablas	ix
CAPÍTULO 1.....	1
1. Introducción.....	1
1.2 Justificación de la investigación.....	2
CAPÍTULO 2.....	5
2. Estado del Arte	5
2.1 Mecanismos y materiales de desinfección intraconducto.....	5
2.1.1 Procesos de desinfección basados métodos convencionales.....	5
2.1.2 Procesos de desinfección basados en NPs.....	8
2.1.3 Métodos de obtención de NPs.....	11
2.1.4 Métodos de obtención de sistemas poliméricos nanoestructurados.....	14
2.2 Hipótesis y Objetivos.....	17
2.2.1 Hipótesis.....	17
2.2.2 Objetivos.....	18
2.2.2.1 Objetivo General.....	18
2.2.2.2 Objetivos específicos.....	18
CAPÍTULO 3.....	19
3. Metodología.....	19
3.1 Obtención de hidrosoles y soles metálicos de plata y cobre.....	19
3.1.1 Obtención de hidrosoles de plata y cobre mediante síntesis electroquímica.....	20
3.1.2 Obtención de soles de plata y cobre mediante calentamiento asistido por microondas.....	20
3.1.3 Caracterización de los soles de plata y cobre.....	21

3.1.3.1 Caracterización fisicoquímica.....	21
3.1.1.2 Evaluación Biológica.....	21
3.2 Desarrollo de geles poliméricos a partir de los soles metálicos estabilizados con PVA y PVP.....	22
3.2.1 Síntesis de los geles nanoestructurados mediante entrelazamiento en un solo paso con PVP.....	22
3.2.2 Síntesis de los geles nanoestructurados mediante entrelazamiento en dos pasos con PVP.....	23
3.2.3 Caracterización de los geles obtenidos.....	23
3.2.3.1 Caracterización fisicoquímica.....	23
3.2.3.2 Evaluación Biológica.....	24
3.2.3.2.1 Estudio antibacteriano <i>in vitro</i>	24
3.2.3.2.2 Estudio antibacteriano <i>ex vivo</i>	26
3.2.3.2.3 Estudio de citotoxicidad <i>in vitro</i>	26
CAPÍTULO 4.....	28
4. Resultados.....	28
4.1 Obtención de hidrosoles de plata y cobre mediante síntesis electroquímica.....	28
4.1.1 Hidrosoles de plata y cobre (Ag/Hidrosol y Cu/Hidrosol).....	28
4.2 Obtención de soles de plata y cobre mediante calentamiento asistido por microondas (Ag/sol y Cu/sol).....	39
4.4 Desarrollo de geles nanoestructurados con PVA y PVP.....	46
4.4.1 Síntesis de los geles nanoestructurados mediante entrelazamiento en un solo paso con PVP.....	46

4.4.1.1 Síntesis de los geles nanoestructurados con AgNPs mediante entrelazamiento en un solo paso con PVP (1P-Ag/gel).....	47
4.4.1.2 Síntesis de los geles nanoestructurados con CuNPs mediante entrelazamiento en un solo paso con PVP (Cu/1P-gel).....	55
4.4.2 Síntesis de los geles nanoestructurados con mediante entrelazamiento en dos pasos con PVP (Ag/2P-gel y Cu/2P-gel).....	61
4.4.3 Estudio biológico de los geles nanoestructurados mediante entrelazamiento en un solo paso con PVP (Ag/1P-gel y Cu/1P-gel).....	66
4.4.4 Estudio biológico de los geles nanoestructurados mediante entrelazamiento en uno y dos pasos con PVP (Ag/2P-gel y Cu/2P-gel).....	70
Conclusiones.....	79
Referencias.....	81
Anexos.....	102
Artículo 1: Novel antibacterial and biocompatible nanostructured gels based on one-step synthesis as a potential disinfectant for endodontic infection control.	
Patente: Proceso para la obtención de geles biocompatibles antimicrobianos en un solo paso con nanopartículas encapsuladas mediante reducción in situ asistida por microondas.	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Irrigantes desinfectantes convencionales (**P <0.01. n.s.).

Figura 2. a) Sistema de calentamiento asistido por microondas para la reducción de sales metálicas. b) Sistema de concentración variable.

Figura 3. Espectro de absorción Uv-vis de los Ag/hidrosoles en a) PVA, b) PVP, c) PAA y d) CT obtenidos mediante síntesis electroquímica en celda de concentración variable sin membrana evaluados a 5 min, 10 min, 15 min, 30 min y 60 min.

Figura 4. Espectro de absorción Uv-vis de los Ag/Hidrosol 4 días después de la síntesis en PVA a) 0.10 mM, b) 0.05 mM y c) 0.01 mM obtenidos mediante síntesis electroquímica en celda de concentración variable sin membrana evaluados a 5 min, 10 min, 15 min, 30 min y 60 min.

Figura 5. Esquema del mecanismo de obtención de Ag/Hidrosol con a) PVA y b) PVP.

Figura 6. Espectro de absorción Uv-vis de los Ag/hidrosol obtenidos mediante síntesis electroquímica en celda de concentración variable en agua desionizada durante 1 y 8 horas utilizando membrana de Agar/Agarosa:carbón activo a una relación p/p de a) 1:0, b) sin membrana, c) 1:1, d) 1:2, e) 2:1. Espectro de absorción Uv-vis de los Ag/hidrosoles obtenidos mediante síntesis electroquímica en celda de concentración variable en solución de PVA a 0.10 mM utilizando membrana de Agar/Agarosa:carbón activo a una relación p/p de 1:0 y membrana comercial de celulosa durante 26 y 17 horas respectivamente evaluado en el tiempo; f) día 1, g) día 2000.

Figura 7. Ag/Hidrosol obtenidos mediante síntesis electroquímica en celda de concentración variable en PVA a 0.01 mM, 0.05 mM y 0.10 mM utilizando membrana comercial de celulosa durante 17 horas; a) Espectro de absorción Uv-vis, b) Análisis DLS, c) Potencial zeta, d)

Imágenes TEM, e) Patrón de Difracción de Área Selecta (SAED), f) Reconstrucción 3D de la celda unitaria FCC característica de la plata.

Figura 8. Cu/Hidrosol obtenidos mediante síntesis electroquímica en celda de concentración variable en PVA a 0.01 mM, 0.05 mM y 0.10 mM utilizando membrana comercial de celulosa durante 17 horas; a) Espectro de absorción Uv-vis, b) Análisis DLS, c) Potencial zeta, d) Imágenes TEM, e) Patrón de Difracción de Área Selecta (SAED), f) Reconstrucción 3D de la celda unitaria FCC característica de la plata.

Figura 9. Ag/sol obtenidos mediante síntesis asistida por microondas; Imágenes TEM de los soles de plata en PVP a a) 0.10 mM, b) 0.08 mM y c) 0.05 mM. Imágenes HR-TEM de las nanopartículas de plata esféricas individuales d) Espaciado de red, e) Patrón de difracción de electrones del área seleccionada, f) Espectro de absorción Uv-vis de los Ag/sol a [0.1 mM] obtenidos mediante calentamiento durante 1 min, 5 min, 10 min, 15 min y 20 min, g) Espectro de absorción Uv-vis de los Ag/sol a diferentes concentraciones y h) Análisis DLS.

Figura 10. Reconstrucción 3D de la celda unitaria FCC característica de la plata para los Ag/sol.

Figura 11. Esquema del mecanismo Whitmore para la formación de acetaldehído a partir de la descomposición de las moléculas de EG del PEG.

Figura 12. Espectro Uv-vis para los Cu/sol en PVP a 0.10 mM, 0.08 mM y 0.05 mM.

Figura 13. Cu/sol obtenidos mediante síntesis asistida por microondas; Imágenes TEM de los soles de cobre en PVP a a) 0.10 mM, b) 0.08 mM y c) 0.05 mM. Imágenes HR-TEM de las nanopartículas de cobre esféricas individuales d) Espaciado de red, e) Patrón de difracción de electrones del área seleccionada, f) Reconstrucción 3D de la celda unitaria FCC característica del cobre y g) Análisis DLS de los Cu/sol a diferentes concentraciones.

Figura 14. Ag/IP-gel obtenidos con diferente relación molar PVA:PVP

Figura 15. Evaluación de propiedades fisicoquímicas de los 1P-Ag/gel obtenidos con diferente relación molar PVA:PVP, a) Perfiles de hinchazón y b) solubilidad. c) propiedades reológicas.

Figura 16. Micrografías SEM e imágenes AFM para Ag/1P-gel. Micrografías SEM de la superficie y sección transversal, reconstrucción AFM 3D e imagen de fase original 3x3 μm para 0.3-Ag/1P-gel con contenido de 0.3 PVA, 0.5-Ag/1P-gel con contenido de 0.5 PVA, 1.0-Ag/1P-gel con contenido de 1.0 PVA.

Figura 17. Análisis por Microscopía Electrónica de transmisión (TEM) para para 0.3-Ag/1P-gel con contenido de 0.3 PVA, 0.5-Ag/1P-gel con contenido de 0.5 PVA y 1.0-Ag/1P-gel con contenido de 1.0 PVA.

Figura 18. Espectro FT-IR/ATR de los Ag/1P-gel y Cu/1P-gel

Figura 19. a) Espectros RAMAN para los Ag/1P-gel con el aumento de PVA con respecto a la PVP b) PVP, c) 0.3-Ag/1P-gel, d) 0.5-Ag/1P-gel y e) 1.0-Ag/1P-gel

Figura 20. Cu/1P-gel obtenidos con diferente relación molar PVA:PVP

Figura 21. Evaluación de propiedades fisicoquímicas de los 1P-Cu/gel obtenidos con diferente relación molar PVA:PVP, a) Perfiles de hinchazón y b) solubilidad. c) propiedades reológicas.

Figura 22. Micrografías SEM e imágenes AFM para Cu/1P-gel. Micrografías SEM de la superficie y sección transversal, reconstrucción AFM 3D e imagen de fase original 3x3 μm para 0.3-Cu/1P-gel con contenido de 0.3 PVA, 0.5-Cu/1P-gel con contenido de 0.5 PVA, 1.0-Cu/1P-gel con contenido de 1.0 PVA.

Figura 23. Análisis por Microscopía Electrónica de transmisión (TEM) para para 0.3-Cu/1P-gel con contenido de 0.3 PVA, 0.5-Cu/1P-gel con contenido de 0.5 PVA y 1.0-Cu/1P-gel con contenido de 1.0 PVA.

Figura 24. a) Espectros RAMAN para los Cu/1P-gel con el aumento de PVA con respecto a la PVP b) PVP, c) 0.3-Cu/1P-gel, d) 0.5-Cu/1P-gel y e) 1.0-Cu/1P-gel.

Figura 25. a) Espectro UV-vis y b) Imagen TEM de los Ag/2P-gel y Cu/2P-gel con respecto al Ag/sol y Cu/sol respectivamente.

Figura 26. a) Reconstrucción AFM 3D, b) Imagen de fase original 3x3 μm , y c) Micrografías SEM de la superficie para Ag/2P-gel y Cu/2P-gel.

Figura 27. Análisis cualitativo en agar para Ag/1P-gel (a-c), Cu/1P-gel (d-f) y geles blanco (g-i) con diferente relación PVA:PVP respectivamente.

Figura 28. Comportamiento antibacteriano *in vitro* mediante ensayo cuantitativo que evalúa los efectos de la cinética de eliminación del tiempo en dos tiempos de contacto diferentes: a) Ag/1P-gel, b) Cu/1P-gel, con diferente relación PVA:PVP frente a la cepa clínica *E. faecalis* C3. $P^{**} 0.0042$, $P^{***} 0.0003$, $P^{****} < 0.0001$. Pruebas de viabilidad celular y citotoxicidad mediante c) Muerte celular, d) Proliferación y e) Confluencia, contra células del ligamento periodontal humano (HPDL). f) Imágenes de análisis de células vivas en tiempo real después de 72 h.

Figura 29. Evaluación biológica de los geles obtenidos mediante la metodología en dos pasos: a) Curvas de muerte evaluadas con Ag/soles a diferentes concentraciones frente al control sin material y control bacterial. b) Curvas de muerte evaluadas con Cu/soles a diferentes concentraciones frente al control sin material y control bacterial, c) Curvas de muerte evaluadas con Ag/2P gel (pregel) y Cu/2P gel (pregel) frente a su respectivo sol Ag/sol y Cu/sol respectivamente, el control sin material y control bacterial, d) Curvas de muerte evaluadas con Ag/2P gel y Cu/2P gel frente al control sin material y control bacterial, e) Curvas de muerte evaluadas con Cu/2P gel frente a su respectivo Cu/sol, el Blanco/2P-gel, el control sin material y control bacterial, f) Efecto de los Ag/sol, g) Cu/sol y h) Ag/2P-gel y

Cu/2P-gel frente a las células HGFs en el tiempo (0 h, 24 h, 48 h y 72 h) en comparación con el control sin material y los geles Ag/1P-gel y Cu/1P-gel.

soles precursores, los pregeles y los respectivos geles.

Figura 30. Actividad antibacteriana a distintos tiempos de acción utilizando el modelo de película multiespecie: a) Porcentaje del volumen de biomasa de células muertas de biopelícula multiespecie madura frente a Ag/2P-gel y Cu/2P-gel a 1 h, 24 h y 168 h de acción. b) Volúmenes de biomasa de células vivas y muertas de biopelículas multiespecie madura en contacto con Ag/2P-gel y Cu/2P-gel a 1 h y c) 168 h.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Las características de tres procedimientos de tratamiento para la restauración de raíces.

Tabla 2. Nanopartículas comúnmente utilizadas en el tratamiento antibacteriano intraconducto.

Tabla 3. Datos reológicos de geles para los Ag/1P-gel con diferente relación PVA:PVP y consistencia física.

Tabla 4. Propiedades superficiales de los Ag/1P-gel con diferentes relaciones PVA:PVP.

Tabla 5. Datos reológicos de geles para los Cu/1P-gel con diferente relación PVA:PVP y consistencia física

Tabla 6. Propiedades superficiales de los Cu/1P-gel con diferentes relaciones PVA:PVP.

Tabla 7. Propiedades superficiales y reológicas de los Ag/sol, Cu/sol, Ag/2P-gel y Cu/2P-gel.

Tabla 8. Evaluación de CMI y CMB de los soles y respectivos pregeles.

CAPÍTULO 1

1. Introducción

Las infecciones endodónticas pueden surgir principalmente como resultado de caries no tratadas, traumatismos dentales o enfermedades periodontales. Estas infecciones no solo causan dolor y malestar localizado, sino que también pueden generar la pérdida del diente y extenderse a otras áreas anatómicas, afectando la salud general de las personas. Por lo tanto, un tratamiento de endodoncia exitoso depende de la efectividad de los productos, materiales o procedimientos llevados a cabo para limpiar y desinfectar la zona bucal y así minimizar el riesgo de infección postratamiento. Sin embargo, este objetivo no siempre es alcanzado, debido a la imposibilidad de eliminar completamente los microorganismos dentro de complejidad anatómica de los túbulos dentinarios del de conductos radiculares en el diente y por fenómenos de microfiltración bacteriana, los cuales impiden una correcta desinfección endodóntica para el mantenimiento de la pieza dental (García-Rubio et al., 2015; Martínez & Ruiz, 2005).

Esta complicación se presenta por la formación de sistemas microbianos altamente resistentes denominados biopelículas, que, además de impedir la efectividad del proceso de desinfección, se asocian con el aumento de la patogenicidad y virulencia de las infecciones (Moreno et al., 2017; Salas-Orozco et al., 2019). La formación de estas comunidades bacterianas se ve influenciada por diversos factores, como lo son: 1) El ambiente de la cavidad bucal, el cual proporciona humedad, temperatura, pH y nutrientes adecuados para el crecimiento bacteriano. 2) La naturaleza estructural de la dentina, la cual es altamente porosa debido a la presencia de túbulos dentinarios, haciendo que su superficie también permita la

fácil colonización, proliferación y el difícil acceso a estos sistemas. Y finalmente, 3) La farmacorresistencia que desarrollan las bacterias frente a los diversos agentes antimicrobianos utilizados (Bleuel et al., 2018; Dhir, 2013; Valdés, 2017). Se ha reportado que aproximadamente el 79% de los dientes tratados endodónticamente en presencia de estas biopelículas bacterianas o bacterias persistentes mostraron lesiones mucho más graves llegando hasta la zona periapical, comprometiendo así las raíces de los dientes (Fabricius et al., 2006).

Bajo este contexto, el gran desafío en los procedimientos endodónticos es el uso de materiales y sistemas que permitan la destrucción de las biopelículas bacterianas o bien la alteración del medio que propicia su desarrollo, y así lograr una completa eliminación y prevención de estas infecciones endodónticas en un amplio espectro bacteriano.

Debido a lo anterior, se han desarrollado sistemas de nanopartículas metálicas como agentes antimicrobianos de amplio espectro bacteriano, lo que ha impulsado el desarrollo de nuevos materiales con actividad antimicrobiana. Sin embargo, la citotoxicidad generada por estas nanoestructuras está ampliamente reportada. Estudios anteriores han sugerido que la liberación controlada de nanopartículas antibacterianas puede mejorar el medio ambiente local y ejercer un efecto antibacteriano. Sin embargo, en los métodos de síntesis más utilizados, se necesitan varios pasos de purificación debido a la generación de subproductos en cada reacción. Los subproductos que comprometen las propiedades inofensivas del material final interfieren con las aplicaciones que requieren biocompatibilidad. Recientemente, se han utilizado estrategias que utilizan microondas como herramienta de calentamiento rápido en síntesis de nanopartículas metálicas, polimerización asistida y descomposición química, y síntesis de polímeros mediante apertura de anillos, síntesis electroquímica, radicales libres y crecimiento escalonado, entre otras. Sin embargo, el

problema de utilizar sólo agentes químicos inocuos en lugar de tóxicos aún no se ha resuelto, y la síntesis por microondas en un solo paso de sistemas poliméricos aún no se ha explotado, especialmente en sistemas nanoestructurados. En consecuencia, esta investigación se enfocó en el desarrollo y la aplicación de geles nanoestructurados con un alto efecto antimicrobiano y biocompatible aplicados como potenciales agentes desinfectantes en los protocolos de desinfección de los conductos radiculares, como solución de las situaciones ya mencionadas.

1.1 Justificación de la investigación

Según los diagnósticos nacionales de salud bucal entre 2007 y 2010 realizados por el Plan Nacional de Salud Bucal en Chile para 2021-2030, la caries dental y las enfermedades periodontales (dos afecciones prevalentes en la población chilena) son los principales contribuyentes a la pérdida de dientes. Estas condiciones, cuando no se abordan de manera oportuna, pueden llevar a la destrucción del tejido dental y la consiguiente necesidad de extracciones. La Encuesta Nacional de Salud 2016-2017 revela datos alarmantes sobre la prevalencia del edentulismo (pérdida total de los dientes) en Chile. Solo el 68% de las personas entre 15 a 24 años conserva su dentadura completa, y esta cifra disminuye drásticamente al 31% entre los 35 a 44 años. Llegando a un 17.6% para las personas de edad avanzada entre 65 a 74 años. **Estas estadísticas subrayan la necesidad imperante de una mejora en los enfoques endodónticos actuales y de intervenciones odontológicas efectivas.**

Con ello, también se hace necesaria la búsqueda de una solución eficientemente a estos problemas de infecciones endodónticas, no solo para evitar la pérdida dental, sino que también para mejorar la calidad de vida de las personas, permitiéndole conservar y restaurar su funcionalidad y estética bucal. Además, se hace indispensable salvaguardar la salud

sistémica y minimizar el riesgo de bacteriemia e infecciones que podrían tener consecuencias significativas para el bienestar general de las personas.

Esta necesidad puede ser abordada mediante los campos de la nanociencia y nanotecnología con los cuales se han desarrollado sistemas altamente eficaces frente a la eliminación de la colonización bacteriana y formación de biopelículas, evitando los problemas de citotoxicidad y resistencia farmacológica con los antibióticos comúnmente utilizados en los tratamientos endodónticos actuales. En especial, mediante la aplicación de **nanopartículas metálicas (NPs)**, se aborda este desafío, combatiendo la colonización bacteriana persistente después de los tratamientos endodónticos en los conductos radiculares (Hassan & Khallaf, 2018). No obstante, se requieren estudios que evalúen su correcta efectividad desinfectante de la mano con la regeneración tisular. Es por ello que, se hace importante evaluar su impacto en la biocompatibilidad y efecto citotóxico de estos sistemas sobre comunidades celulares bacterianas ya conformadas.

CAPÍTULO 2

2. Estado de arte

2.1 Mecanismos y materiales de desinfección intraconducto

2.1.1 Procesos de desinfección basados métodos convencionales

Debido a la gran variedad de especies presentes, es difícil desinfectar los conductos de manera eficaz con un solo tipo de mecanismo. Por lo tanto, usualmente se usa una combinación de estrategias basadas en la preparación químico-mecánica del conducto usando instrumentos de preparación, medicamentos intraconducto y soluciones de irrigación. En el procedimiento de endodoncia convencional se hace esencial limpiar adecuadamente el sistema de conductos radiculares para eliminar no solo las bacterias presentes, adicionalmente se eliminan calcificaciones pulpares, restos pulpares, tejido infectado y necrótico, etc., con el fin de propiciar un ambiente aséptico y prepararlo adecuadamente para el tratamiento endodóntico. Los irrigantes más comunes son el hipoclorito de sodio (NaOCl), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), clorhexidina (CHX), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y soluciones salinas (Zafar et al., 2020). También es ampliamente utilizado el hidróxido de calcio ($Ca[OH]_2$), el cual provee alcalinidad al medio y con ello cambia las propiedades superficiales de las biopelículas. Sin embargo, la penetración de los OH^- provenientes del $Ca[OH]_2$ en los túbulos dentinarios solubiliza la matriz orgánica, alterando la proporción orgánico-inorgánica de dentina (Shetty et al., 2017a).

Cuando la terapia de desinfección con $Ca[OH]_2$ no es efectiva, y se mantienen los signos y/o síntomas de infección, el uso de antibióticos como la pasta triple antibiótica (TAP, compuesta de ciprofloxacina, metronidazol y minociclina en una proporción de 1:1:1), la pasta doble

antibiótica (DAP, compuesta de ciprofloxacina y metronidazol), amoxicilina, doxiciclina, clindamicina, tetraciclina, entre otros, constituyen una de las estrategias más potentes contra la patogenicidad bacteriana (Lee et al., 2015). Aunque su aplicación puede proveer una desinfección eficaz, aún persisten los inconvenientes relacionados con la farmaco-resistencia hacia los medicamentos utilizados, decoloración de la corona y citotoxicidad (Silva-herzog et al., 2003a).

En este punto es importante destacar que **para que el procedimiento de endodoncia tenga un buen resultado, es vital que la desinfección sea efectiva y biocompatible con las células madre mesenquimales (MSC)**. Por ello, el tratamiento más utilizado es con $\text{Ca}[\text{OH}]_2$, ya que presenta una mayor viabilidad celular en comparación con las pastas doble y triple antibióticas (Figura 1) (Althumairy et al., 2014).

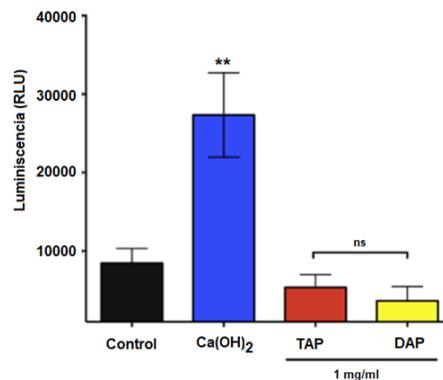


Figura 1. Irrigantes desinfectantes convencionales (**P < 0.01. n.s.), tomado de (Althumairy et al., 2014).

De igual forma, el tratamiento de endodoncia convencional contempla al $\text{Ca}[\text{OH}]_2$ para generar una barrera apical calcificada en el proceso denominado apexificación, en dientes con desarrollo radicular incompleto, y así, evitar la entrada de materiales de relleno en el diente. Aunque el $\text{Ca}[\text{OH}]_2$ tiene la ventaja de estar ampliamente disponible, la gran desventaja de su uso radica en la reducción de la resistencia de las raíces, lo que aumenta la posibilidad de fractura de la raíz. Además de los largos periodos de tratamiento que se

requieren para formar la barrera cálcica y la gran posibilidad de generar citotoxicidad para las células madre (Prasetyo et al., 2020a). Otros materiales son usados como barrera apical, como el agregado de trióxido mineral (MTA). En comparación con el Ca[OH]₂, el MTA se usa en uno o dos pasos y, por lo tanto, se necesita una menor recurrencia y reposición del material (Prasetyo et al., 2020a). Además, es biocompatible, presenta menos citotoxicidad, permite la proliferación y la unión celular (Bueno et al., 2019). Estas características mejoran el proceso de curación del tejido y previenen el debilitamiento de la estructura de la dentina causado por la administración prolongada de Ca[OH]₂. Sin embargo, la apexificación con MTA no fortalece la raíz ni induce un mayor desarrollo de esta, y como resultado, las raíces permanecen delgadas y frágiles.

Las ventajas y desventajas de estos procedimientos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Las características de tres procedimientos de tratamiento para la restauración de raíces.

Procedimiento	Ventajas	Desventajas	REF
Apexificación con Ca[OH] ₂	Facilidad de obtención Propiedades antibacterianas	Larga duración del tratamiento Constante reposición Alteración de la dentina Citotoxicidad Mayor riesgo de fractura radical	(Barquero & Rodríguez, 2005; Cardoso Pereira et al., 2017; Shetty et al., 2017b; Silva-herzog et al., 2003b)
Apexificación con MTA	Apexificación de uno o dos pasos Biocompatibilidad	No fortalece la raíz ni promueve un mayor desarrollo de la raíz Las raíces permanecen delgadas y frágiles	(Cardoso Pereira et al., 2017; Prasetyo et al., 2020b)
Revascularización	Promueve un mayor desarrollo de las raíces Refuerza las paredes dentinarias por la deposición de tejido cálcico	Exposición a la migración de patógenos	(Bose et al., 2009; Llaquet et al., 2017)

2.1.2 Procesos de desinfección basados en NPs

Los avances en el desarrollo de NPs y materiales nanoestructurados proporcionan un amplio espectro de propiedades adecuadas para garantizar un buen proceso endodóntico como: mayor resistencia a la abrasión, altas propiedades mecánicas, estética mejorada y un entorno estéril (Cantín L et al., 2010). Es así, que se ha incrementado el interés por el uso de NPs para el tratamiento de las infecciones endodónticas y tratamiento del conducto radicular. Nanopartículas de quitosano (Aksel et al., 2020a; Dasilva et al., 2013; Shrestha et al., 2014; Shrestha & Kishen, 2013), vidrio bioactivo (Mortazavi et al., 2010; Waltimo et al., 2007, 2009), Oxido de Cinc (Kishen et al., 2008; Shrestha et al., 2010), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (Pagonis et al., 2010), amonio cuaternario (Abramovitz et al., 2013), plata (AgNPs) (Espinosa-Cristóbal et al., 2013a; Hiraishi et al., 2010; Rodrigues Magalhães et al., 2012; Samiei et al., 2014a; D. Wu et al., 2014a; Zhang et al., 2013a), óxido de cobre (CuONPs) y cobre (CuNPs) (Anu et al., 2016), son ampliamente utilizadas (ver Tabla 2).

En especial, la incorporación de AgNPs y CuNPs como agentes antimicrobianos ha sido evaluada contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, avanzando en el desarrollo de nuevos materiales con actividad antimicrobiana basados en estos metales (Pannerselvam et al., 2020), con un amplio rango de aplicaciones en odontología que van desde la purificación microbiológica del agua, rellenos dentales, selladores, cementos dentales, revestimientos para prótesis dentales removibles y fijas, recubrimientos e irrigantes inhibidores de caries (Acosta-Torres et al., 2012; Hamouda, 2012).

Tabla 2. Nanopartículas comúnmente utilizadas en el tratamiento antibacteriano intraconducto.

Agente antibacteriano utilizado	Bacterias probadas	Observaciones	REF
Quitosano	<i>E. faecalis</i>	Inhibición de la formación de biopelículas dentro de la interfaz sellador-dentina.	(Dasilva et al., 2013)
Quitosano	<i>E. faecalis</i>	Efecto antibacteriano significativo.	(Shrestha & Kishen, 2013)
Quitosano	<i>E. faecalis</i>	Viabilidad reducida y la alteración de la estructura de las biopelículas.	(Shrestha et al., 2014)
Quitosano	<i>E. faecalis</i>	Mejoras en las propiedades antibacterianas en comparación con los controles utilizados.	(Aksel et al., 2020a)
Vidrio bioactivo	<i>E. faecalis</i>	Efecto del tamaño en la actividad antibacterial.	(Waltimo et al., 2009)
Vidrio bioactivo	<i>E. faecalis</i>	Eficacia antibacteriana.	(Waltimo et al., 2007)
Vidrio bioactivo	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhi</i> y <i>S. aureus</i>	La actividad antibacteriana disminuyó con la disminución del tamaño.	(Mortazavi et al., 2010)
ZnO/Quitosano	<i>E. faecalis</i>	Efecto antibacteriano elevado.	(Kishen et al., 2008)
ZnO/Quitosano	<i>E. faecalis</i>	Reducción significativa de biopelículas.	(Shrestha et al., 2010)
PLGA	<i>E. faecalis</i>	Reducción significativa de biopelícula.	(Pagonis et al., 2010)
Amonio cuaternario	<i>S. mutans</i> y <i>E. faecalis</i>	La incorporación de 2% p/p de NP aumentó significativamente la capacidad de sellado.	(Abramovitz et al., 2013)
AgNPs	<i>S. mutans</i>	Efecto antimicrobiano significativo.	(Rodrigues Magalhães et al., 2012)
Fluoruro de diamina de plata	<i>E. faecalis</i>	Eliminación de las biopelículas en la superficie de la dentina hasta 40 μ m dentro de los túbulos dentinarios.	(Hiraishi et al., 2010)
AgNPs	<i>S. mutans</i>	Aumento de las propiedades antibacterianas con la disminución del tamaño de las NPs.	(Espinosa-Cristóbal et al., 2013a)
AgNPs	<i>E. faecalis</i>	Geles antibacterianos con AgNPs resultan más eficaces que soluciones de AgNPs.	(D. Wu et al., 2014a)
AgNPs	<i>E. faecalis</i>	Disminución de las unidades formadoras de colonias en los conductos por debajo de 10 CFU.	(Samiei et al., 2014a)
AgNPs	-	Efecto antibacteriano y nula citotoxicidad.	(Zhang et al., 2013a)
CuONPs	<i>S.aureus</i> y <i>E. coli</i>	Zonas de inhibición significativas de 31.6 a 38.6 mm.	(Anu et al., 2016)

Además, se ha estudiado la inmovilización de las NPs en superficies de implantes, lo que permite una liberación controlada y un efecto antibacteriano a largo plazo de alrededor de 4 meses (Yin et al., 2020). Por lo tanto, la propiedad antibacteriana a largo plazo otorgada por las NPs en los conductos radiculares es muy ventajosa para mejorar el grado de desinfección del conducto (Bapat et al., 2019a). Rodrigues et al. incorporaron AgNPs en cementos endodónticos y los evaluaron frente a especies de *Streptococcus mutans*, principales responsables de la caries. Sus resultados arrojaron mejoras significativas en el efecto antimicrobiano (Rodrigues Magalhães et al., 2012). Además, materiales como la gutapercha recubierta con AgNPs se han desarrollado como obturador antimicrobiano y no citotóxico para el tratamiento del conducto radicular (Mishra & Tyagi, 2018; Mozayeni et al., 2017). Asimismo, son incorporadas al MTA para mejorar el éxito del recubrimiento pulpar, apexificación y sellado de perforaciones en los dientes (Vazquez-Garcia et al., 2016).

En este contexto, también existen limitaciones en las estrategias de desinfección en tratamientos endodónticos que no solo se deben al crecimiento de la biopelícula bacteriana dentro de la cavidad oral, sino también a las complejidades anatómicas que presentan los sistemas de conductos radiculares, la estructura de la dentina y la dificultad de los instrumentos mecánicos para llegar a dichos espacios, donde en algunos sitios, su diámetro no sobrepasa los 5 μm (Kishen, 2012). Por ello, soluciones de iones plata y AgNPs se han utilizado como alternativas viables capaces de llegar a dichos espacios confinados y erradicar las colonias bacterianas presentes en ellos. Hiraishi et al., utilizaron fluoruro de diamina de plata contra biopelículas de *Enterococcus faecalis* en estudios *in vitro*. Sus resultados arrojaron que las biopelículas que se encontraban en la superficie de la dentina y hasta 40 μm en los túbulos dentinarios, se eliminaron completamente después de 60 min de interacción con el compuesto (Hiraishi et al., 2010). Por otro lado, debido a un alto valor comercial de

los metales como oro y plata, se ha centrado considerablemente el interés en las CuNPs y CuONPs como potenciales agentes antimicrobianos (Febré et al., 2016; Román et al., 2017), las cuales bajo condiciones específicas pueden eliminar los microorganismos o evitar su crecimiento (efecto bacteriostático) (Galleguillos Morales, 2016a). Su eficacia y tasa de inactivación microbiana dependen de la temperatura del medio, humedad, concentración de NPs, así como el tamaño de las NPs y el tipo de microorganismo con el cual estén en contacto (Duran, 2015a). Anu et al., estudiaron implantes dentales de titanio recubiertos con CuONPs. Los resultados mostraron que la superficie del implante con las NPs presentó zonas de inhibición significativas de 31.6 a 38.6 mm en comparación con los no recubiertos (Anu et al., 2016).

2.1.3 Métodos de obtención de NPs

Existen diversos métodos químicos y físicos para la obtención de NPs. Los más utilizados se dividen en dos categorías: i) bottom-up (de abajo hacia arriba) y ii) top-down (de arriba hacia abajo) dependiendo del estado físico del material de partida. Ambas metodologías han sido ampliamente estudiadas y con ellas es posible obtener NPs estables y con excelentes propiedades. Sin embargo, estos últimos tienen algunas desventajas, como el alto consumo de energía, equipos engorrosos y especializados (Islam et al., 2022), lo que encarece enormemente estos mecanismos. Por su parte con los métodos bottom-up se construyen estructuras desde precursores que pueden ser iones metálicos, moléculas, átomos, entre otros, y ofrecen ventajas como un adecuado control del tamaño y forma de las NPs. Dentro de los más comunes están; i) Síntesis química con el uso de agentes reductores, ii) Síntesis asistida por ultrasonido, iii) Síntesis por calentamiento asistido con microondas, entre otras.

En esta investigación se centrará la atención en el uso de métodos electroquímicos y métodos con aplicación de microondas para la síntesis de NPs.

Métodos electroquímicos: Los métodos electroquímicos son muy atractivos debido a su facilidad de operación, cinética de obtención y pequeños rangos de distribución de tamaño de las NPs. Estos métodos se basan en seis pasos principales: 1. Disolución del ánodo, 2. Migración de iones al cátodo, 3. Reducción a valencia cero, 4. Formación, 5. Crecimiento de las partículas, y 6. Precipitación. En el caso de la formación de sistemas coloidales o también conocidos como soles, no se presenta el último paso.

Diversos autores han llevado a cabo métodos electroquímicos con diferentes electrodos, agentes estabilizantes y variables de síntesis para la obtención de NPs: Durán et al., mostraron un método de síntesis combinado, en el cual desarrollaron AgNPs y CuNPs mediante ruta electroquímica con reducción química utilizando ácido gálico y borohidruro de sodio respectivamente. El cátodo consistió en una barra de grafito, utilizando como medio electrolítico ácido sulfúrico y un potencial eléctrico de 30 voltios durante tres minutos. Los resultados evidenciaron una excelente sinergia entre ambos métodos, obteniendo AgNPs con tamaños inferiores a 15 nm y CuNPs alrededor de 25 nm, con una disminución significativa en los tiempos de reacción (Duran, 2015b).

No obstante, el uso de un adecuado electrolito toma importancia en la utilización de este método. Por lo general, se usan sales metálicas para favorecer el transporte y conducción de electrones en el proceso de reducción de los iones en el medio (Theivasanthi & Alagar, 2011). Algunos autores también han reportado el uso de PVA y Polivinil pirrolidona (PVP) como agentes capping en la síntesis de AgNPs a partir de sales de plata como AgNO_3 y electrodos de plata mediante este método (Anggraeni & Kurniawan, 2020; Nasretdinova et al., 2015; Sumit Sharma et al., 2014).

El tamaño de las NPs también depende de la densidad de corriente, la separación entre electrodos, el tiempo de reacción, la temperatura y la polaridad del disolvente.

Métodos por microondas: Las estrategias de reducción de metales a alta temperatura utilizando ondas de microondas como herramienta de calentamiento rápido en la síntesis de NPs como Au, Ag, Pt, Pd, Ru, Ir, Rh, Fe, Co, Ni, Cu, compuestos bimetálicos como FePt, FePd y nanopartículas núcleo-cubierta (Tsuji, 2017). Además, el uso de las ondas microondas también tiene una amplia aplicación en síntesis de nanopartículas, polimerización asistida, obtención de compuestos poliméricos (Shinnosuke et al., 2013), nanopartículas poliméricas (Ow et al., 2020), entre otras. Una gran ventaja del uso de microondas en la síntesis de estos sistemas frente a los métodos de calentamiento tradicionales (como baños de aceite y placas calientes) es que se requiere menos energía para conseguir sitios de nucleación de forma rápida y homogénea con un aumento uniforme de temperatura en todo el volumen de reacción, produciendo nanopartículas monodispersas y de tamaños menores. Además, las fuentes de calor tradicionales no transfieren energía de manera eficiente a través de la solución de reacción, generando un gradiente de temperatura (Gallo-Cordova et al., 2020; Horikoshi & Serpone, 2017; Ma, Pang, et al., 2016). Diversos investigadores han desarrollado sistemas de aplicación de microondas para la síntesis de nanopartículas metálicas sintetizadas en varios pasos y utilizando catalizadores de reacción como agentes externos y estabilizadores, cuyas propiedades físicas y químicas presentan excelentes rendimientos (Ma, Pang, et al., 2016), pero no se ha evaluado su efectividad en procesos biológicos y el uso de agentes químicos tóxicos aún no se ha resuelto.

La elección de un método adecuado para la síntesis de NPs toma vital importancia, ya que se ha demostrado que el efecto antibacteriano se incrementa considerablemente a medida que se disminuye el tamaño de las nanoestructuras (Sayed et al., 2022). Espinosa-Cristóbal et al. investigaron la capacidad de inhibición de las AgNPs hacia *S. mutans* en la superficie del esmalte dental, que comúnmente se ve afectada por caries. Los autores reevaluaron tres

tamaños diferentes de NPs (9.3, 21.3 y 98.0 nm), encontrando que las AgNPs de menor tamaño mostraron propiedades antimicrobianas significativamente mejoradas debido al aumento de la relación superficie-volumen (Espinosa-Cristóbal et al., 2013b). Bajo este contexto, cabe destacar que la disminución del tamaño de las NPs está relacionada con la disminución de la tensión superficial del medio, lo cual se puede generar mediante el uso de surfactantes. Estas moléculas, además de disminuir la tensión superficial, tienen también la propiedad de estabilizar las nanopartículas obtenidas. De esta manera, Blandón et al. aplicando una diferencia de potencial alterna de 20 V entre dos alambres de plata, obtuvieron AgNPs con tamaños alrededor de 50 nm. Sin embargo, con la estabilización de las NPs utilizando un agente surfactante (Pluronic F68) lograron tener diámetros menores de alrededor de 16 nm, con una mejor estabilidad y mejor polidispersión (Blandón et al., 2015). De igual manera, Yuan et al. utilizaron la adición de un tensoactivo (dodecil sulfato de sodio) para lograr eficientemente el control de la síntesis y del tamaño de las NPs (Yuan et al., 2011). Otro tipo de agente surfactante y estabilizador es el polivinil alcohol (PVA), el cual se ha usado ampliamente para la estabilización de NPs (Cardoso, 2016).

2.1.4 Métodos de obtención de sistemas poliméricos nanoestructurados

Es posible conformar sistemas nanoestructurados aplicados en áreas de biomédica, odontológica y farmacéutica, a partir del uso de polímeros con grupos funcionales polimerizables, con los cuales se generan geles por entrecruzamiento químico o entrelazamiento físico, conformando una configuración tridimensional en la cual es posible incorporar agentes antibacterianos, fármacos y moléculas en su interior. Un excelente candidato para estos sistemas es el PVA, ya que este polímero además de ofrecer una gran capacidad como agente estabilizador de NPs, forma geles biodegradables, biocompatibles, con buenas propiedades mecánicas, estables durante largos períodos de tiempo en diferentes

condiciones de temperatura y pH. Además, es un polímero hidrofílico, con grupos hidroxilo fácilmente polimerizables, no tóxico y soluble en agua. Carhuapoma et al., fabricaron hidrogeles de PVA entrelazados físicamente con quitosano utilizando radiación gamma (Carhuapoma-Bernabé & Contreras, 2005). Asimismo, Echeverry et al., desarrollaron hidrogeles de PVA usando diferentes ciclos de congelamiento/descongelamiento, denominados también criogeles (Echeverri et al., 2009). Por su parte, Rodríguez et al., sintetizaron hidrogeles nanoestructurados, a partir de la esterificación entre los grupos hidroxilo del PVA y los grupos carboxilo del ácido maleico en medio ácido. Su estrategia consistió en sumergir el gel producido en una solución de AgNO_3 (50 mM) durante un tiempo de 18 h y llevar a cabo una reducción química *in situ* de los iones plata dentro del gel, utilizando NaBH_4 como agente reductor. Como resultado, estos sistemas poliméricos nanoestructurados mostraron actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus*, confirmando la acción antimicrobiana de las AgNPs encapsuladas en los geles (Rodríguez et al., 2019). Adicionalmente, algunos autores han desarrollado hidrogeles de PVA copolimerizados con ácido maleico insensibles a cambios de pH (Soto & Oliva, 2012) y ácido poli(acrilico) (PAA) en el proceso de congelación/descongelación para la formación de hidrogeles para sistemas de administración de fármacos específicos y especializados (Sohail et al., 2014). Aunque los geles por entrecruzamiento químico son ampliamente estudiados, los geles por enlazamiento físico ofrecen grandes ventajas ya que, al no tener una unión covalente, su estructura polimérica puede ser fácilmente disuelta y promover una liberación más rápida y controlada de fármacos o en su defecto de NPs.

Este punto es importante, debido a que la dosificación de NPs en la cavidad oral es una gran alternativa de desinfección prolongada. Además, el uso de una correcta matriz polimérica biocompatible mejora su capacidad para estimular la proliferación y mineralización de las

células madre de la pulpa dental. Aksel et al., utilizaron hidrogeles de quitosano cargados con TAP contra *E. faecalis*. Sus resultados evidenciaron que el hidrogel cargado con el fármaco presentó mejores propiedades antibacterianas en comparación con los controles utilizados. Además, mantuvo la viabilidad celular y actividad de mineralización (Aksel et al., 2020b). En el caso particular de la desinfección del conducto radicular, se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que geles antibacterianos son más eficaces que soluciones de AgNPs frente a la interrupción de la integridad estructural de biopelículas bacterianas de *E. faecalis* (D. Wu et al., 2014b). Samiei et al., sintetizaron hidrogeles reticulados mediante copolimerización vía radicales libres de Poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido metacrilico-vinipirrolidona). Posteriormente obtuvieron AgNPs mediante síntesis química *in situ* en las redes del copolímero. Los autores evaluaron el efecto antibacteriano del hidrogel nanoestructurado a una concentración de 30 ppm en conductos radiculares infectados con *E. faecalis* en comparación con hipoclorito de sodio al 2.5% y gluconato de clorhexidina al 2.0%. Según sus resultados, se obtuvo una disminución de las unidades formadoras de colonias en los conductos por debajo de 10 CFU (Samiei et al., 2014b). Bruniera et al., evaluaron tres hidrogeles nanoestructurados con AgNPs a base de hidroxietilcelulosa, carbómero y polietilenglicol para tratamiento intraconducto. De acuerdo con sus resultados, los sistemas nanoestructurados mostraron actividad antibacteriana contra todas las especies probadas (Bruniera et al., 2014).

La adición de NPs a matrices poliméricas también han demostrado propiedades biocompatibles y sin efectos citotóxicos o mutagénicos significativos. Zhang et al., estudió la biocompatibilidad de la incorporación de AgNPs en un adhesivo como material de restauración oral en fibroblastos gingivales humanos. El material no indujo ninguna citotoxicidad y mejoró el efecto antibacteriano (Zhang et al., 2013b). Así, las NPs pueden

utilizarse clínicamente como agentes antimicrobianos en odontología sin ser perjudiciales para los pacientes (Bapat et al., 2019b).

Por todo lo anterior, mediante esta investigación se pretende sintetizar geles por entrelazamiento físico con polímeros biocompatibles que estabilizan a su vez nanopartículas metálicas, aplicados como potenciales agentes desinfectantes y promotores del fortalecimiento de la raíz en tratamientos de endodoncia.

2.2 Hipótesis y Objetivos

2.2.1 Hipótesis

- El desarrollo de soles de cobre y plata mediante síntesis asistida por microondas e hidrosoles de cobre y plata mediante síntesis electroquímica, estabilizados con PVA y PVP como sistemas polimerizables, permitirá obtener geles nanoestructurados.
- La aplicación de geles nanoestructurados a partir de soles metálicos de cobre y plata como protocolo alternativo de desinfección en el tratamiento intraradicular en procedimientos de endodoncia, presentará un efecto antibacteriano y biocompatible, disminuyendo el riesgo de infecciones endodónticas postratamiento y restaurando los tejidos orales del hospedero.

2.2.2 Objetivos

2.2.2.1 Objetivo General

Desarrollar y caracterizar geles nanoestructurados a partir de sistemas coloidales de cobre y plata, biocompatibles y con efecto antibacteriano, aplicados como protocolo de desinfección alternativo en procedimientos de endodoncia regenerativa sobre modelos preclínicos *in vitro-ex vivo*.

2.2.2.2 Objetivos específicos

- i. Obtener y caracterizar sistemas coloidales metálicos de cobre y plata mediante síntesis electroquímica y síntesis asistida por microondas utilizando polímeros funcionales como agentes estabilizadores
- ii. Desarrollar y caracterizar geles poliméricos a partir de los coloides metálicos estabilizados con PVA y PVP mediante entrelazamiento físico.
- iii. Determinar los efectos antibacterianos y citotóxicos de los soles y geles nanoestructurados de cobre y plata mediante ensayos *in vitro-ex vivo*.

CAPÍTULO 3

3. Metodología

La metodología de investigación consistió en la obtención, caracterización y estabilización de hidrosoles y coloides (también denominados soles metálicos) de plata y cobre, con el objetivo de formar geles nanoestructurados aplicados a la evaluación antibacteriana y citotóxica sobre dentina radicular contaminada en modelos preclínicos *in vitro-ex vivo*.

3.1 Obtención de hidrosoles y soles metálicos de plata y cobre

Se obtuvieron soles de plata y cobre en medio acuoso a partir de síntesis electroquímica siguiendo una modificación del modelo propuesto por Khaydarov et al., (Khaydarov et al., 2009) (denominados Ag/Hidrosol y Cu/Hidrosol) y soles de plata y cobre mediante calentamiento asistido por microondas siguiendo la metodología de Zhu et al., (Zhu et al., 2004) (denominados, Ag/sol y Cu/sol respectivamente). Los correspondientes montajes experimentales se muestran en la Figura 2.

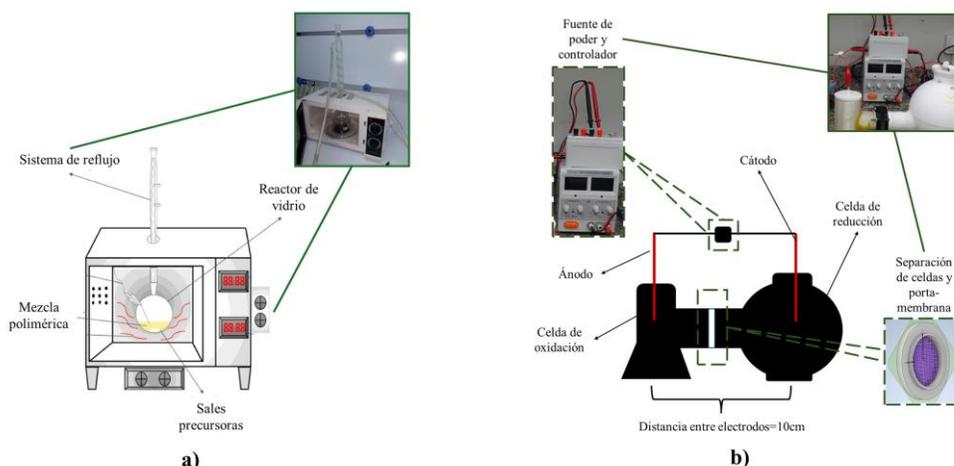


Figura 2. a) Sistema de calentamiento asistido por microondas para la reducción de sales metálicas. b) Sistema de síntesis electroquímica asistida por gradiente de concentración.

3.1.1 Obtención de hidrosoles de plata y cobre mediante síntesis electroquímica asistida por un gradiente de concentración

Para la obtención de Ag/Hidrosol y Cu/Hidrosol, se diseñó un sistema de electrólisis que constó de dos celdas electroquímicas conectadas por una membrana permeable a iones para producir un gradiente de concentración entre las celdas. Cada una de las piezas se imprimió en una impresora 3D Ender 3 V2 utilizando PVA como matriz polimérica. La celda electroquímica de oxidación consistió en un contenedor rectangular el cual se conectó a la celda electroquímica de reducción mediante un soporte movable en el cual se depositó la membrana permeable a iones (Ver Figura 2.a). La síntesis electroquímica se realizó utilizando una fuente de alimentación BK-305d con una diferencia de potencial constante en corriente directa de 20V entre dos electrodos de plata (para Ag/Hidrosol) y cobre (para Cu/Hidrosol) respectivamente, de 85x20x4 mm. Los electrodos se lavaron con agua desionizada con vibración ultrasónica durante 30 minutos para eliminar residuos ásperos y de suciedad. Posteriormente se sumergieron verticalmente en 500 mL del electrolito a 10 cm de distancia. Inicialmente se evaluó el sistema conectando los electrodos en la celda sin membrana entre 5, 10, 15, 30 y 60 min utilizando soluciones de PVA, (0.01 mM, Sigma Aldrich, USA), Polivinil pirrolidona (PVP 0.1mM, Sigma Aldrich, USA), Poliácido acrílico (PAA, 0.1mM, Sigma Aldrich, USA), y Citrato de sodio (CT, 0.1%, Sigma Aldrich, USA). Se analizaron dos tipos de membranas semipermeables a iones realizando la electrólisis durante 1 y 8 h; 1. Membrana de una composición de Agar/Agarosa y carbón activo en diferentes proporciones (1:0; 1:1; 1:2 y 2:1) y 2. Membrana comercial de celulosa para diálisis con peso molecular de corte (MWCO) de 14KDa (Sigma Aldrich, USA).

Una vez establecido el medio efectivo para la obtención de los hidrosoles, se realizó la reducción electroquímica bajo el gradiente de concentración utilizando soluciones de PVA a

0.01, 0.05 y 0.1mM como agente estabilizante y con recirculación de la suspensión coloidal hacia un reservorio de 500 mL durante 17 h. Los hidrosoles se guardaron en frascos ámbar para su posterior caracterización.

3.1.2 Obtención de soles de plata y cobre mediante calentamiento asistido por microondas

La síntesis asistida por microondas se llevó a cabo utilizando un horno microondas casero modificado con desprendimiento superior conectado a un sistema de refrigeración (Figura 2.b). Los soles se prepararon usando soluciones de AgNO_3 (0.01, 0.05 y 0.10 mM) y CuSO_4 (0.01, 0.05 y 0.10 mM) en polietilenglicol (PEG) como agente reductor y polivinilpirrolidona (PVP) como agente estabilizante, respectivamente. La mezcla se agitó lentamente durante 30 min y se sometió a calentamiento por microondas durante 5, 10, 15 y 20 min a máxima potencia (800 W) conectado a un sistema de reflujo. Posteriormente, los Ag/sol y Cu/sol obtenidos se enfriaron a temperatura ambiente y se almacenaron en recipientes de color ámbar para su posterior caracterización. Finalmente, después de 24 h, los coloides se mezclaron con soluciones equimolares de PVA en agua (relación molar 1:1 PVP:PVA).

3.1.3 Caracterización de los soles de plata y cobre

3.1.3.1 Caracterización fisicoquímica

La formación y estabilidad de las nanopartículas formadas se analizó mediante espectroscopia ultravioleta en el rango visible UV-vis entre 700-300 nm. Además, la morfología de las nanopartículas se analizó mediante microscopia electrónica de transmisión TEM utilizando un microscopio JEM1200E JEOL, Tokio, Japón a un voltaje de aceleración de 200 kV. Se preparó una muestra colocando una gota de los soles e hidrosoles en etanol sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono de malla 200. Las propiedades reológicas de los soles se evaluaron utilizando un reómetro híbrido Discovery (TA Instruments, DE, EE.

UU.) con una geometría de placa paralela (8 mm) equipado con un sistema Peltier para control de temperatura. Se realizó un barrido de deformación (tiempo de inmersión 60.0 s, 1.0 Hz, deformación 0.01-500.0%).

3.1.1.2 Evaluación Biológica

La concentración mínima inhibidora (CMI) y la concentración mínima bactericida (CBM) de los Ag/sol y Cu/sol obtenidos se determinaron mediante el método de microdilución en caldo utilizando una serie de diluciones de cada dispersión de nanopartículas que oscilaron entre 10.787 y 0.005 $\mu\text{g/L}$.

3.2 Desarrollo de geles poliméricos a partir de los soles metálicos estabilizados con PVA y PVP

Los geles nanoestructurados se desarrollaron siguiendo dos estrategias: 1. Mediante síntesis directa asistida por microondas generando entrelazamiento en un solo paso con PVP (denominados Ag/1P-gel y Cu/1P-gel). y 2. Mediante síntesis asistida por microondas generando entrelazamiento en dos pasos con PVP a partir de los Ag/sol y Cu/sol obtenidos en 3.1.2 (denominados Ag/2P-gel y Cu/2P-gel). Para cada método se prepararon los correspondientes blancos, utilizando la misma formulación sin el uso de sales metálicas. Se denominaron Blanco/1P-gel y Blanco/2P-gel.

3.2.1 Síntesis de los geles nanoestructurados mediante entrelazamiento en un solo paso con PVP

Los Ag/1P-gel y Cu/1P-gel se desarrollaron utilizando soluciones de AgNO_3 y CuSO_4 como precursores metálicos en PEG, mezclando diferentes relaciones molares de PVP:PVA; 1.0:0.3 (0.3-Ag/1P-gel), 1.0:0.5 (0.5-Ag/1P-gel) y 1.0:1.0 (1.0-Ag/1P-gel) para los geles de plata y 1.0:0.3 (0.3-Cu/1P-gel), 1.0:0.5 (0.5-Cu/1P-gel) y 1.0:1.0 (1.0-Cu/1P-gel) para los geles de cobre respectivamente. Inicialmente se disolvió la correspondiente sal metálica en

PEG para obtener soluciones a 1.0 mM. Posteriormente, se adicionó PVP y PVA y se agitó lentamente durante 4 h mediante un agitador magnético manteniendo un calentamiento a 60 °C hasta la disolución completa de los polímeros. Finalmente, la mezcla se sometió a calentamiento asistido por microondas durante 20 min a máxima potencia (800 W) utilizando un microondas casero adaptado con un sistema de recirculación de agua (Figura 2.b). Los geles se vertieron en un molde y se gelificaron a temperatura ambiente. Para su caracterización, los Ag/1P-gel y Cu/1P-gel se congelaron a -70 °C durante 24 h y luego se liofilizaron durante 24 h.

3.2.2 Síntesis de los geles nanoestructurados mediante entrelazamiento en dos pasos con PVP

En la síntesis de dos pasos, los soles previamente obtenidos en 3.1.2. se utilizaron como material nanoestructurado de partida para formar los geles, mediante mezclas con soluciones de PVA en agua utilizando una relación PVP:PVA de 1.0:0.5 con ambos precursores metálicos plata (0.5-Ag/2P-gel) y cobre (0.5-Cu/2P-gel) respectivamente. Las mezclas se calentaron nuevamente en el microondas durante 20 min. Finalmente, todos los geles se congelaron a -70 °C durante 24 h y luego se liofilizaron durante 24 h.

3.2.3 Caracterización de los geles obtenidos

3.2.3.1 Caracterización fisicoquímica

La morfología y tamaño de las NPs dentro de los geles se analizó mediante microscopia electrónica de transmisión, TEM utilizando en un microscopio JEM1200E (JEOL, Tokio, Japón) a un voltaje de aceleración de 200 kV. Para ello los geles fueron disueltos y depositados sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono de malla 200.

Por otro lado, los geles nanoestructurados se analizaron mediante el método de la bolsa de té (T-bag por su nombre en inglés) en agua desionizada a pH neutro, 37 °C y diferentes intervalos de tiempo entre 0 y 96 h para determinar su capacidad de disolución [17].

Al igual que el análisis de los soles, las propiedades reológicas se analizaron utilizando un reómetro híbrido Discovery, TA Instruments, con una geometría de placa paralela (8 mm) equipado con un sistema Peltier para control de temperatura. El estudio de la morfología y rugosidad de la superficie de los geles liofilizados se realizó mediante microscopía electrónica de barrido SEM/EDS utilizando un JEOL JSM 6010 PLUS/LA, Tokio, Japón con un aumento de 5000x operando en el modo de imágenes de electrones secundarios y de alto vacío a un voltaje de aceleración de 5-20 kV y mediante microscopía de fuerza atómica AFM, utilizando un AFM-AIST-NT Smart SPM-1000, CA, USA con puntas de AIB (Aluminio backside) con una frecuencia de 160 kHz para semicontacto a temperatura ambiente, con una resolución de imagen de $25.0 \times 25.0 \mu\text{m}$, $15.0 \times 15.0 \mu\text{m}$ y $3.0 \times 3.0 \mu\text{m}$ y con una velocidad de escaneo entre 0.1-1.0 Hz. Las imágenes obtenidas se procesaron utilizando el software Gwyddion 2.45 con una resolución de 500 x 500 píxeles mediante la técnica de análisis de grano y Mark by Watershed. Adicionalmente, se determinó el diámetro promedio de los agregados, a partir de imágenes de fase duplicadas desde la misma ubicación de las imágenes AFM.

Además, los geles se analizaron mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, FTIR-ATR, utilizando un espectrómetro IR SPECTRUM TWO acoplado a ATR y análisis Raman utilizando un microscopio confocal de alta resolución LabRamHR Evolution Horiba Jobin Yvon con una fuente de excitación de línea láser Edge de 633 nm a una potencia de 13.3 mW para confirmar los grupos funcionales de los polímeros que conforman los geles.

3.2.3.2 Evaluación Biológica

La evaluación biológica de los geles abarcó el estudio de efectos antibacterianos y citotóxicos *in vitro*

3.2.3.2.1 Estudio antibacteriano *in vitro*: La concentración final de las nanopartículas dentro de los geles nanoestructurados en uno y dos pasos se basó en la MIC y MBC de los Ag/sol y Cu/sol como referencia. Con ello, se evaluó la actividad antibacteriana de los geles de forma cualitativa y cuantitativa mediante el método de difusión en agar en placas de agar Muller Hilton (MHA) y mediante cinética de crecimiento según el protocolo de Jaramillo et al., (Jaramillo et al., 2019). Todos los experimentos y controles se realizaron por triplicado. Para comparar las actividades antibacterianas de los diferentes nanomateriales, se realizó una prueba ANOVA multifactorial ($p < 0.05$) seguida de las pruebas de comparación múltiple de Tukey.

Se utilizó una cepa clínica de *E. faecalis* UDEC 6.1 aislada de una infección endodóntica persistente obtenida mediante muestreo endodóntico con previa autorización del paciente siguiendo el protocolo aprobado por el Comité de Ética Científica C.I.Y.B. N° 15/04 y la cual fue identificada mediante secuenciación de ADNr 16S. Las cepas se cultivaron en caldo tripticasa de soja (TSA) (Oxoid, Reino Unido) y se incubaron en condiciones aeróbicas durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, se seleccionó una colonia aislada y se incubó en un medio de infusión cerebro-corazón (BHI) (Oxoid, Reino Unido), a 37 °C durante 24 h. Después de eso, la turbidez del inóculo se ajustó con medio BHI a 0.5 McFarland usando un turbidímetro Oxoid (Fisher Scientific Company, Canadá). Finalmente, el inóculo con aproximadamente 1×10^8 UFC/mL se diluyó a 1:10 para obtener una concentración final de inóculo de 10^7 UFC/mL, como concentración bacteriana de partida.

Para la prueba de difusión en agar en placas de MHA, se inocularon con los inóculos de *E. faecalis* ya preparados, luego se colocaron en la superficie los geles nanoestructurados junto

con los blancos respectivos con 5 mm de diámetro. Finalmente, las placas se incubaron a 37°C durante 24 h para observar las zonas de inhibición de las muestras de geles. Por otro lado, el método de la cinética de crecimiento consistió en pruebas cuantitativas en una placa de 96 pocillos en los cuales se depositaron cada uno de los geles por triplicado. En este caso se utilizaron 20 µL de cada gel en contacto directo con 10 µL de la dilución bacteriana de partida y se incubaron a 37 °C durante 60 y 120 min. Para el recuento de UFC, se diluyó en serie 4 veces con agua esterilizada y seguido a ello se depositaron 20 µL en placas de agar estériles y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Luego se contaron las colonias visualmente con un contador de colonias.

3.2.3.2.2 Estudio antibacteriano *ex vivo*: Se evaluó la viabilidad de las células conformadas en un modelo de biopelícula bacteriana multiespecie madura de 21 días en contacto con los geles de mejor rendimiento antibacteriano según los análisis cuantitativos, durante 1 h, 24 h y 168 h. Se tomaron como controles soluciones de NaOCl al 5% durante 1 h y Ca(OH)₂ (UltraCal ® XS) durante 168 h. Las biopelículas se lavaron con PBS, se tiñeron con el kit LIVE/DEAD BacLight y se analizaron utilizando SP8 LIGHTNING (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Alemania). La capacidad antibacteriana se evaluó mediante el volumen de biomasa total, viable y no viable, indicando el porcentaje de células muertas. El análisis estadístico empleó ANOVA con el método de Tukey ($p < 0.05$) utilizando el software GraphPad Prism 6.0.

3.2.3.2.3 Estudio de citotoxicidad *in vitro*: Se obtuvieron células del ligamento periodontal humano (HPDL) a partir de tejido gingival sano asociado a un tercer molar no erupcionado de 3 donantes diferentes entre 18 y 25 años de edad con indicación de exodoncia previo a consentimiento informado (CEC-SSC: 20-10-55), en el servicio de urgencia de Facultad de Odontología de la Universidad de Concepción. Las células sembraron por duplicado en

placas de 100 mm, para establecer el cultivo en medio esencial mínimo (MEM, HyClone) suplementado con suero bovino fetal al 5% (HyClone), GlutaMax. (Gibco, Life Technologies), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Life Technologies) y 0.25 µg/mL de anfotericina B (Gibco, Life Technologies) y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ en una incubadora con control de humedad durante 30 días. El medio de cultivo se cambió cada 3 días y el sobrenadante se sembró en placas de 100 mm para establecer el cultivo. La confluencia celular y/o la posible contaminación se controlaron cada 2-3 días bajo el microscopio óptico antes de los experimentos. Para los experimentos de proliferación y muerte celular, 3 días antes del experimento, se sembraron células con no más de 5 pases en placas de 96 pocillos con 3.000 células por pocillo. La proliferación, la viabilidad y la morfología celular se cuantificaron por triplicado utilizando microscopía de células vivas en tiempo real con el sistema de análisis de células vivas IncuCyte®S3 (Essen BioScience, Alemania) con un objetivo de 10x. La muerte celular se cuantificó utilizando la sonda impermeable para células vivas Sytox Green (30 nM, Molecular Probes), que tiñe los núcleos de las células muertas. Los datos se registraron cada 3 h una vez que se inició el cultivo hasta el día 3 y se analizaron con el software de análisis célula por célula IncuCyte® (Essen BioScience, Alemania). Se utilizó la prueba de análisis de varianza con comparaciones múltiples (método de Tukey) ($p < 0.05$). Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Inc., InStat®, CA, EE. UU.).

CAPÍTULO 4

4. Resultados

El éxito de la formación de los Ag/Hidrosol, Cu/Hidrosol, Ag/sol y Cu/sol se verificó mediante inspección visual inicial checando el cambio de color de las soluciones de partida desde incoloras a suspensiones de color amarillo intenso y marrón oscuro, respectivamente. También se presentó cambio de color en todos los geles desarrollados. En el caso de los controles realizados sin la presencia de las nanopartículas no se presentó cambio en la coloración, por lo tanto, se obtuvieron geles de color blanco.

4.1 Obtención de hidrosoles de plata y cobre mediante síntesis electroquímica

4.1.1 Hidrosoles de plata y cobre (Ag/Hidrosol y Cu/Hidrosol)

Se utilizó espectroscopia UV-vis inicialmente para monitorear la formación de las nanopartículas de plata manteniendo la electrólisis durante diferentes periodos de tiempo ya que la plata en escala nanométrica muestra una fuerte absorción en el espectro UV-vis, así que la radiación en este rango del espectro genera una oscilación colectiva de los electrones conductores conocida como resonancia de plasmón superficial (SPR), y depende en gran medida del tamaño y la forma de las nanopartículas (Liaqat et al., 2022). En la Figura 3 y Figura 4. se muestran los espectros de absorción Uv-vis de los Ag/Hidrosol en PVA, PVP, PAA y CT obtenidos inicialmente en la celda de concentración variable sin el uso de membrana durante 5 min, 10 min, 15 min, 30 min y 60 min evaluados el primer día y cuatro días después de la síntesis, respectivamente. Se observó un leve cambio de color solo en las dispersiones en PVA tras 15 min de electrólisis, lo que sugirió la formación de NPs.

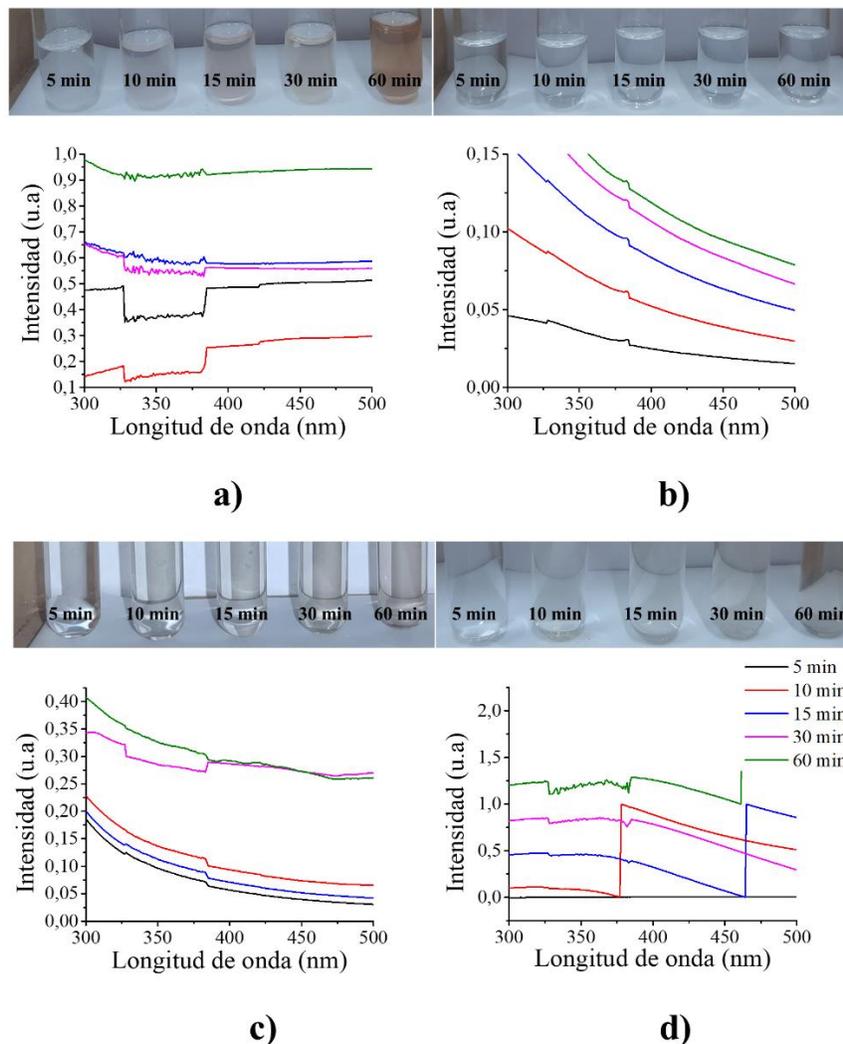


Figura 3. Espectro de absorción Uv-vis de los Ag/hidrosol en a) PVA, b) PVP, c) PAA y d) CT obtenidos mediante síntesis electroquímica en celda de concentración variable sin membrana evaluados a 5 min, 10 min, 15 min, 30 min y 60 min.

Sin embargo, los espectros Uv-vis no mostraron ninguna señal característica SPR. Esto no quiere decir que no se hayan formado nanopartículas metálicas, este fenómeno se presentó debido a que su señal SPR también está directamente relacionada con la concentración de las partículas en el medio (Liaqat et al., 2022; Proposito et al., 2020; Rudra, 2013; Zein et al., 2022). Por lo tanto, este hecho no compromete la capacidad reductora de estos polímeros, solo indica que la reducción de iones plata utilizando el método poliol con los medios

poliméricos utilizados en este estudio y a temperatura ambiente conlleva largos periodos de tiempo. Esto se corroboró con los espectros evaluados cuatro días después ya que, en ellos se evidenciaron señales SPR alrededor de 431 nm para PVA, PVP y CT como medio electrolítico. Algunos autores como Longenberger et al., requirieron hasta 28 días para obtener AgNPs en una solución acuosa de PEG a temperatura ambiente (Longenberger & Mills, 1995). Los largos tiempos de síntesis de nanopartículas utilizando este método electroquímico compromete grandemente las posibilidades de escalamiento del método desarrollado, sin embargo, ofrece una estabilidad en el tiempo significativa (sin precipitación) y gran pureza de los coloides obtenidos (sin productos residuales en suspensión). Así, se evidenció que entre mayor el tiempo de síntesis electroquímica y estabilización a temperatura ambiente, la concentración de los hidrosoles fue mayor, mostrando señal SPR (Figura 4).

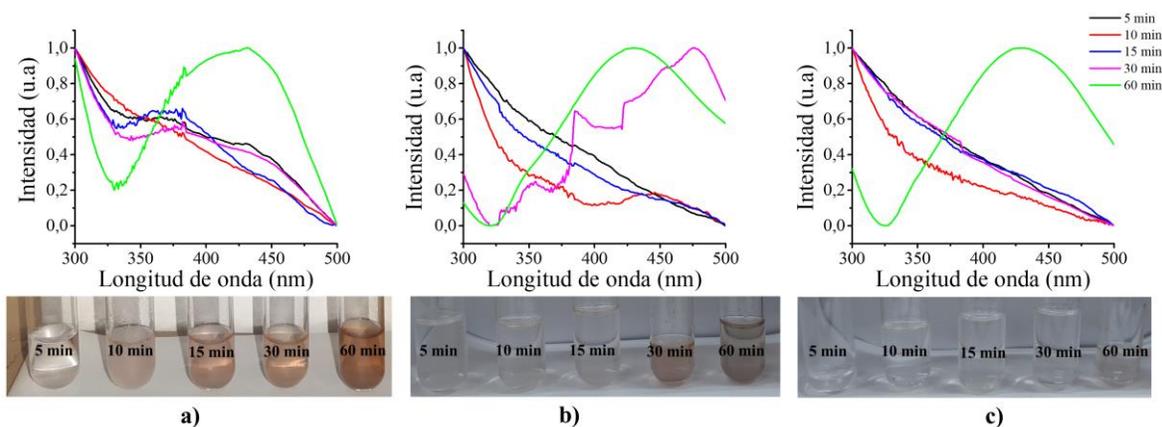


Figura 4. Espectro de absorción Uv-vis de los Ag/hidrosoles 4 días después de la síntesis en PVA a) 0.10 mM, b) 0.05 mM y c) 0.01 mM obtenidos mediante síntesis electroquímica en celda de concentración variable sin membrana evaluados a 5 min, 10 min, 15 min, 30 min y 60 min.

En nuestro estudio, la reducción catódica a voltaje constante (20V) de los iones Ag^+ provenientes del ánodo se llevó a cabo en las proximidades del cátodo y se vio guiada por las

interacciones con los electrones libres del oxígeno presente en los grupos hidroxilo (OH-) de las cadenas moleculares del PVA.

En el caso de la PVP, las interacciones se presentaron debido al desplazamiento del par de electrones del átomo de nitrógeno adyacente en el anillo de la pirrolidona hacia el oxígeno del grupo carbonilo (COO-) de la PVP formando una carga parcial negativa en el átomo de oxígeno y una positiva en el átomo de nitrógeno. El mecanismo de reacción se generó gracias a la formación del complejo $\text{Ag}^+\text{-O}$ a partir del cual se llevó a cabo la reducción química en el que los iones plata reciben electrones provenientes del ánodo para dar paso a la formación de AgNPs recubiertas con PVP (Figura 5) (Neto et al., 2023; C. Wu et al., 2010).

El éxito de la formación de las NPs no solo radica en la reducción de los iones metálicos, ya que los pasos subsiguientes a ello consisten en la nucleación de los átomos y el crecimiento de las partículas (Thanh et al., 2014) Si las condiciones del medio no favorecen estos fenómenos, las NPs no se formarán o se formarán conglomerados de mayor tamaño debido a un crecimiento excesivo provocado por la alta reactividad superficial de las nanoestructuras. El uso de PVA y PVP como agentes estabilizantes generó un efecto estérico entre las partículas mejorando la estabilidad de los coloides. Por lo tanto, el PVA y PVP juegan un rol importante en la reducción y estabilización de las AgNPs desarrolladas mediante electrólisis proyectándose como excelentes medios electrolíticos.

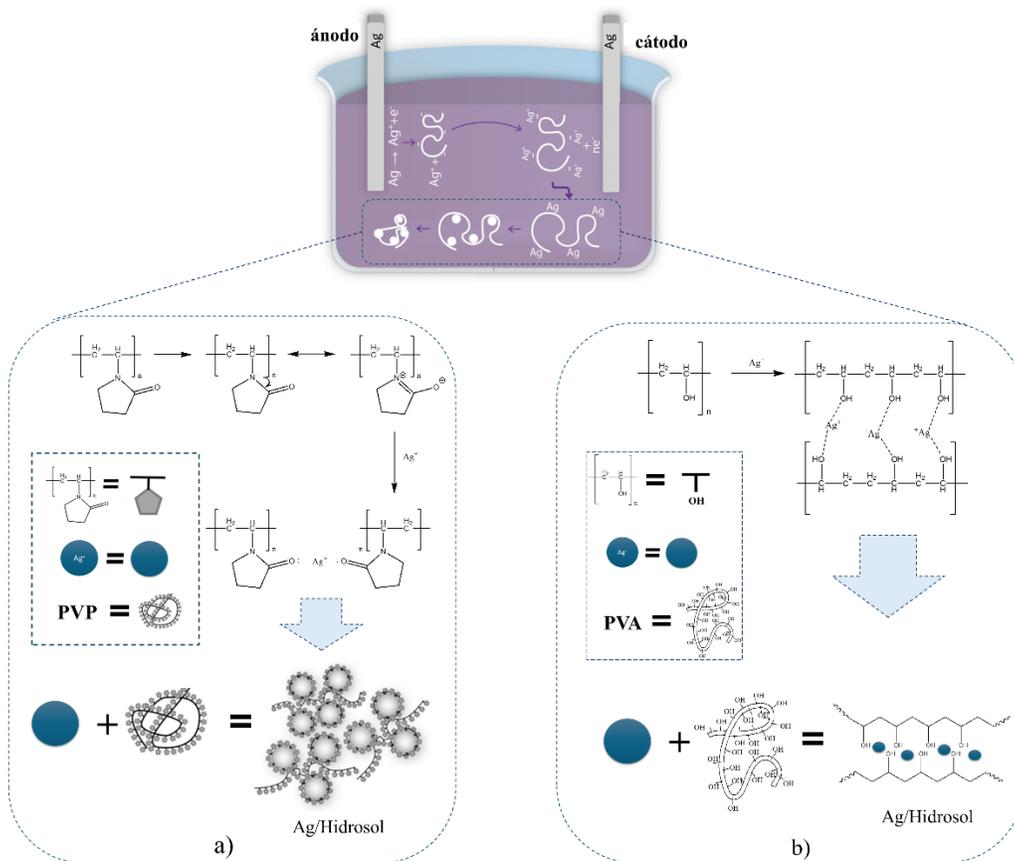


Figura 5. Esquema del mecanismo de obtención de Ag/Hidrosol con a) PVA y b) PVP.

En el caso de CT, aunque también se observó señal SPR y cambio de coloración, la ausencia de agentes estabilizantes en el medio conllevó a una formación de conglomerados y precipitación, por lo tanto, fue descartado en el plan experimental. Por su parte, el PAA es un políácido débil, el cual tiene la capacidad de desprotonarse en COO^- y H^+ de acuerdo con el pH de la solución. Debido a que requiere estímulos químicos como cambio de pH para que sus grupos carboxílicos se ionicen y sean capaces de donar o aceptar protones, hace que la reducción de iones plata sea más compleja (Kyrychenko et al., 2017; Wiśniewska et al., 2014). La electrólisis se llevó a cabo a pH 1.10 (que corresponde a una concentración de PAA de 0.1 mM), lo que conllevó a que los grupos funcionales de las cadenas poliméricas del PAA estuvieran predominantemente no disociados. La Figura 3.c, muestra el espectro de absorción

del sistema electrolítico utilizando PAA, en la cual se no se aprecia señal SPR. La adición de algún otro agente reductor o modificador de pH implicaría la adición de iones adicionales al sistema, los cuales comprometen la pureza de los Ag/Hidrosol propuestos, por lo tanto, se descartó igualmente al PAA del plan experimental como medio electrolítico.

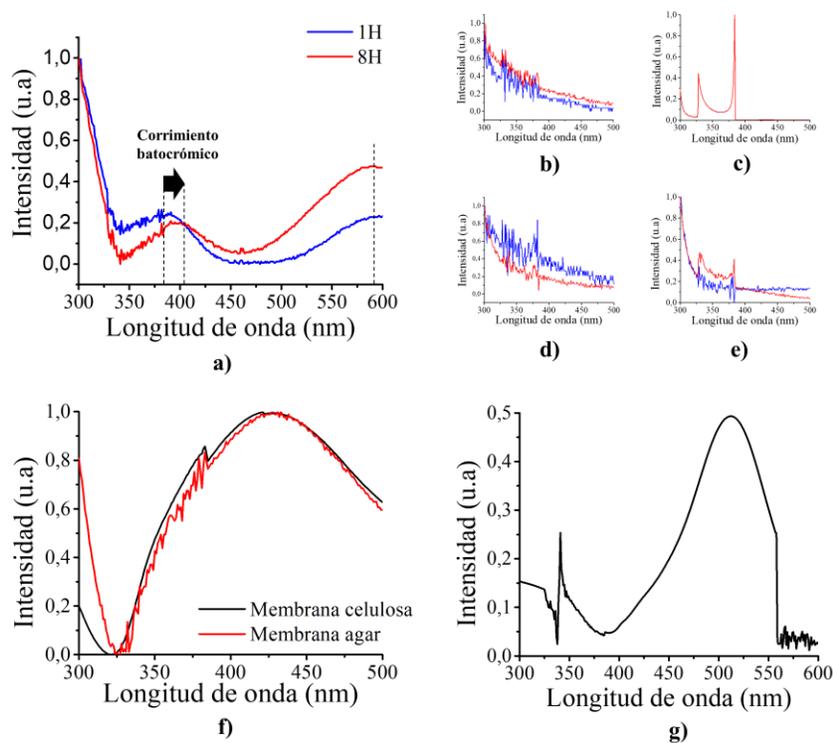


Figura 6. Espectro de absorción Uv-vis de los Ag/hidrosoles obtenidos mediante síntesis electroquímica en celda de concentración variable en agua desionizada durante 1 y 8 h utilizando membrana de Agar/Agarosa:carbón activo a una relación p/p de a) 1:0, b) sin membrana, c) 1:1, d) 1:2, e) 2:1. Espectro de absorción Uv-vis de los Ag/hidrosoles obtenidos mediante síntesis electroquímica en celda de concentración variable en solución de PVA a 0.10 mM utilizando membrana de Agar/Agarosa:carbón activo a una relación p/p de 1:0 y membrana comercial de celulosa durante 26 y 17 h respectivamente evaluado en el tiempo; f) día 1, g) día 2000.

Por otro lado, con el objetivo de formar una celda de concentración variable, el sistema electrolítico se dividió en dos celdas (ánodo y cátodo) separadas por una membrana inicialmente hecha con Agar/Agarosa:carbón activo con diferentes relaciones p/p y así

fomentar la conductividad iónica a través de ella (Figura 2.b). Bajo esta configuración se generó un gradiente de concentración de iones plata entre las dos celdas, lo que conllevó a que se acortaran los tiempos de obtención de las AgNPs.

La Figura 6.a muestra la evaluación del tiempo de reacción del sistema electrolítico utilizando solo la membrana de Agar/Agarosa. Se observó que la banda plasmónica característica de las AgNPs apareció a 390 nm para un tiempo de electrólisis de 1 hora. Al trascurrir 8 h de reacción se observaron tanto un cambio batocrómico como un ensanchamiento de la banda de plasmón, lo que podría atribuirse al crecimiento y agregación de las AgNPs (Boughbina-Portolés et al., 2021). Sin embargo, tras solo 1 hora de reacción se logró la obtención de estas nanoestructuras, acortando el tiempo de reacción en comparación con la electrólisis sin gradiente de concentración. No obstante, la adición de carbón activo en la membrana bajo cualquier relación analizada, impidió el transporte efectivo de iones plata a través de ella (Figura 6.b,c,d,e). Por otro lado, al usar una membrana comercial de celulosa durante 17 h se encontraron los mismos resultados que al utilizar la membrana de Agar/Agarosa para 26 h de reacción. La mezcla de polisacáridos a base de agarosas (moléculas neutras) y agaropectinas (moléculas cargadas eléctricamente) que componen esta membrana forman excelentes geles que se caracterizan por tener gran capacidad de difusión, alta resistencia y baja electro-endósmosis (Guo et al., 1998). Sin embargo, la formación del gel constituyó una estructura más densa que retrasó la conducción de iones desde el compartimiento anódico al catódico. Por ende, para la obtención de los Ag/Hidrosol y Cu/Hidrosol se estableció un tiempo de 17 h con el uso de PVA como medio polimérico y el uso de la membrana de celulosa como sistema de reacción.

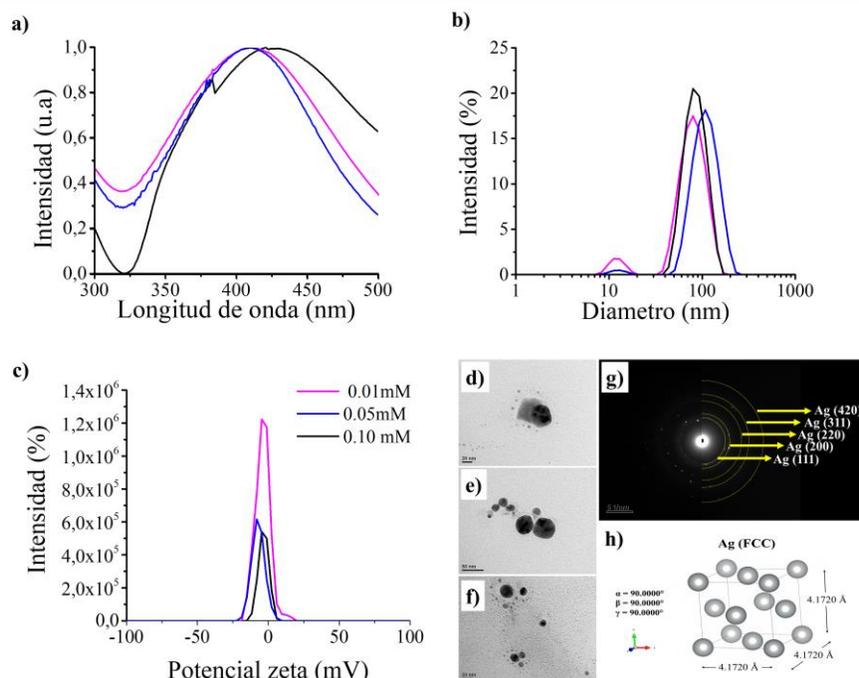


Figura 7. Ag/Hidrosol obtenidos mediante síntesis electroquímica en celda de concentración variable en PVA a 0.01 mM, 0.05 mM y 0.10 mM utilizando membrana comercial de celulosa durante 17 h; a) Espectro de absorción Uv-vis, b) Análisis DLS, c) Potencial zeta, d) Imágenes TEM, e) Patrón de Difracción de Área Selecta (SAED), f) Reconstrucción 3D de la celda unitaria FCC característica de la plata.

Utilizando este sistema ya establecido, se evaluó la variación de la concentración del PVA, la cual no influyó significativamente en la formación de los hidrosoles. En la Figura 7 y 8 se muestran los espectros UV-vis, análisis DLS y TEM de los Ag/Hidrosol y Cu/Hidrosol. La Figura 7.a, se observa el espectro UV-vis de los Ag/Hidrosoles en PVA a 0.01 mM, 0.05 mM y 0.10 mM, donde se aprecia el pico máximo de absorción a 420 nm, 421 nm y 425 nm respectivamente, característico de la vibración SPR de las AgNPs. Un leve corrimiento batocrómico se presentó para los Ag/Hidrosoles en PVA de mayor concentración. Esto se vio reflejado en los análisis DLS (Figura 7.b), donde se observó una distribución de tamaño monomodal con un diámetro hidrodinámico promedio (D_H) de 86.38 ± 1.67 nm. Un D_H mayor puede deberse a que el tamaño de partícula medido por DLS no solo expresa el tamaño

de la nanopartícula, también toma en cuenta las moléculas de PVA que en este caso rodean o están ligeramente unidas o adsorbidas en la superficie de la partícula (Rabanel et al., 2014), por ende, una mayor concentración de moléculas de PVA en el medio representó cambios en la velocidad del movimiento browniano de las AgNPs y por lo tanto cambios en la intensidad de luz dispersada. En el caso de los Ag/Hidrosol en PVA a menores concentraciones se evidenció una distribución bimodal, con tamaños promedio de 82.66 ± 1.05 nm y 12.23 ± 1.17 nm (para PVA 0.01 mM) y 112.1 ± 4.33 nm y 12.66 ± 1.34 nm (para PVA 0.05 mM). En el caso de los Cu/Hidrosol no se evidenciaron corrimientos hacia azul o rojo (Figura 8.a), sugiriendo que las nanopartículas presentan una distribución de tamaño estable y uniforme sin efecto del incremento de la concentración del PVA como medio electrolítico. Sin embargo, el empleo de este polímero en la síntesis electroquímica de los Cu/Hidrosol presentó un impacto significativo en el proceso y las propiedades de las nanopartículas resultantes. Ya que al actuar como agente estabilizador y matriz para las nanopartículas de cobre durante la síntesis influyó en la velocidad de reducción de los iones de cobre y en la nucleación de las partículas al modificar las propiedades del medio de reacción, como la viscosidad. Además de rodear o complejar los iones metálicos. Esto se vio reflejado el espectro UV-vis donde se aprecia el pico máximo de absorción alrededor de 680 nm (Figura 8.a), característico del SPR de CuNPs. Se ha evidenciado que en el caso de CuNPs con tamaños inferiores a 4 nm, se espera que el pico de SPR aparezca alrededor de 575 nm. Sin embargo, cuando el tamaño de las partículas es mayor, el pico de SPR tiende a volverse más amplio y se desplaza hacia longitudes de onda más largas, es decir, hacia el extremo rojo del espectro visible con valores de vibración de SPR hasta 700 nm. Algunos estudios han encontrado que para CuNPs de aproximadamente 8 nm de tamaño, obtenidas mediante reducción química, el pico de SPR se ubica alrededor de 585 nm. En contraste, para partículas

de mayor tamaño, alrededor de 50 nm, obtenidas mediante síntesis electroquímica utilizando electrodos de cobre y grafito, se han reportado valores de SPR de alrededor de 566 nm. El efecto del PVA sobre la formación de los Cu/Hidrosol también se vio reflejado mediante los análisis DLS (Figura 8.b), donde se observó una distribución de tamaño bimodal con un D_H de 81.60 ± 3.10 nm y 17.87 ± 0.70 para los hidrosoles en PVA a 0.01 mM, 81.60 ± 3.10 nm y 17.87 ± 0.70 nm (para PVA 0.05 mM) y 69.98 ± 7.20 nm y 13.12 ± 1.13 nm (para PVA 0.10 mM) respectivamente.

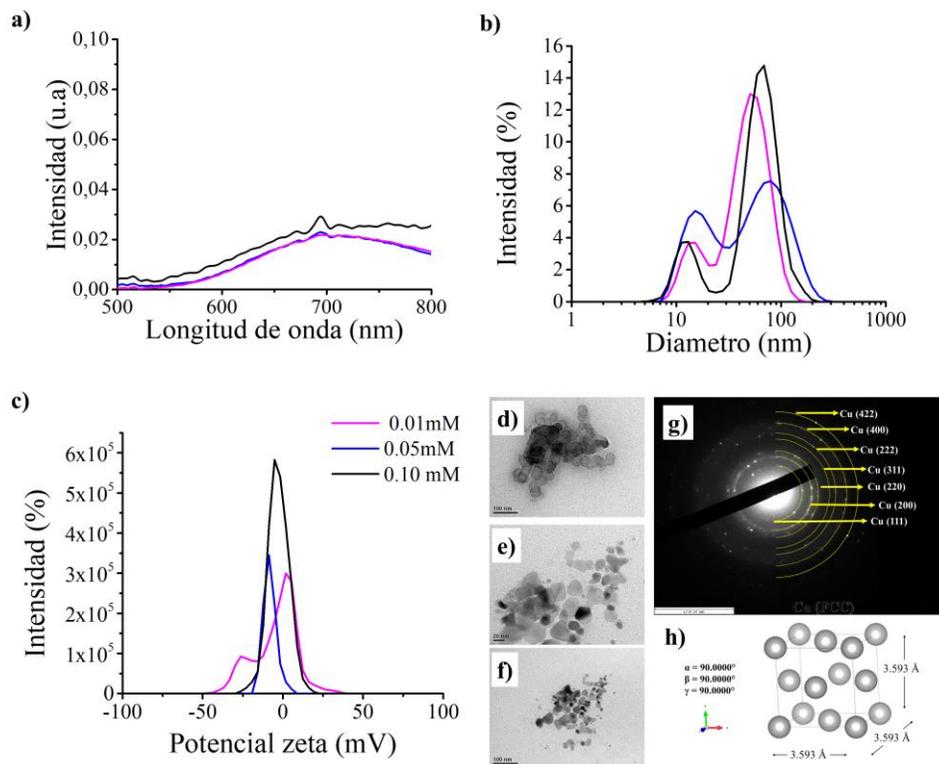


Figura 8. Cu/Hidrosol obtenidos mediante síntesis electroquímica en celda de concentración variable en PVA a 0.01 mM, 0.05 mM y 0.10 mM utilizando membrana comercial de celulosa durante 17 h; a) Espectro de absorción Uv-vis, b) Análisis DLS, c) Potencial zeta, d) Imágenes TEM, e) Patrón de Difracción de Área Selecta (SAED), f) Reconstrucción 3D de la celda unitaria FCC característica de la plata.

No obstante, algunos autores afirman que el D_H medido con DLS es mayor que el diámetro medido con un microscopio electrónico de transmisión (TEM), por lo tanto, el aumento del D_H es consistente con la explicación teórica del espesor de una o varias capas de moléculas poliméricas sobre la nanopartícula. Ya que el D_H se mide en el plano de corte entre la superficie externa de la partícula y el medio circundante que en nuestro caso es la solución de PVA, la posición de este plano de corte depende de la capa polimérica externa, con lo que se deduce que en cuanto mayor sea esta capa (o en cuanto más agregación de partículas haya), mayor será la distancia desde la superficie hacia la solución de PVA, generando un elevado D_H y potencial z . En la Figura 7.c y Figura 8.c, se aprecia que el incremento en la concentración de PVA en el medio no altera significativamente los valores de potencial z para ambos hidrosoles, con valores de: -4.6 ± 2.28 , -8.10 ± 2.20 y -4.3 ± 0.35 mV para los Ag/Hidrosol en 0.01 mM, 0.05 mM y 0.10 mM de PVA respectivamente, y 1.86 ± 0.54 , -8.70 ± 1.34 y -5.18 ± 1.15 mV para los Cu/Hidrosol en 0.01 mM, 0.05 mM y 0.10 mM de PVA respectivamente, lo que revela una carga superficial negativa y una puntuación de estabilidad baja ya que según algunos autores la estabilidad para los coloides se logra a valores superiores a $|30|$ mV (Vazquez-Muñoz et al., 2019). Sin embargo, tanto los Ag/Hidrosol como los Cu/Hidrosol no presentaron precipitación inclusive tras varios procesos de centrifugación.

Por otro lado, la morfología encontrada para las nanopartículas que conforman los Hidrosol analizada por TEM se muestra en la Figura 7.d-f y Figura 8.d-f. En el caso de los Ag/Hidrosol, se obtuvieron partículas redondas con tamaños promedio inferiores a los previstos con DLS, con valores de 9.59 ± 6.85 nm, 16.03 ± 5.90 y 15.06 ± 7.12 nm, respectivamente para 0.01 mM, 0.05 mM y 0.10 mM de PVA. El patrón de difracción de área selecta (SAED) mostró un espaciado d de 2.41, 2.09, 1.48, 1.26 y 0.93 Å, correspondiente a los planos hkl {111, 200, 220, 311, y 420}, respectivamente (Figura 7.g), según la tarjeta de base de datos abierta de

cristalografía (Crystallography Open Database, COD según sus siglas en inglés) de la plata expediente No. 9013053.cif. Según estos datos y los parámetros de red resultado de la reconstrucción 3D, se confirmó una estructura cristalina cúbica centrada en la cara (FCC) con un grupo espacial de Fm-3m (parámetro de celda unitaria calculado $a = 4,1720 \text{ \AA}$) (Figura 7.h). En el caso de los Cu/Hidrosol la Figura 8.g muestra el patrón SAED, en el cual se observan 7 anillos de difracción distintos con sus valores de espaciado interplanar correspondientes d de 2.06, 1.93, 1.26, 1.13, 1.00, 0.93 y 0.77 \AA correspondiente a los planos hkl {111, 200, 220, 311, y 222, 400 y 422}, respectivamente. Estos valores están de acuerdo con los de una celda FCC para el cobre (según el COD del cobre expediente No. 4313211.cif, con un Fm-3m, $a=b=c=3.953 \text{ \AA}$, Figura 8.h).

4.2 Obtención de soles de plata y cobre mediante calentamiento asistido por microondas (Ag/sol y Cu/sol)

La combinación del método de síntesis basado en el calentamiento asistido por microondas con el método de síntesis por poliol utilizando PEG como agente reductor y PVP como agente estabilizante, ofreció una manera rápida y fácil de generar soles de plata altamente estables. Las mediciones realizadas por TEM, UV-Vis y DLS verificaron la síntesis exitosa de todas las muestras de Ag/sol desarrolladas (Figura 9. a-h). La Figura 9.a-c, muestran las imágenes TEM de los Ag/sol utilizando soluciones de PVP a 0.10 mM, 0.08 mM y 0.05 mM. Las AgNPs obtenidas muestran una distribución de tamaño monodispersa con un diámetro promedio de $11.12 \pm 1.78 \text{ nm}$, $11.65 \pm 3.51 \text{ nm}$ y $9.82 \pm 2.41 \text{ nm}$, respectivamente.

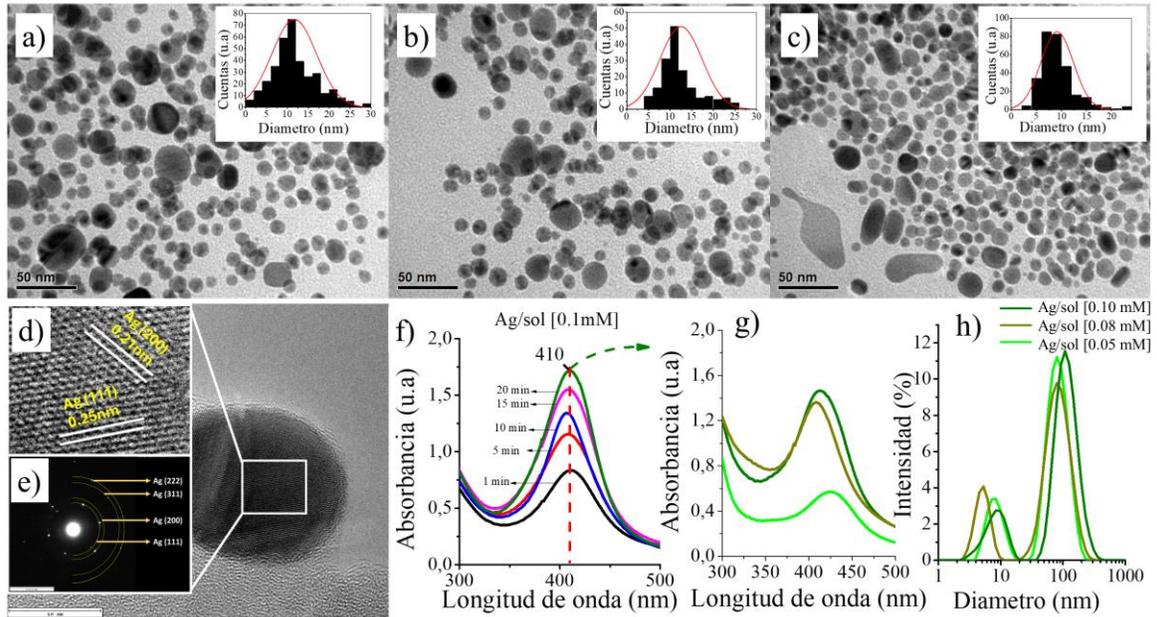


Figura 9. Ag/soles obtenidos mediante síntesis asistida por microondas; Imágenes TEM de los soles de plata en PVP a a) 0.10 mM, b) 0.08 mM y c) 0.05 mM. Imágenes HR-TEM de las nanopartículas de plata esféricas individuales d) Espaciado de red, e) Patrón de difracción de electrones del área seleccionada, f) Espectro de absorción Uv-vis de los Ag/sol a [0.1 mM] obtenidos mediante calentamiento durante 1 min, 5 min, 10 min, 15 min y 20 min, g) Espectro de absorción Uv-vis de los Ag/sol a diferentes concentraciones y h) Análisis DLS.

La imagen HR-TEM en la Figura 9.d muestra que estas nanopartículas son cristalinas con superficies facetadas con una morfología esférica y algunas ligeramente elípticas, con una distancia interplanar d de 0.21 y 0.25 nm correspondiente a los planos hkl {200 y 111}, respectivamente. El patrón SAED indexado con puntos brillantes de los Ag/soles también indicaron la naturaleza cristalina de las AgNPs, con franjas con anillos circulares brillantes correspondientes a los planos hkl {111, 200, 311 y 222} con $d= 2.35, 2.03, 1.23$ y 1.18 nm, respectivamente (Figura 9.e), según la COD de la plata expediente No. 9012961.cif. Según estos datos y los parámetros de red resultado de la reconstrucción 3D (Figura 10), se confirmó una estructura cristalina cúbica centrada en la cara (FCC) con un grupo espacial de Fm-3m (parámetro de celda unitaria calculado $a = 4.0772 \text{ \AA}$).

Por otro lado, el tiempo de calentamiento con microondas se analizó mediante espectroscopía UV-vis (Figura 9. f). Se observó un incremento de la intensidad de la señal SPR de los Ag/sol obtenidos con el incremento del tiempo de calentamiento, con un pico máximo a 410 nm, sin ensanchamiento ni corrimiento de la banda, lo que indicó una alta estabilidad e incremento de la concentración de los coloides. Sin embargo, durante la irradiación con microondas, la PVP se descompone produciendo cadenas poliméricas más cortas que reducen la función de protección en la superficie de las AgNPs (Soltani et al., 2012). Fue por esto que, al aumentar la duración del calentamiento, el color de los Ag/soles cambió de amarillo pardusco a amarillo oscuro, debido a la degradación del polímero y al crecimiento de las AgNPs. Algunos investigadores encontraron que tiempos de calentamiento superiores a 20 min (~35-40 min) comprometen la estabilidad y tamaño de las AgNPs (Özkar & Finke, 2017). Por lo tanto, se estableció como tiempo de calentamiento 20 min y a partir de ello se generaron Ag/sol con distinta concentración a partir de diversas soluciones de AgNO₃. Al incrementar la concentración del AgNO₃ de igual manera dio como resultado una solución coloreada, de amarillo pardusco a marrón. El espectro UV-vis y el análisis DLS (Figura 9.g y h) mostraron un incremento de la intensidad de la señal SPR y un leve corrimiento hipsocrómico. El D_H de las partículas medido con DLS arrojó valores mayores con respecto a lo analizado con TEM, con una distribución bimodal con tamaños promedio de 87.14 ± 11.78 nm y 8.27 ± 1.85 nm (para Ag/sol de 0.05 mM), 89.96 ± 6.06 nm y 5.23 ± 0.37 nm (para Ag/sol de 0.08 mM) y 77.32 ± 4.98 nm y 9.20 ± 1.79 nm (para Ag/sol de 0.10 mM).

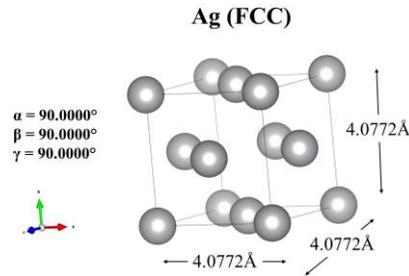


Figura 10. Reconstrucción 3D de la celda unitaria FCC característica de la plata para los Ag/sol.

En comparación con Ag/Hidrosol obtenidos en la sección 4.1.1, los Ag/sol presentaron mayor estabilidad, menor tamaño de partícula y la posibilidad de obtener soles de concentración conocida y de manera más rápida. La rapidez y éxito de la obtención de los Ag/sol se debe principalmente al uso tecnológico del calentamiento asistido por las ondas microondas. Estas ondas hacen parte del espectro electromagnético con ondas de energía eléctrica y magnética, con frecuencias que oscilan entre 300 MHz y 30 GHz, y por ende representan una alternativa rápida y fácil con altas tasas de calentamiento y eficiencia térmica (X. Liu et al., 2018). El componente eléctrico de la radiación por microondas es el responsable de generar el calentamiento mediante dos mecanismos principales: (i) polarización dipolar o rotación dipolar de las moléculas polares que intentan alinearse sobre sí mismas a medida que el campo eléctrico oscila, transfiriendo energía por fricción molecular y (ii) conducción iónica de los iones que en presencia del campo eléctrico de la radiación se orientan similar a lo que pasa con la rotación dipolar. Este tipo de calentamiento es benéfico para la formación de NPs ya que es homogéneo y contante, lo que hace que los soles presenten alta homogeneidad y estabilidad.

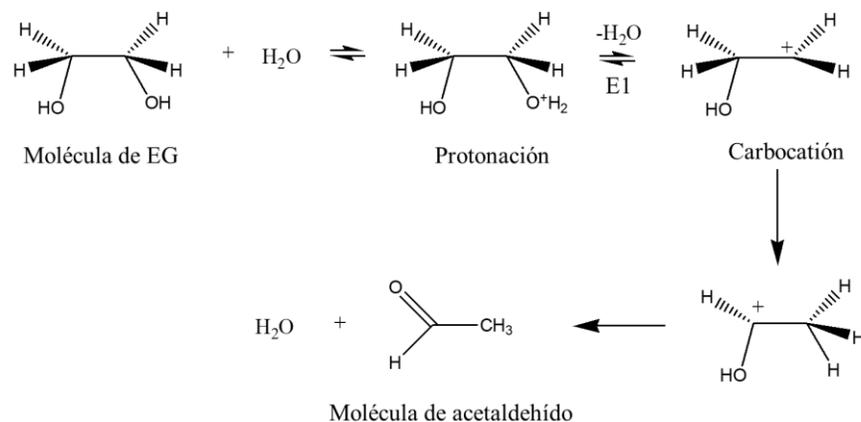
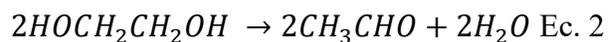
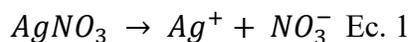


Figura 11. Esquema del mecanismo Whitmore para la formación de acetaldehído a partir de la descomposición de las moléculas de EG del PEG.

Además, el proceso de formación de los Ag/sol también se vio influenciado por la eficacia del método de síntesis por polirol, en el cual el alcohol usado como solvente también actúa como agente reductor. Así, el mecanismo de obtención de los Ag/sol se dividió en tres etapas, descritas a continuación: i) la primera etapa comprendió la disociación del AgNO₃ en iones Ag⁺ y NO₃⁻ (Ec.1). La presencia del PEG en este sistema restringió el movimiento de rotación de estos iones de plata, por lo tanto, los inmovilizó mientras en la siguiente etapa los redujo. ii) en esta segunda etapa, el PEG se descompuso térmicamente generando moléculas de acetaldehído (CH₃CHO) de acuerdo con el mecanismo de Whitmore (Ec. 2) (Smith, 2002), en el cual se produjo un reordenamiento de tipo pinacol. De acuerdo con este mecanismo, los grupos hidroxilo (-OH) del PEG tienden a protonarse para dar paso a la formación de H₂O como grupo saliente (deshidratación o eliminación E1) y formación de un carbocatión. La estabilidad de este carbocatión es corta y tiende a reorganizarse para dar una nueva especie catiónica estabilizada por resonancia con el doble enlace C=O formando moléculas de acetaldehído cuyos grupos aldehído (-CHO) tienen una fuerte propiedad reductora (Smith, 2002). El esquema del mecanismo se resume en la Figura 11.



En el proceso, los iones Ag^+ en medio acuoso forman óxidos de plata, Ag_2O que actúan como agentes oxidantes fuertes para oxidar el grupo aldehído del acetaldehído. El ataque nucleofílico del Ag_2O al carbono nucleófilo formó una especie intermedia transitoria que se reorganizó perdiendo dos electrones durante la reacción, formando átomos de Ag^0 (AgNPs) y moléculas de ácido acético Ec. 3. La presencia de la PVP también influyó tanto en la reducción como en la estabilización de los átomos de plata formados.

Por otro lado, se registraron los espectros de absorción UV-Vis para los Cu/sol en diferentes concentraciones del $CuSO_4$ como precursor metálico (Figura 12). No hay absorción de SPR presente alrededor de 500-700 nm característico de CuNPs. Sin embargo, después de los 20 min de irradiación las soluciones que inicialmente eran de color azul tomaron una coloración marrón oscuro, y se puede apreciar un hombro de absorción aproximadamente a 248 nm que corresponden a las bandas de SPR característicos de CuONPs (Santhosh et al., 2023) las cuales incrementan su señal en intensidad con el incremento de la concentración de la sal de cobre precursora. No hay ningún corrimiento del pico de absorción con el incremento de la concentración, lo que significa que el tamaño de las NPs formadas es homogéneo.

Se propone el siguiente mecanismo como proceso de formación de las NPs: Inicialmente la reacción entre los iones de cobre y el acetaldehído resulta en complejos de cobre-acetaldehído bajo interacciones de coordinación, donde el cobre coordina con el oxígeno del grupo carbonilo del acetaldehído. Luego, estos complejos se transforman en $Cu(OH)_2$ y de Cu_2O como intermediario para la formación de CuONPs. Sin embargo, nanopartículas de óxido de

cobre se ven favorecidas por la presencia de agua en el medio debido a la deshidratación del PEG.

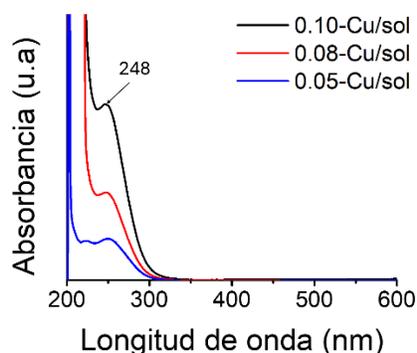


Figura 12. Espectro Uv-vis para los Cu/sol en PVP a 0.10 mM, 0.08 mM y 0.05 mM.

Las mediciones realizadas por HR-TEM verificaron lo anterior (Figura 13). El patrón SAED indexado indicó la naturaleza cristalina de las nanopartículas, con anillos circulares correspondientes a los planos hkl {110, 11-2, 021, 004, 130 y 22-4} con $d= 2.78, 1.96, 1.67, 1.29, 1.14$ y 0.98 nm, respectivamente (Figura 13.e), según la COD del CuO expediente No. 9015714.cif. La morfología encontrada también fue esférica con un diámetro promedio de 9.11 ± 1.58 nm, 10.65 ± 2.31 nm y 11.98 ± 1.54 nm, respectivamente para los Cu/sol con 0.10, 0.05 y 0.08 mM. Según estos datos y los parámetros de red resultado de la reconstrucción 3D (Figura 13.f), se confirmó una estructura cristalina monoclinica con un grupo espacial de C2/c (parámetro de celda unitaria calculado $a = 4.6791$ Å, $b = 3.4875$ Å y $c = 5.1183$ Å). El D_H de las partículas medido con DLS de igual manera mostró una distribución bimodal con tamaños promedio de 8.14 ± 1.38 nm y 97.55 ± 3.41 nm para Cu/sol de 0.08 mM y una distribución unimodal para Cu/sol de 0.05 mM y para Cu/sol de 0.10 mM con valores de 10.87 ± 1.51 nm y 9.80 ± 2.59 nm (Figura 13.g).

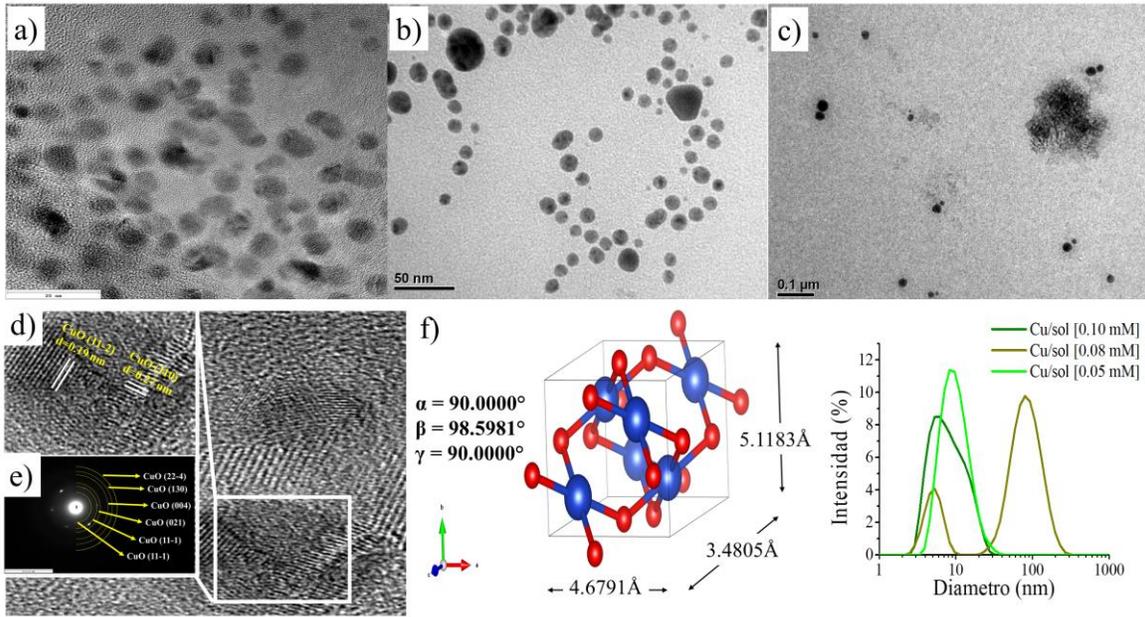


Figura 13. Cu/sols obtenidos mediante síntesis asistida por microondas; Imágenes TEM de los soles de cobre en PVP a a) 0.10 mM, b) 0.08 mM y c) 0.05 mM. Imágenes HR-TEM de las nanopartículas de cobre esféricas individuales d) Espaciado de red, e) Patrón de difracción de electrones del área seleccionada, f) Reconstrucción 3D de la celda unitaria FCC característica del cobre y g) Análisis DLS de los Cu/sol a diferentes concentraciones.

4.4 Desarrollo de geles nanoestructurados con PVA y PVP

4.4.1 Síntesis de los geles nanoestructurados mediante entrelazamiento en un solo paso con PVP

La estrategia empleada para la generación de estos geles nanoestructurados se basó en la inmovilización de las nanopartículas de plata y cobre (obtenidos mediante el método de reducción química por poliol en un solo paso con PEG como solvente y agente reductor como se realizó los Ag/sol y Cu/sol en la sección 4.2) sobre matrices poliméricas de PVA: PVP enlazadas físicamente utilizando ondas microondas como fuente de calor, *todo en un solo paso*, es decir: por un lado, las ondas microondas descomponen moléculas glicólicas del solvente y forman radicales libres necesarios para la formación de átomos metálicos que

nuclean para formar nanopartículas y, al mismo tiempo, estas partículas son estabilizadas por cadenas poliméricas que se entrelazan entre sí para formar la estructura polimérica tridimensional nanoestructurada.

4.4.1.1 Síntesis de los geles nanoestructurados con AgNPs mediante entrelazamiento en un solo paso con PVP (Ag/1P-gel)

La formación de AgNPs dentro de los geles se verificó inicialmente mediante una inspección visual inicial del cambio de color de la mezcla de reacción de incolora a amarilla intensa y marrón oscuro, respectivamente (Figura 14).

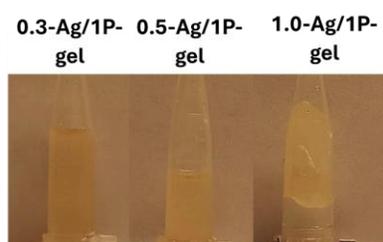


Figura 14. Ag/1P-gel obtenidos con diferente relación molar PVA:PVP

Según la caracterización fisicoquímica de nuestros geles nanoestructurados, el aumento de PVA representó una disminución en el grado de hinchamiento y por lo tanto mayores valores de disolución. Esto debido a que los geles mostraron una alta hidrofiliicidad con fuerte tendencia a formar enlaces de hidrógeno y por tanto a disolverse. Los perfiles de hinchazón y solubilidad de los geles se analizaron durante 0-96 h en contacto con agua y se muestran en la Figura 15.a y b, alcanzando un hinchamiento máximo alrededor de 25 g de agua/g de gel seco. A partir de este momento la conformación polimérica comenzó a disolver ya que no hubo entrecruzamiento químico entre los dos polímeros. Se alcanzó una solubilidad entre 90-100% a las 24 h (Figura 15b). Huang et al., y Eisa et al., (Eisa et al., 2017; Huang et al., 2017) encontraron resultados similares. En nuestro caso, la disolución de los geles en el medio acuoso representó una ventaja debido a que gracias a ello se aumentó la disponibilidad

de partículas antibacterianas en el medio y por tanto se mejoró la interacción con las células (tantas células eucariotas como procariotas). En el tratamiento de endodoncia después de dos h, estos geles ofrecieron una gran ventaja debido a que la liberación de partículas metálicas mejoró la actividad bactericida manteniendo la citotoxicidad controlada (los resultados se discutirán más adelante). Además, el aumento de PVA generó un aumento en la interacción con la PVP y por lo tanto se obtuvo una consistencia mucho más densa similar a un efecto de entrecruzamiento, de acuerdo con la reología encontrada.

Tabla 3. Datos reológicos de geles para los Ag/1P-gel con diferente relación PVA:PVP y consistencia física

Relación PVA:PVP	Consistencia	Propiedades reológicas				Ángulo de fase δ (°)
		Viscosidad compleja η^* (Pa.s)	Módulo complejo G^* (Pa)	Módulo de almacenamiento G' (Pa)	Esfuerzo (μ N.m)	
0.3	Viscoso no		75.12 \pm		6.68E4 \pm	0.08 \pm 0.01
	sólido	11.96 \pm 4.33	27.18	73.54 \pm 29.69	323.14	
0.5	Viscoso no		1022.79	1011.28 \pm	1.13E5 \pm	0.30 \pm 0.10
	sólido	162.78 \pm 66.12	\pm 1672.08	1652.99	1.97E3	
1.0	Sólido		2059.93 \pm	2042.40 \pm	1.24E6 \pm	0.75 \pm 0.08
		327.85 \pm 245.43	1542.06	1540.83	3.66E5	

La Figura 15.c y la Tabla 3 muestra la resistencia total al flujo en términos de frecuencia angular (viscosidad compleja, η^*) para todos los 1P-Ag/gel. Al aumentar la cantidad de PVA, se evidenció una tendencia al aumento de η^* con una diferencia significativa entre los geles con un nivel de significancia del 5% ($p=0.0236$). Se observó que a un corte de 0.01% para los geles formados con relación 0.3 PVA:PVP se presentó una viscosidad de 11.96 \pm 4.33 Pa.s. Al aumentar la cantidad de PVA en los geles, los η^* obtenidos fueron de 162.78 \pm 66.12 Pa.s y 327.85 \pm 245.43 Pa.s para 0.5-Ag/1P-gel y 1.0-Ag/1P-gel respectivamente. Esto se pudo demostrar también en la consistencia física de los geles, pasando de geles viscosos no

sólidos hasta geles totalmente sólidos para la relación más alta de PVA:PVP. Por otro lado, se determinó el módulo de almacenamiento en función de las deformaciones de oscilación en las que se presentó un pico de viscosidad máximo. Antes de este punto, los geles sufrieron deformación elástica, y después de este punto los geles perdieron su límite elástico máximo y la estructura elástica se rompió (Huang et al., 2017). De acuerdo con esto, el aumento de PVA en los geles permitió obtener valores de límite elástico más altos, con valores de; $6.68E4 \pm 323.14 \mu\text{N.m}$, $1.13E5 \pm 1.97E3 \mu\text{N.m}$ y $1.24E6 \pm 3.66E5 \mu\text{N.m}$ para relaciones 0.3, 0.5 y 1.0 PVA:PVP en los geles respectivamente. Esto corresponde al aumento de las interacciones moleculares dentro de la red polimérica (Palacio et al., 2018). Asimismo, el ángulo de fase o tangente de pérdida encontrado mostró un aumento en la contribución viscosa hacia ángulos mayores a 0° (Tabla. 3).

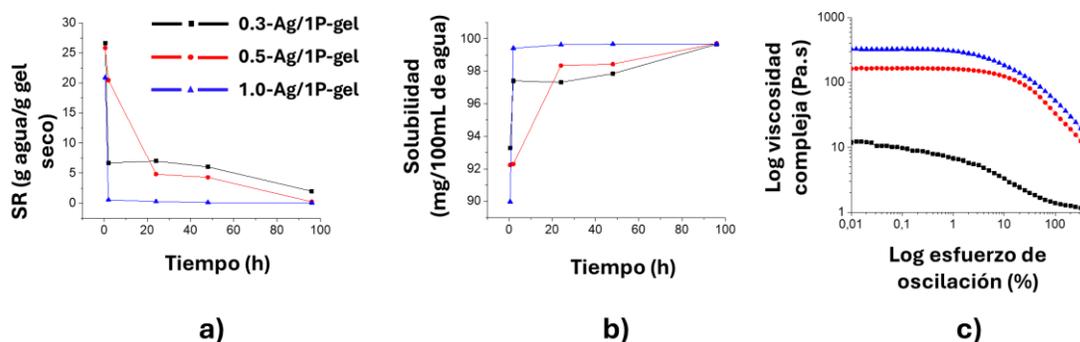


Figura 15. Evaluación de propiedades fisicoquímicas de los 1P-Ag/gel obtenidos con diferente relación molar PVA:PVP, a) Perfiles de hinchazón y b) solubilidad. c) propiedades reológicas.

Por otro lado, se examinó la morfología y la topografía de la superficie de los Ag/1P-gel con diferentes contenidos de PVA después de la liofilización mediante SEM y AFM (Figura 16). Las micrografías SEM mostraron la morfología y la porosidad de los geles, cuyo tamaño de poro dependió directamente del contenido de PVA; con el aumento del contenido de PVA se

creó una estructura de red compacta con menos poros. Esta variación de la porosidad superficial observada por SEM se puede atribuir al aumento de las interacciones a través de enlaces de hidrógeno entre cadenas entre el grupo carbonilo de PVP y los grupos hidroxilo de PVA, lo que conduce a la reticulación física de estos dos polímeros y por lo tanto a la disminución de los espacios del gel (Thomas et al., 2003). El diámetro de los poros de la superficie de los gels disminuyó significativamente de 0.3-Ag/1P-gel a 0.5-Ag/1P-gel, y no se encontraron superficies porosas en los gels de mayor contenido de PVA; 1.0-Ag/1P-gel ($p < 0.0001$). De manera similar, las micrografías de las secciones transversales no mostraron poros excepto en los gels con la menor proporción de PVA añadido.

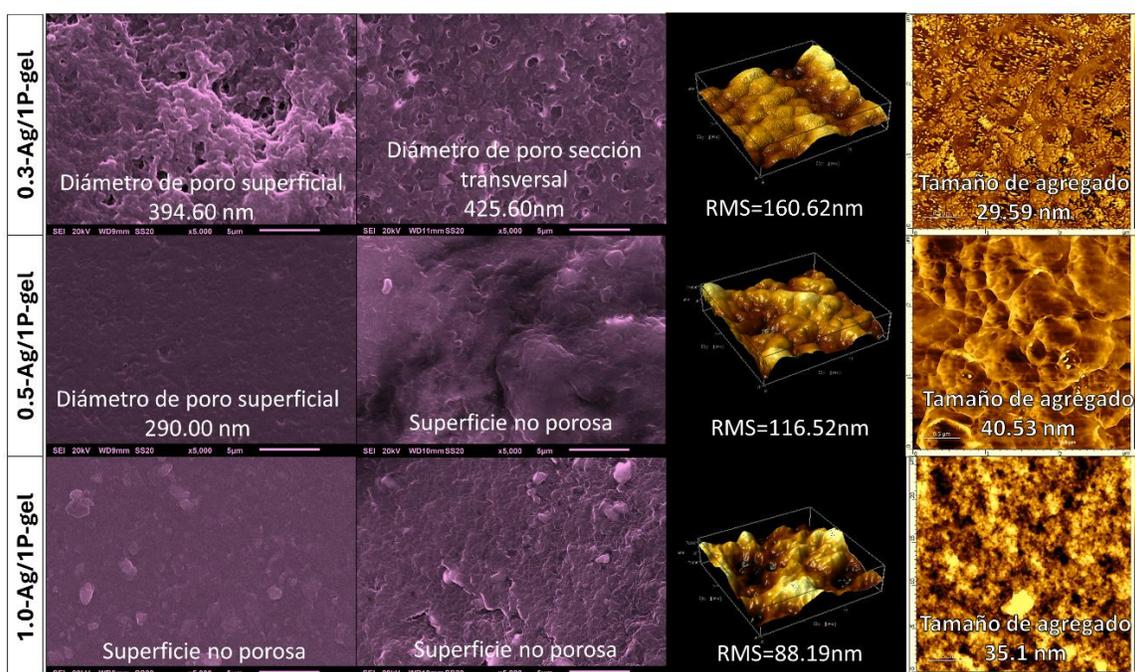


Figura 16. Micrografías SEM e imágenes AFM para Ag/1P-gel. Micrografías SEM de la superficie y sección transversal, reconstrucción AFM 3D e imagen de fase original 3x3 μm para 0.3-Ag/1P-gel con contenido de 0.3 PVA, 0.5-Ag/1P-gel con contenido de 0.5 PVA, 1.0-Ag/1P-gel con contenido de 1.0 PVA.

Las imágenes de fase duplicadas obtenidas de la misma ubicación de las imágenes AFM mostraron dos fases claramente identificadas producidas por cambios en el ángulo de fase de

la sonda en voladizo y debido a la rigidez, viscoelasticidad y cambios en la composición química de las superficies propias de cada gel (Oliveira et al., 2014). Una señal de fase baja con picos por debajo de 0° representados en regiones oscuras y circulares podría corresponder al agregado de nanopartículas rodeadas por una red polimérica, representadas en las áreas más claras con un amplio rango entre señal de fase media a alta por encima de 50° (Figura 16). Además, se encontró una amplia distribución de tamaño de nanopartículas agregadas en la superficie para todas las muestras (Tabla 4 y Figura 17).

Tabla 4. Propiedades superficiales de los Ag/IP-gel con diferentes relaciones PVA:PVP.

	Relación PVA:PVP			Blanco/IP-gel
	0.3	0.5	1.0	1.0
Tamaño de agregado (nm)	29.59 ± 10.71	40.53 ± 16.89	35.17 ± 17.99	-
Tamaño de conglomerado (nm)	368.99 ± 158.11	242.31 ± 122.81	173.52 ± 66.44	-
Tamaño de partícula (nm)	11.45 ± 1.27	15.45 ± 1.57	12.53 ± 4.46	-
Ángulo de fase AFM ($^\circ$)	-40	-18	-4	-
Rugosidad (Sq)	160.62 ± 50.81	116.52 ± 16.91	88.19 ± 28.39	29.49 ± 10.43
Rugosidad media (Sa)	131.22 ± 41.55	96.26 ± 15.31	73.05 ± 23.58	25.10 ± 5.43
Diámetro de poro superficial (nm)	394.60 ± 205.25	290.00 ± 193.98	-	-

El análisis TEM mostró las partículas dentro de los conglomerados y no hubo diferencias significativas en los tamaños promedio de partículas, con valores de 11.45 ± 1.27 , 15.45 ± 1.57 y 12.53 ± 4.46 nm para los Ag/IP-gel (relación 0.3, 0.5 y 1.0 PVA:PVP respectivamente).

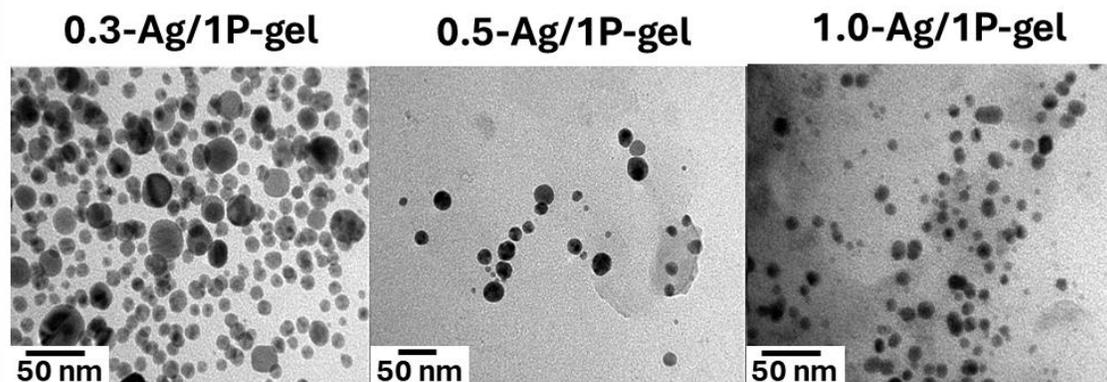


Figura 17. Análisis por Microscopía Electrónica de transmisión (TEM) para para 0.3-Ag/1P-gel con contenido de 0.3 PVA, 0.5-Ag/1P-gel con contenido de 0.5 PVA y 1.0-Ag/1P-gel con contenido de 1.0 PVA.

Los espectros FT-IR entre 900 y 4000 cm^{-1} de los Ag/1P-gel y Cu/1P-gel con una relación de PVA variable se muestran en la Figura 18 (se muestran los espectros para ambos tipos de nanopartículas plata y cobre dentro de los geles ya que no se encontraron diferencias entre ellos). En la Figura 4a se muestra que todos los espectros muestran una selección característica a 3284 cm^{-1} de vibración de estiramiento de OH, correspondiente al grupo hidroxilo del PVA. Mientras que el estiramiento asimétrico CH y el estiramiento simétrico del grupo CH_2 se muestran en 2941 cm^{-1} y 2906 cm^{-1} , respectivamente (Abd El-Kader et al., 2021a; Jipa et al., 2012). Además, las bandas a 2876 cm^{-1} de estiramiento simétrico corresponden a los modos de deformación CH del grupo CH_2 del anillo de la PVP. No se observaron bandas de absorción de estiramiento asimétrico de CH del anillo de PVP a 2956 cm^{-1} porque esas bandas pueden superponerse con las señales de la cadena de CH (Safo et al., 2019). En la Figura 18.b es posible ver bandas de absorción ubicadas alrededor de 1651 cm^{-1} atribuidas a la frecuencia de estiramiento de $\text{C}=\text{O}$ en los grupos amida del anillo heterocíclico, y bandas de absorción en 1291 cm^{-1} y 1494 cm^{-1} que están relacionadas con la vibración de flexión N-C y la vibración de estiramiento $\text{N}-\text{C}=\text{O}$ de la estructura de pirrolidona

(Abd El-Kader et al., 2021b; Ma, Bai, et al., 2016; Safo et al., 2019; Song et al., 2014; Xian et al., 2012). A 1324 cm^{-1} corresponden al balanceo de $\delta(\text{OH})$ con el movimiento del CH. Los picos ubicados en los números de onda 1142 cm^{-1} y 1084 cm^{-1} reflejan el estiramiento del hombro del CO a partir de la secuencia cristalina y amorfa de PVA, respectivamente (Safo et al., 2019). Finalmente, el pico de absorción se localiza alrededor de 1039 cm^{-1} es atribuido a la vibración de flexión del hidroxilo del polietilenglicol, lo que indica que el polímero no se descompuso en su totalidad, Figura 18.c.

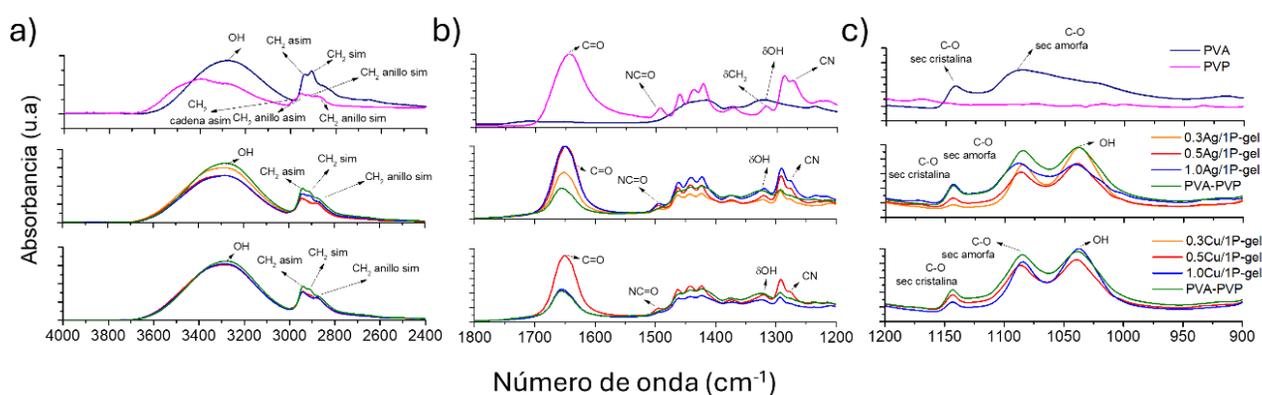


Figura 18. Espectro FT-IR/ATR de los Ag/1P-gel y Cu/1P-gel.

Las bandas anteriores confirmaron la formación de los gels. Además, el aumento de PVA condujo a un aumento en la intensidad de los picos de estiramiento C-N y N-C=O debido a un aumento en la unión física entre las cadenas poliméricas que coordinan las nanopartículas de plata y cobre (sección 4.4.1.2) a partir de una coordinación a través de las moléculas oxigenadas o nitrogenadas de los grupos funcionales de las cadenas PVP y las cadenas de PVA. Además, al comparar los espectros del gel sin nanopartículas con los gels nanoestructurados, se encontró que la banda C=O se desplazó de 1643 a 1651 cm^{-1} . De igual forma, la banda de vibración C-N cambió ligeramente de 1287 a alrededor de 1291 cm^{-1}

(Figura 18.a y Figura 18.b), debido a la coordinación de las NPs por parte de la PVP (Abd El-Kader et al., 2021a; Bryaskova et al., 2011; Khodaei & Karegar, 2021).

Asimismo, la Figura 19a-e muestra los espectros Raman de los Ag/1P-gel con el aumento de PVA. En comparación con los espectros de PVP puro (Figura 19b), el aumento significativo en la señal alrededor de 2926 cm^{-1} (vibración de estiramiento asimétrico de CH_2 en la cadena esquelética de PVP) revela que la cadena de CH_2 está cerca de la superficie de las nanopartículas. Esto último se debe a que las partículas metálicas en contacto con las moléculas orgánicas de la matriz polimérica (que las estabiliza rodeándolas en la superficie) aumentan la señal Raman, generando un fenómeno conocido como efecto SERS (espectroscopia Raman mejorada en superficie) (Mao et al., 2012). De esta forma los picos son más intensos. Además, se evidenció un desplazamiento de los picos hacia números de onda más bajos 2919 y 2911 cm^{-1} con el aumento del contenido de PVA. Estos corrimientos al rojo (números de onda más bajos) significan que la frecuencia de los fotones dispersados disminuyó con respecto al fotón incidente, debido a su interacción con las nanopartículas y las cadenas de PVA. Este efecto también puede atribuirse a la pérdida de fotones que se dispersan de forma inelástica después de interactuar con el material, además de la tensión reticular local debido a la unión a cadenas de PVA y la deformación de la red polimérica por la presencia de NPs) que causa cambios en los picos Raman (Pinto et al., 2010; Wang et al., 2018).

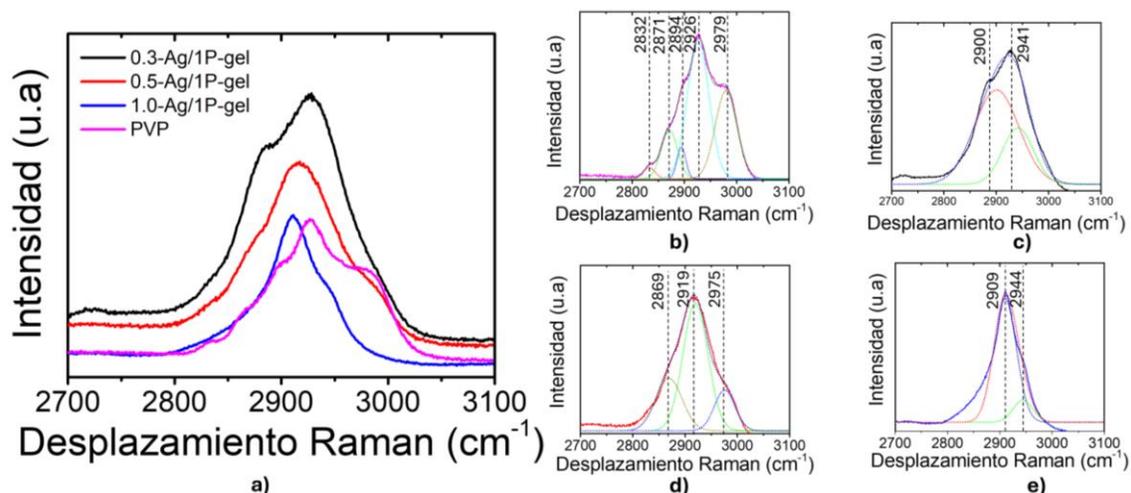


Figura 19. a) Espectros RAMAN para los Ag/1P-gel con el aumento de PVA con respecto a la PVP b) PVP, c) 0.3-Ag/1P-gel, d) 0.5-Ag/1P-gel y e) 1.0-Ag/1P-gel

4.4.1.2 Síntesis de los geles nanoestructurados con CuNPs mediante entrelazamiento en un solo paso con PVP (Cu/1P-gel)

De igual forma que en la sección anterior, la formación de CuNPs dentro de los geles se evidenció mediante el cambio de color de los geles formados desde incoloro a amarillo intenso y marrón oscuro, (Figura 20).

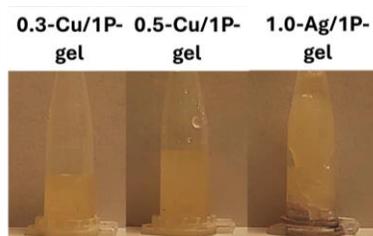


Figura 20. Cu/1P-gel obtenidos con diferente relación molar PVA:PVP

Los perfiles de hinchazón y solubilidad de los Cu/1P-gel también se analizaron durante 0-96 h (Figura 21.a y b). Se encontró un hinchamiento menor en comparación con los Ag/1P-gel con alrededor de 10 g agua/g gel seco y con una solubilidad entre 94-100% a las 24 h (Figura 21.b). El efecto del incremento del PVA en los Cu/1P-gel también se evidenció con una tendencia al aumento de η^* con una diferencia significativa entre los geles con un nivel de

significancia del 5% ($p=0.0143$) como se observa en la Figura 21.c, con valores de 10.96 ± 1.27 Pa.s y 980.58 ± 104.40 Pa.s para 0.5-Cu/1P-gel y 1.0-Cu/1P-gel, respectivamente. Con el aumento de PVA en estos geles los valores de límite elástico fueron similares a los obtenidos para Ag/1P-gel con valores de $6.70E4 \pm 1.21E3$ μ N.m, $1.08E5 \pm 4.97E2$ μ N.m y $3.30E5 \pm 5.33E2$ μ N para las relaciones 0.3, 0.5 y 1.0 PVA:PVP respectivamente (Tabla. 5).

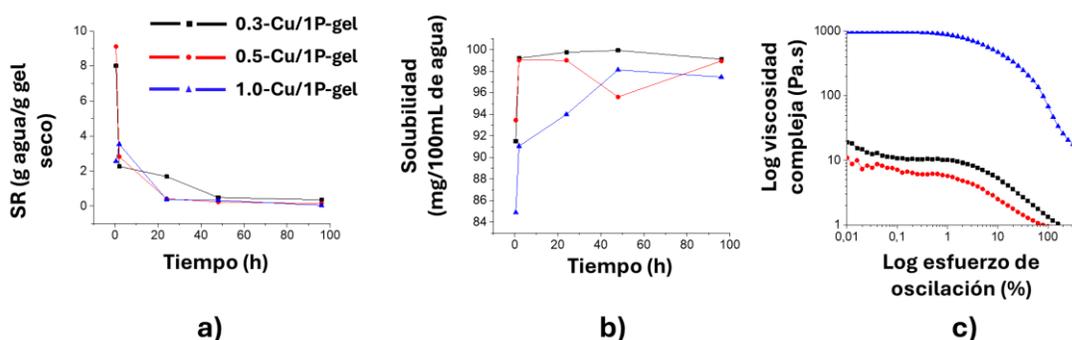


Figura 21. Evaluación de propiedades fisicoquímicas de los 1P-Cu/gel obtenidos con diferente relación molar PVA:PVP, a) Perfiles de hinchazón y b) solubilidad. c) propiedades reológicas.

La formación de partículas nanométricas dentro de la red del gel produjo un marcado efecto sobre la capacidad de movimiento de las cadenas moleculares, dificultando el movimiento y modificando la resistencia al flujo con la aplicación de un esfuerzo, en este caso de corte. Esto explica el aumento de los valores de viscosidad con el aumento del PVA en los geles. Sin embargo, con la aplicación del esfuerzo se evidenció una disminución en la resistencia al corte, debido a la naturaleza de la interacción entre las cadenas poliméricas de ambos polímeros.

Tabla 5. Datos reológicos de geles para los Cu/IP-gel con diferente relación PVA:PVP y consistencia física.

ratio	Consistencia	Propiedades reológicas				
		Viscosidad compleja η^* (Pa.s)	Módulo complejo G^* (Pa)	Módulo de almacenamiento G' (Pa)	Esfuerzo (μ N.m)	Ángulo de fase δ (°)
0.3	Viscoso no sólido	19.12 \pm 13.62	120.13 \pm 85.56	71.03 \pm 107.81	6.70E4 \pm 1.21E3	0.38 \pm 0.02
0.5	Viscoso no sólido	10.96 \pm 9.27	68.86 \pm 58.28	16.91 \pm 21.43	1.08E5 \pm 4.97E2	0.56 \pm 0.16
1.0	Sólido	980.58 \pm 1104.40	6161.19 \pm 939.15	6087.48 \pm 6856.55	3.30E5 \pm 5.33E2	0.73 \pm 0.11

En estudios similares se obtuvieron hidrogeles de PVA/PVP con diferentes contenidos de PVP mediante reticulación covalente asistida por microondas (pero sin nanopartículas) (Y. J. Liu et al., 2016). En este caso, los autores determinaron el efecto de diferentes valores de PVP sobre los hidrogeles. El módulo de almacenamiento de los hidrogeles varió en magnitud de 10^6 a 10^7 con valores de PVP crecientes en todo el rango de frecuencia y rango de temperatura.

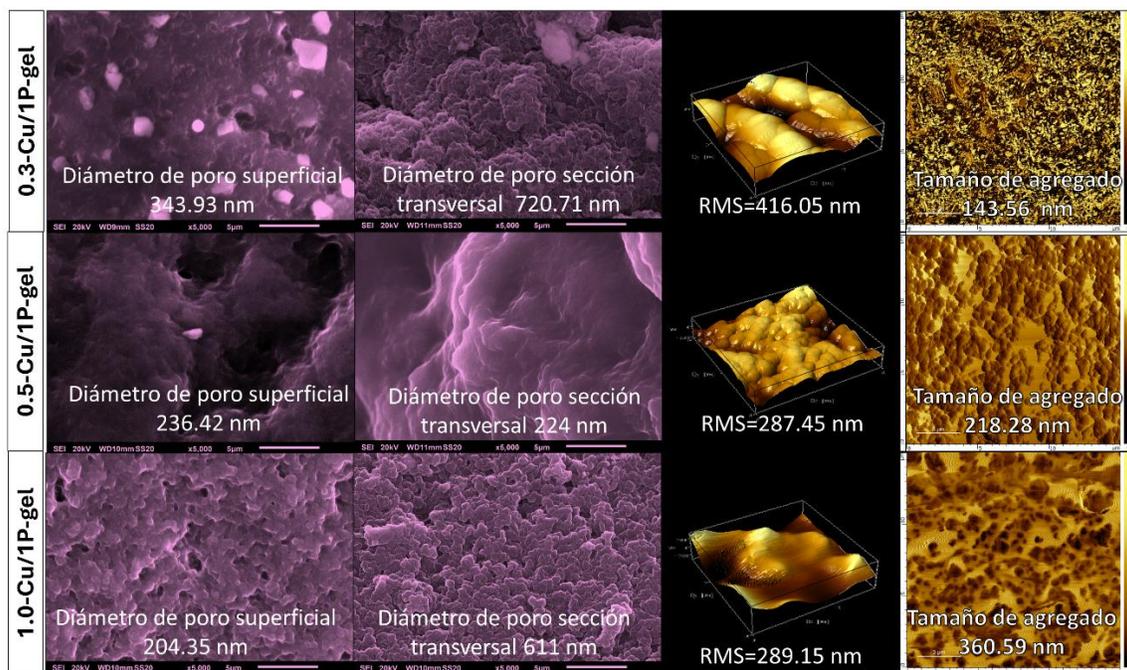


Figura 22. Micrografías SEM e imágenes AFM para Cu/IP-gel. Micrografías SEM de la superficie y sección transversal, reconstrucción AFM 3D e imagen de fase original 3x3 µm para 0.3-Cu/IP-gel con contenido de 0.3 PVA, 0.5-Cu/IP-gel con contenido de 0.5 PVA, 1.0-Cu/IP-gel con contenido de 1.0 PVA.

Esto se debe a la formación de densas redes entrecruzadas covalentemente que aseguraron que los hidrogeles tuvieran una respuesta elástica sustancial. Sus altos valores de almacenamiento de energía en comparación con los obtenidos en nuestro estudio confirman que los geles aquí desarrollados no presentan entrecruzamiento covalente y su formación se debe principalmente a interacciones de tipo electrostático. Sin embargo, nuestros geles nanoestructurados presentaron propiedades reológicas similares a geles sin nanoestructurar con enlace covalente.

Las imágenes AFM se muestran en la Figura 22 donde no se evidenciaron diferencias significativas en los tamaños de las nanopartículas de cobre dentro del gel con respecto al aumento de PVA en la matriz. Resultados similares encontraron Oliveira et al., (Oliveira et al., 2014). Sin embargo, si se presentó diferencia significativa entre los valores de rugosidad

media de los geles Cu/IP-gel con diferente contenido de PVA, la cual disminuyó significativamente con el aumento de PVA en el gel en todos los casos ($p < 0.0001$). Las imágenes de la fase AFM en la superficie de los geles mostraron un diámetro promedio de agregado que varió significativamente ($p < 0.0001$). Asimismo, las CuNPs en los geles mostraron agregados de mayor tamaño que los que se formaron con las AgNPs.

Tabla 6. Propiedades superficiales de los Cu/IP-gel con diferentes relaciones PVA:PVP.

	Relación PVA:PVP			Blanco/IP-gel
	0.3	0.5	1.0	1.0
Tamaño de agregado (nm)	143.56 ± 65.52	218.28 ± 158.38	360.59 ± 145.61	-
Tamaño de conglomerado (nm)	749.76 ± 267.97	474.80 ± 145.51	1050.08 ± 375.77	-
Tamaño de partícula (nm)	15.28 ± 3.61	11.99 ± 1.61	10.21 ± 3.76	-
Ángulo de fase AFM (°)	-	-50	-30	-
Rugosidad (Sq)	416.05 ± 49.39	287.45 ± 66.79	289.15 ± 50.83	29.49 ± 10.43
Rugosidad media (Sa)	343.93 ± 39.45	236.42 ± 49.64	204.35 ± 49.66	25.10 ± 5.43
Diámetro de poro superficial (nm)	720.71 ± 463.85	2224.40 ± 933.83	611.63 ± 367.34	-

A través de imágenes AFM, también se pudo evidenciar la formación de conglomerados poliméricos con forma esférica en todos los casos excepto en los geles control (geles sin nanopartículas); por tanto, la formación de estos conglomerados se relacionó directamente con el efecto de las nanopartículas en el gel. Los tamaños de los conglomerados también disminuyeron con el aumento del contenido de PVA en todos los geles con diferencias significativas ($p < 0.05$). Sin embargo, el análisis TEM (Figura 23) mostró las partículas dentro de los conglomerados y no hubo diferencias significativas en los tamaños promedio de partículas con $p < 0.05$ y valores de diámetro de partícula de 15.28 ± 3.61 , 11.99 ± 1.61 y 10.21 ± 3.76 nm para geles de cobre (relación 0.3, 0.5 y 1.0 PVP:PVA respectivamente). Los resultados se resumen en la Tabla 6.

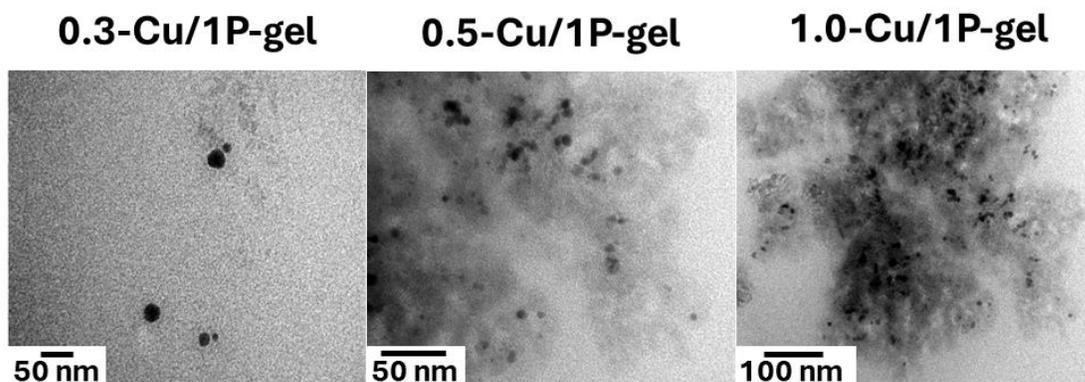


Figura 23. Análisis por Microscopía Electrónica de transmisión (TEM) para para 0.3-Cu/1P-gel con contenido de 0.3 PVA, 0.5-Cu/1P-gel con contenido de 0.5 PVA y 1.0-Cu/1P-gel con contenido de 1.0 PVA.

Tampoco se encontraron diferencias en los espectros FTIR-ATR entre los gels con AgNPs y CuNPs. Al comparar los espectros del gel sin nanopartículas con los gels nanoestructurados, se encontró que la banda C=O se desplazó de 1644 a 1655 cm^{-1} , indicando la coordinación de las CuNPs. Asimismo, los espectros RAMAN en la Figura 24 mostraron un incremento en la señal alrededor de 2926 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento asimétrico del CH_2 en la cadena esquelética de PVP, producido por el efecto SERS.

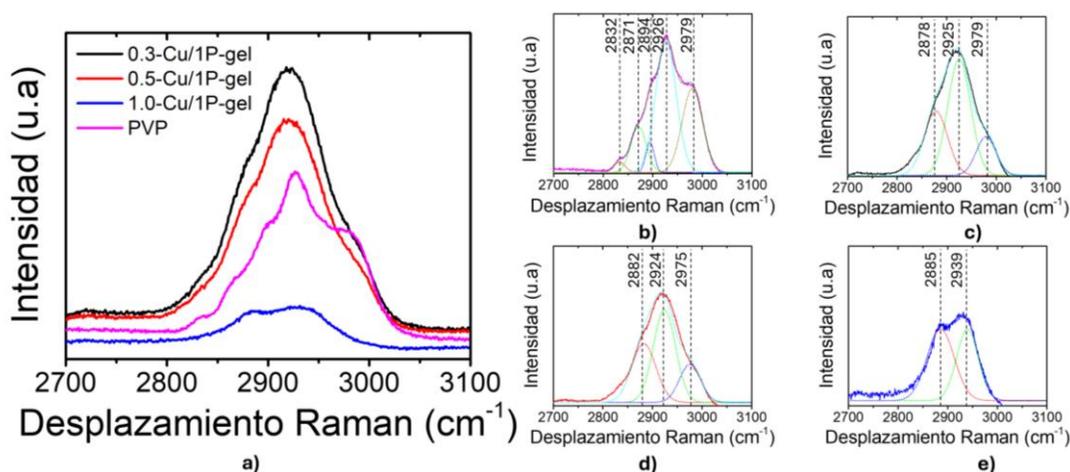


Figura 24. a) Espectros RAMAN para los Cu/1P-gel con el aumento de PVA con respecto a la PVP b) PVP, c) 0.3-Cu/1P-gel, d) 0.5-Cu/1P-gel y e) 1.0-Cu/1P-gel

4.4.2 Síntesis de los geles nanoestructurados con mediante entrelazamiento en dos pasos con PVP (Ag/2P-gel y Cu/2P-gel)

El desarrollo geles mediante calentamiento asistido por microondas en dos pasos mostró grandes diferencias en sus propiedades evaluadas en relación con los obtenidos mediante las metodologías de un solo paso. Se contó con la ventaja de obtener estas nanoestructuras en tiempos de reacción cortos gracias al uso de microondas, con bajo consumo de energía y reactivos (Li et al., 2020). No obstante, la metodología en dos pasos evidenció procedimientos y protocolos de generación de geles más largos y engorrosos en comparación con los geles obtenidos en un solo paso. Al ser uniforme el calentamiento de los sistemas no se encontró diferencia significativa en el tamaño promedio de las partículas en los soles en comparación con los respectivos geles de plata y cobre desarrollados bajo esta metodología. Esto se evidenció mediante la caracterización por UV-vis y TEM de los Ag/2P-gel y Cu/2P-gel pre y post a su proceso de gelificación. Los resultados se presentan en la Figura 25. Se observó una disminución en la intensidad de la señal SPR de los geles luego de ser sometidos al proceso de gelificación en dos pasos con las soluciones de PVA en comparación con los pregeles precursores (Ag/sol y Cu/sol). No obstante, el pico máximo de absorción para los Ag/2P-gel se mantuvo en la misma longitud de onda con respecto al Ag/sol, lo que indicó que no hubo variación significativa en la forma ni tamaño de las nanoestructuras. Esto se corroboró por medio de los análisis TEM (Figura 25.b), en los que se pueden observar las nanopartículas rodeadas por la matriz polimérica con una distribución de partícula de 20.51 ± 7.66 nm. Sin embargo, los Cu/2P-gel presentaron un corrimiento batocrómico hacia una longitud de onda mayor cercana a 300 nm lo que infiere una distribución de tamaño más amplia en comparación con los Cu/sol. La Figura 25.b comprueba este hecho, en la cual se muestra la matriz polimérica que rodea un conglomerado de NPs, con diámetro de partícula

de 48.53 ± 35.26 nm. Con ello se evidenció que el calentamiento en dos pasos incrementó el tamaño de las NPs y la formación de conglomerados más grandes con respecto a los Ag/2P-gel.

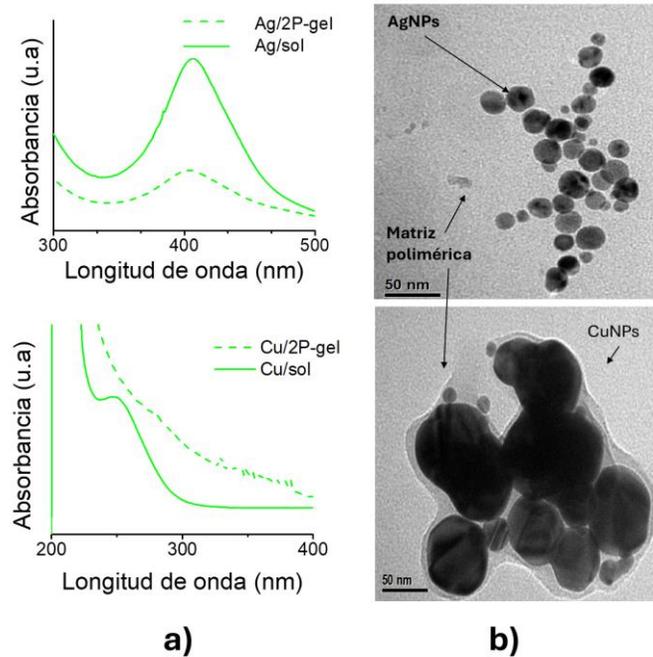


Figura 25. a) Espectro UV-vis y b) Imagen TEM de los Ag/2P-gel y Cu/2P-gel con respecto al Ag/sol y Cu/sol respectivamente.

Por otro lado, en pro de establecer un criterio de selección del gel basado en sus propiedades de viscosidad y consistencia, se evaluó su similitud con materiales comúnmente utilizados en los tratamientos endodónticos, desde irrigantes como el BioAKT, Smear Clear y EDTA (con bajas viscosidades entre 0.001 y 0.002 Pa.s (Giardino et al., 2021)), hasta cementos y selladores comerciales como AH plus, Capseal y Sealapex (con altas viscosidades entre 251 – 523 Pa.s (Chang et al., 2015)), ya que las propiedades reológicas de los materiales de uso endodóntico determinan una buena penetración en los túbulos dentinarios para mejorar la desinfección del sistema de conductos radiculares y fluidez para una disposición adecuada del material desde el recipiente de embalaje en el orificio del diente preparado. De acuerdo

con ello, las propiedades reológicas de los geles mediante gelificación en dos pasos mostraron un compartimiento reológico intermedio entre los irrigantes y selladores comparados. Los datos se resumen en la Tabla 7. Los resultados mostraron que a un corte de 0.01% se encontró una viscosidad 3 veces menor para los Ag/2P-gel con respecto a los Ag/1P-gel bajo la misma relación molar PVA/PVP, y entre 2 a 5 veces menor con respecto a los selladores comerciales, con valores de 106.89 ± 13.49 Pa.s. Asimismo, se observó una η^* 9 veces menor para los geles de cobre obtenidos por dos pasos con respecto a los obtenidos mediante un paso, y entre 4 a 8 veces menor con respecto a los selladores comerciales, con valores de 65.45 ± 29.72 Pa.s. Por su parte, los Ag/sol y Cu/sol precursores de los geles en dos pasos mostraron valores de viscosidad inferiores, con valores de 3.92 ± 1.99 Pa.s y 5.50 ± 3.66 Pa.s respectivamente. Con esto se evidenció un incremento en la viscosidad posterior al segundo paso de calentamiento en microondas, confirmando a las interacciones entre las cadenas poliméricas y la formación de los geles. No obstante, los parámetros de viscosidad de los irrigantes comunes son inferiores con respecto a los soles y geles aquí desarrollados, debido a su naturaleza polimérica. Esto trae consigo diversas ventajas ya que con la formación del gel se mantienen las partículas en contacto con los microorganismos por más tiempo (que en efecto son el principio activo del material), inhibiendo eficazmente su crecimiento y alterando en menor medida los tejidos circundantes.

Además, nuestros soles y geles con valores de viscosidad superiores a los productos comerciales proporcionan la ventaja de fomentar la lubricación de las paredes del conducto radicular. Esto reduce la fricción entre la lima endodóntica y la superficie de la dentina durante el proceso de eliminación de los tejidos orgánicos, y como resultado, se reduce el riesgo de fractura dental.

Tabla 7. Propiedades superficiales y reológicas de los Ag/sol, Cu/sol, Ag/2P-gel y Cu/2P-gel.

	Ag/sol	Cu/sol	Ag/2P-gel	Cu/2P-gel
Tamaño de conglomerado (nm)	-	-	163.29 ± 47.09	233.50 ± 20.82
Tamaño de partícula (nm)	11.65 ± 3.51	10.65 ± 2.31	20.51 ± 7.66	48.53 ± 35.26
Ángulo de fase AFM (°)	-	-	-1	-3
Rugosidad (Sq)	-	-	17.69 ± 3.20	23.27 ± 1.44
Rugosidad media (Sa)	-	-	17.69 ± 3.20	23.27 ± 1.44
Diámetro de poro (µm)	-	-	7.45 ± 2.34	-
Viscosidad η^* (Pa.s)	3.92 ± 1.99	5.50 ± 3.66	106.89 ± 13.49	65.45 ± 29.72
Módulo complejo G^* (Pa)	24.64 ± 12.48	34.56 ± 22.99	671.60 ± 84.77	320.02 ± 288.83
Módulo de almacenamiento G' (Pa)	23.50 ± 12.46	34.14 ± 23.42	670.29 ± 84.78	286.83 ± 58.25
Ángulo de fase δ (°)	0.80 ± 0.15	0.78 ± 0.17	0.81 ± 0.09	0.29 ± 0.09

Por otro lado, mediante las imágenes de AFM y a través de imágenes de AFM en fase, fue posible evidenciar una amplia distribución de tamaños de conglomerado de nanopartículas en la superficie para todas las muestras (Figura 26.a y b). Al comparar los conglomerados obtenidos con la metodología de un solo paso, los geles por dos pasos evidenciaron una forma esférica con tamaños mayores; 163.29 ± 47.09 nm para Ag/2P-gel y 233.50 ± 20.82 nm para Cu/2P-gel respectivamente. Esto se debió principalmente a que la velocidad y eficiencia de los procesos de reducción de iones metálicos y nucleación se ven favorecidas por el calentamiento asistido por microondas directamente sobre la mezcla. La gran cantidad de grupos OH en el PVA aumenta la polarización dieléctrica dentro del mecanismo de acción de las microondas, lo que hace que este polímero ayude como agente reductor y estabilizador de las nanopartículas al mismo tiempo. Así, al estar presente en el momento de la reacción en un solo paso, permitió obtener una menor distribución de tamaño de las nanopartículas y conglomerados. Tras la nucleación, el crecimiento de estos núcleos dio lugar a la formación de conglomerados de nanopartículas y su velocidad de crecimiento dependió en gran medida de la sobresaturación del polímero en la mezcla de reacción al momento de reducir los iones. Además, en el proceso de generación de geles en dos pasos la presencia del PVA posterior a la formación de las nanopartículas representó solamente una contribución a la formación del

gel. Por lo que se generaron conglomerados de mayor tamaño efecto del PVA y PVP rodeando las nanopartículas.

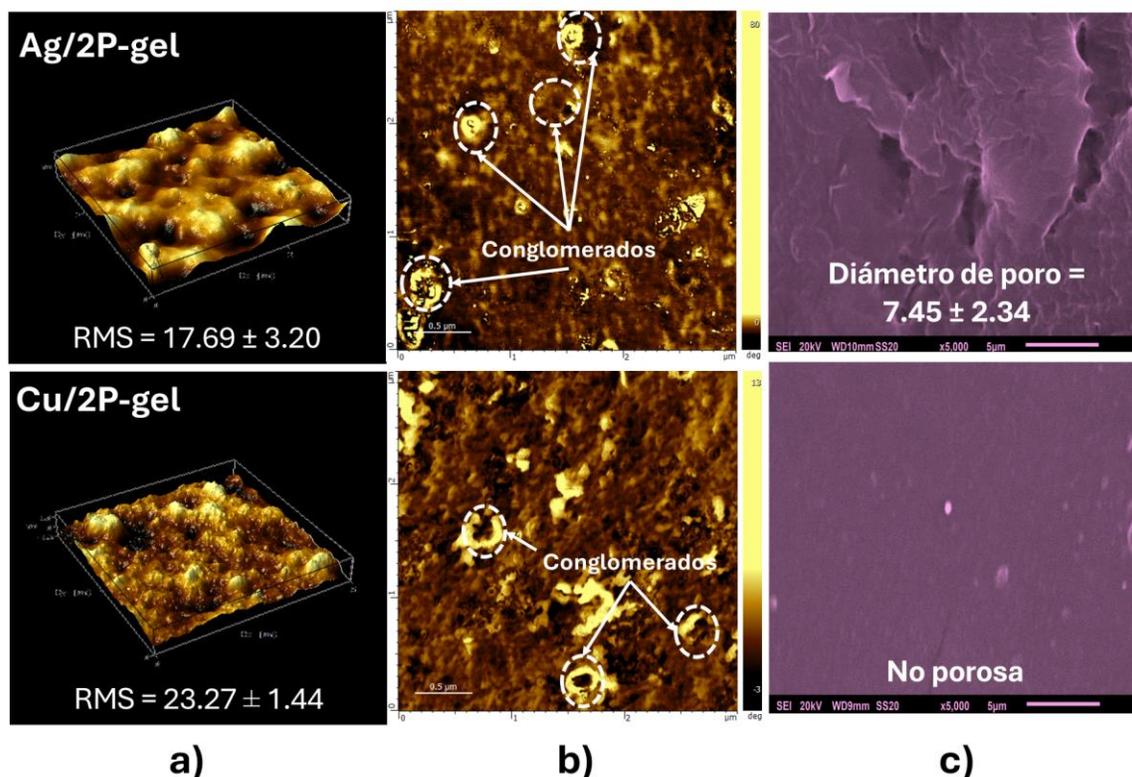


Figura 26. a) Reconstrucción AFM 3D, b) Imagen de fase original $3 \times 3 \mu\text{m}$, y c) Micrografías SEM de la superficie para Ag/2P-gel y Cu/2P-gel.

El efecto de las partículas en la superficie de los geles también se evidenció mediante el análisis de rugosidad. Los valores por triplicado para cada uno de los escaneos se resumen en la Tabla 7. Los Ag/2P-gel mostraron una rugosidad menor de 17.69 ± 3.20 nm con respecto a los Cu/2P-gel con valores de 23.27 ± 1.44 nm. Es necesario resaltar que en ambos casos se encontró valores de rugosidad inferior en comparación con los geles Ag/1P-gel y Cu/1P-gel relacionado principalmente por los mayores tamaños de partícula y conglomerados en los geles de dos pasos. Por otro lado, se examinó la morfología de la superficie de los Ag/2P-gel y Cu/2P-gel con diferentes contenidos de PVA después de la liofilización mediante SEM

(Figura 26.c). Las micrografías SEM mostraron superficies no porosas para los Cu/2P-gel. Mientras que los Ag/2P-gel mostraron una superficie porosa con tamaños de poro de 7.45 ± 2.34 nm.

4.4.3 Estudio biológico de los geles nanoestructurados mediante entrelazamiento en un solo paso con PVP (Ag/1P-gel y Cu/1P-gel)

Estudio antibacteriano in vitro: el estudio antibacteriano se evaluó frente a una cepa clínica endodóntica aislada, la cual se confirmó como *Enterococcus faecalis* con 98% de identificación según el número de acceso NCBI KJ803877.1. Los resultados de ambos ensayos antibacterianos (análisis cualitativo y cuantitativo) mostraron que el aumento de PVA en los geles desarrollados influye significativamente en la respuesta bactericida por contacto. De acuerdo con la Figura 27 se muestra el análisis cualitativo en agar, para ambos tipos de geles con una relación PVA:PVP de 0.3 y 0.5 mostraron proliferación bacteriana sin evidencia de una zona de inhibición. Cabe señalar que, aunque no se han producido halos de inhibición considerables, no significa que los geles no influyan en las células. La explicación más plausible para estos comportamientos está relacionada con la capacidad de liberar iones y difundirlos a través del agar hasta llegar a las células bacterianas. Además, se observaron mayores halos de inhibición para los Ag/1P-gel frente a Cu/1P-gel con valores de 2.0 mm vs 1.0 mm respectivamente. Además, como se evidenció anteriormente, el Ag/1P-gel tiene mayor fluidez frente al Cu/1P-gel y presenta mejor difusión a través del medio de cultivo y liberación continua de NPs e iones, transportándolos a mayor extensión y provocando mayores zonas de inhibición. Abdallah et al., (Abdallah et al., 2020) obtuvieron resultados similares. Además, los geles con una superficie menos rugosa ofrecieron menos adherencia bacteriana en la superficie; lo que significó valores de área de inhibición más grandes para los geles con el mayor contenido de PVA. Sin embargo, se han estudiado los efectos de las

nanopartículas de plata y cobre y existe confusión sobre qué mecanismo de acción ejecutan sobre la célula bacteriana. Se podría decir que atribuir el efecto a un solo mecanismo sería egoísta, sin embargo, se puede considerar un sistema sinérgico en el que participan uno o más de estos mecanismos.

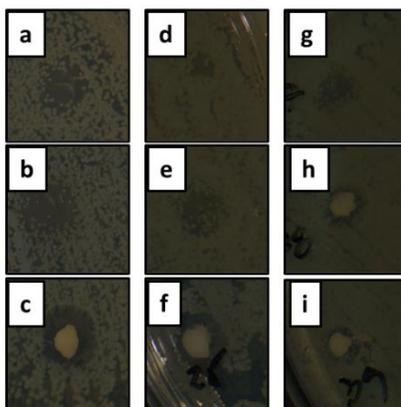


Figura 27. Análisis cualitativo en agar para Ag/1P-gel (a-c), Cu/1P-gel (d-f) y geles blanco (g-i) con diferente relación PVA:PVP respectivamente

De manera similar, las curvas de cinética de muerte (análisis cuantitativo) muestran la actividad bactericida a lo largo del tiempo de los geles. De igual forma, esta evaluación mostró que el aumento de PVA influye significativamente en la respuesta bactericida. El análisis gráfico del crecimiento bacteriano se muestra en la Figura 28a-b, donde es evidente que durante el tiempo 1h (60 min) en todos los casos excepto para Cu/1P-gel con relación PVA:PVP más alta, el crecimiento bacteriano de las colonias en contacto con los geles no mostró un cambio significativo frente al control negativo (crecimiento natural de las células sin geles).

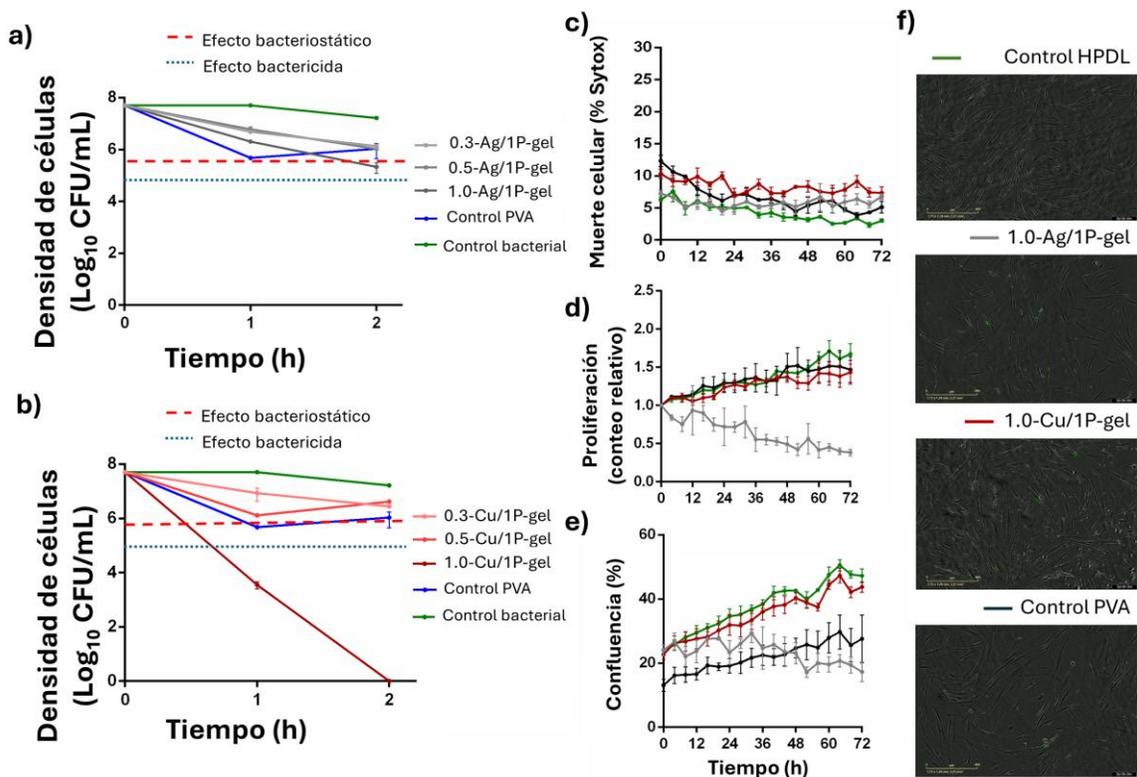


Figura 28. Comportamiento antibacteriano *in vitro* mediante ensayo cuantitativo que evalúa los efectos de la cinética de eliminación del tiempo en dos tiempos de contacto diferentes: a) Ag/1P-gel, b) Cu/1P-gel, con diferente relación PVA:PVP frente a la cepa clínica *E. faecalis* C3. P** 0.0042, P***0.0003, P****<0.0001. Pruebas de viabilidad celular y citotoxicidad mediante c) Muerte celular, d) Proliferación y e) Confluencia, contra células del ligamento periodontal humano (HPDL). f) Imágenes de análisis de células vivas en tiempo real después de 72 h.

Por su parte, los 1.0-Cu/1P-gel si mostraron actividad significativa sobre otros geles ($p < 0.0001$) con un menor crecimiento de colonias y actividad bactericida promedio, mientras que no se presentaron diferencias significativas entre los Ag/1P-gel. Durante 2 h de exposición (Tiempo 2), todos los geles nanoestructurados mostraron una disminución en el crecimiento bacteriano con respecto al control positivo, con diferencias significativas ($p < 0.05$), especialmente los geles más viscosos; para los 1.0-Ag/1P-gel con crecimiento promedio de colonias de 5.29 ± 0.55 UFC/mL el cual muestra un comportamiento

bacteriostático (reducción en el inóculo de $>2 \log_{10}$ a $<3 \log_{10}$) y los 1.0-Cu/1P-gel con los cuales no se observó crecimiento bacteriano clasificándose como material bactericida (como una reducción $\geq 3 \log_{10}$ en el inóculo) según los límites de cuantificación de Souli et al., Rózańska et al., (Rózańska et al., 2018; Souli et al., 2013). Esto demuestra que incluso en menos de un día, los geles pueden liberar nanopartículas y/o iones metálicos en cantidad suficiente para un excelente efecto antibacteriano. Estudios similares también han demostrado que tanto la plata como el cobre tienen una fuerte actividad antibacteriana que inhibe la proliferación bacteriana (Galleguillos Morales, 2016b).

En este estudio, aunque los halos de inhibición para los geles de plata fueron mayores que para los geles de cobre, la cinética de muerte celular mostró el comportamiento opuesto; la liberación de CuONPs en el medio mostró mayor muerte bacteriana con respecto a la liberación de AgNPs. Por lo tanto, el efecto antibacteriano de los geles se puede atribuir a varios factores al igual que en las pruebas de difusión, incluyendo características intrínsecas e individuales de estos materiales en cuestión, donde existe un efecto importante relacionado con las propiedades reológicas de los geles, el tamaño de las nanopartículas, la solubilidad de los geles, la rugosidad, la disponibilidad de partículas en la superficie y su capacidad para liberar iones o NPs, alternativamente (García-Contreras et al., 2011). Esto también demuestra que un estudio cuantitativo en medio líquido proporciona información muy valiosa sobre el efecto de las nanopartículas en contacto con las células bacterianas. Además, se sabe que las partículas metálicas elementales requieren sólo la presencia de moléculas de agua y oxígeno para liberar una pequeña cantidad de iones, condiciones que ocurren fácilmente en ambientes microbianos. Es por eso por lo que la efectividad antibacteriana mejora con un aumento en la cantidad de iones liberados que pueden propagarse e interactuar con los grupos tiol de

muchas enzimas vitales de las bacterias e inactivarlas, previniendo la replicación celular (Ghaffari-Moghaddam & Eslahi, 2014).

Estudio de actividad citotóxica: Durante el experimento, los datos de cada gel se analizaron en diferentes momentos entre 0-72 h ($p < 0.05$, Figura 28.c-f). Al evaluar las imágenes de los 0.3-Ag/1P-gel y 0.5-Ag/1P-gel, se pudo observar que se disolvieron en contacto con el cultivo celular, interfiriendo con el análisis de los datos. Cabe mencionar que esto no significa que las células no proliferaron, sólo que no fue posible cuantificarlas y distinguir las de los trozos de gel. Asimismo, debido a su actividad antibacteriana, se evaluó el efecto citotóxico para dos de los seis geles desarrollados, aquellos con mayor relación PVP/PVA: 1.0-Ag/1P-gel y 1.0-Cu/1P-gel ya que mostraron la mejor actividad antibacteriana. En todos los casos se observó una muerte celular casi instantánea en el tiempo de cero en contacto con los geles. Sin embargo, a lo largo de las 72h de contacto, el porcentaje de muerte celular se estabilizó y no presentó diferencia significativa con el grupo control (células sin geles). En particular, los Cu/1P-gel condujeron a un aumento en la proliferación celular sin diferencias significativas con el grupo de control a las 72 h, donde las células HPDL cocultivadas con ellos mostraron una morfología en forma de huso. A diferencia de los Ag/1P-gel los cuales presentaron mayor toxicidad para las células HPDL, el Cu/1P-gel inhibió el crecimiento celular, aumentó significativamente la muerte celular en tiempo real y mostró una disminución notable en la proliferación y confluencia de las células HPDL con una morfología más pequeña y redonda.

4.4.4 Estudio biológico de los geles nanoestructurados mediante entrelazamiento en uno y dos pasos con PVP (Ag/2P-gel y Cu/2P-gel)

Para la evaluación biológica de los geles obtenidos mediante la metodología en dos pasos, se analizaron los soles precursores, los pregeles y los respectivos geles. Los pregeles

consistieron en las mezclas de los respectivos soles con las soluciones de PVA antes del segundo ciclo de calentamiento.

Tabla. 8. Evaluación de CMI y CMB de los soles y respectivos pregeles.

Muestra	Concentración stock (ppm)	CONDICION	CMI (ppm)	CMB (ppm)
0.10-Ag/sol	10.78	Sol	2.70	5.39
0.08-Ag/sol	8.63	Sol	1.08	2.16
0.05-Ag/sol	5.39	Sol	0.67	2.70
1.0-Ag/2P	5.39	Pregel	2.70	5.39
0.5-Ag/2P	4.31	Pregel	2.70	5.39
0.2-Ag/2P	2.70	Pregel	2.70	5.39
0.10-Cu/sol	10.78	Sol	2.70	5.39
0.08-Cu/sol	8.63	Sol	2.70	5.39
0.05-Cu/sol	5.39	Sol	1.35	2.70
1.0-Cu/2P	5.39	Pregel	2.70	5.39
0.5-Cu/2P	4.31	Pregel	2.70	5.39
0.2-Cu/2P	2.70	Pregel	2.70	5.39

Inicialmente se evaluó los soles y los pregeles mediante la prueba de microdilución en serie. Los resultados mostraron que ambos soles inhibieron significativamente el crecimiento de *E. faecalis* con una CMI de 0.67 ppm y una CMB de 2.70 ppm para los Ag/sol y una CMI de 1.35 ppm y CMB de 2.70 ppm para los Cu/sol, respectivamente.

Al evaluar ambos pregeles se obtuvo que la adición de las soluciones de PVA a los soles ya obtenidos evidenció una disminución en las propiedades antibacterianas de los soles con una CMI y CMB mayor en comparación con los soles sin funcionalizar con el PVA (Ag/sol y Cu/sol), mostrando valores de 2.70 ppm y 5.39 ppm. Los resultados se desglosan en la Tabla. 8. Por este motivo se continuó con una evaluación cuantitativa utilizando los geles desarrollados con la mayor concentración de iones en la matriz polimérica (0.10-Ag/sol y 0.10-Cu/sol).

Además, de acuerdo con las curvas de muerte evaluadas con cada uno de los soles (Figura 29.a-b), se obtuvo que la concentración inicial del cultivo de *E. faecalis* disminuyó desde $6.602 \log_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ a $4.21 \pm 0.07 \log_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$, $4.06 \pm 0.08 \log_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$, por acción

de los 1.0-Ag/sol y 1.0-Cu/sol a 1 hora de exposición mostrando un efecto bacteriostático. A las 2 h de acción, ambos soles mostraron un marcado efecto bactericida con una disminución del inóculo hasta $0.96 \pm 1.66 \log_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ y $0.00 \pm 0.00 \log_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ respectiva para los soles de plata y cobre. Por otro lado, los 0.08-Ag/sol y 0.05-Ag/sol mostraron un efecto bactericida solo a las 2 h de exposición, mientras que los 0.08-Cu/sol y 0.05-Cu/sol mostraron una disminución del 100% de las colonias a las 2 h de acción.

Al igual que lo observado mediante la microdilución en caldo, el efecto de la mezcla con las soluciones de PVA y gelificación en dos pasos mostró una marcada disminución en el efecto antibacteriano de las NPs en los geles, en donde los pregeles y geles de plata mostraron una disminución en el inóculo menor en comparación con los respectivos soles con valores de $3.69 \pm 0.72 \log_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ (para Ag/2P pregel) y $5.48 \pm 0.13 \log_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ (para Ag/2P-gel) a 1 hora de exposición respectivamente sin efecto bacteriostático, ya que la reducción en $\log_{10} \text{ UFC}$ fue de aproximadamente 1 unidad logarítmica, a pesar de presentaron una diferencia significativa ($p=0.0326$) en relación con el control (sin tratamiento). Mientras que a las 2 h de exposición mostraron un efecto bacteriostático con valores de $2.74 \pm 1.41 \log_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ (para Ag/2P pregel) y $3.53 \pm 0.56 \log_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ (para Ag/2P-gel) (Figura 29.c-d).

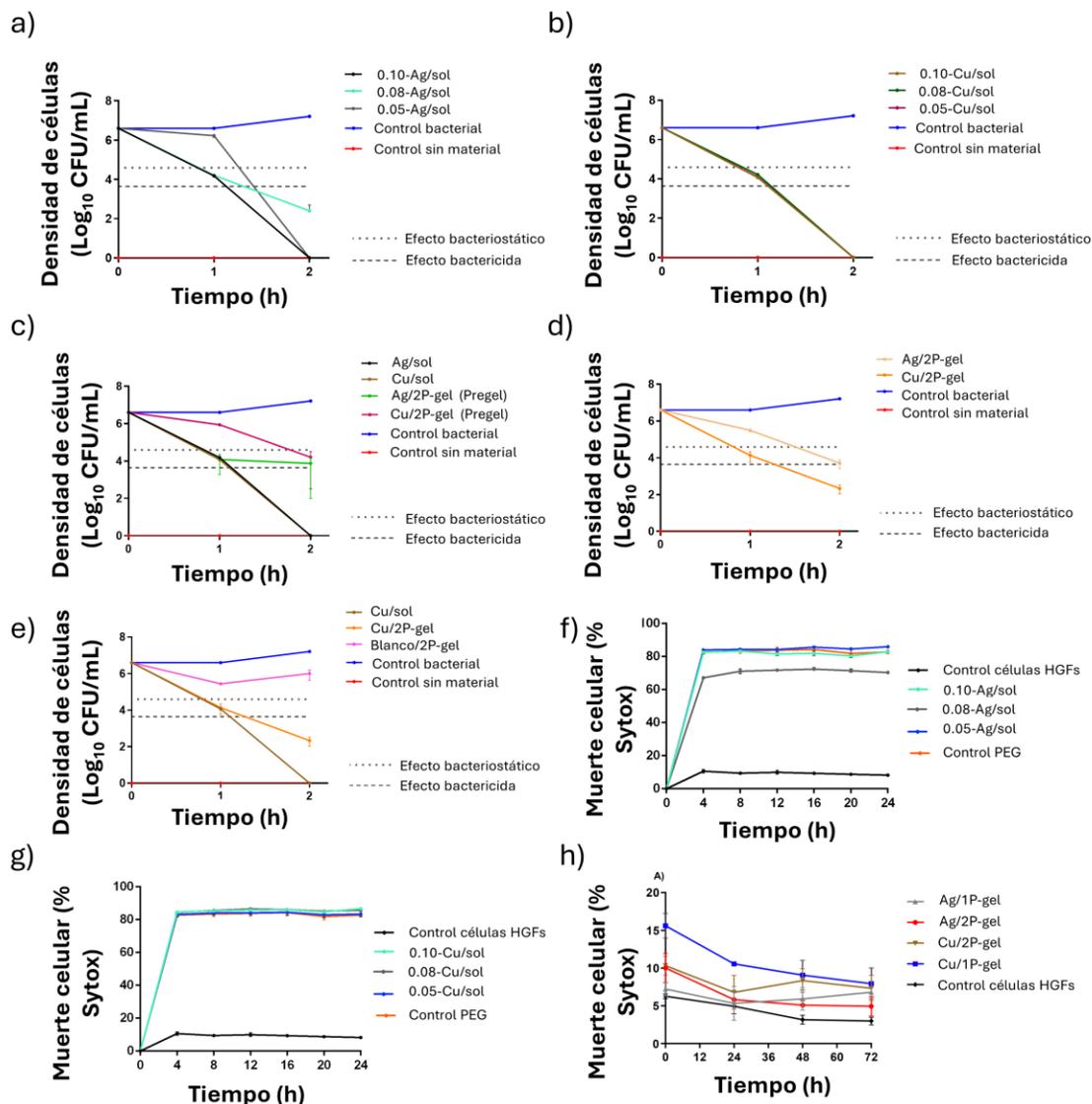


Figura 29. Evaluación biológica de los geles obtenidos mediante la metodología en dos pasos: a) Curvas de muerte evaluadas con Ag/soles a diferentes concentraciones frente al control sin material y control bacterial. b) Curvas de muerte evaluadas con Cu/soles a diferentes concentraciones frente al control sin material y control bacterial, c) Curvas de muerte evaluadas con Ag/2P gel (pregel) y Cu/2P gel (pregel) frente a su respectivo sol Ag/sol y Cu/sol respectivamente, el control sin material y control bacterial, d) Curvas de muerte evaluadas con Ag/2P gel y Cu/2P gel frente al control sin material y control bacterial, e) Curvas de muerte evaluadas con Cu/2P gel frente a su respectivo Cu/sol, el Blanco/2P-gel, el control sin material y control bacterial, f) Efecto de los Ag/sol, g) Cu/sol y h) Ag/2P-gel y Cu/2P-gel frente a las células HGFs en el tiempo (0 h, 24 h, 48 h y 72 h) en comparación con el control sin material y los geles Ag/1P-gel y Cu/1P-gel.

En el caso de los Cu/2P-gel a 1 hora de tratamiento mostraron un efecto bacteriostático ya donde la disminución del inóculo fue aproximadamente en 2 unidades logarítmicas, presentando diferencias significativas con el control y los Ag/2P-gel ($p < 0.05$) con valores de $3.51 \pm 0.20 \log_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$. Al pasar 2 h se observaron cambios en el recuento bacteriano en donde los geles presentaron una disminución mayor a 3 unidades logarítmicas con valores de $1.67 \pm 1.45 \log_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$. Mientras que los pregeles solo mostraron efecto bacteriostático a las 2 h de evaluación. Esto se puede deber al efecto antibacteriano del PVA con el cual solo se disminuye el inóculo bacteriano en 1 hora de exposición con valores de $5.43 \pm 0.11 \log_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ (Figura 29.d-e). El efecto del PVA se observa en menor medida mientras que las partículas son liberadas al medio y ejercen efecto bactericida a las 2 h en ambos geles. Cabe destacar que, aunque ambos soles presentaron alta actividad antibacteriana, los Cu/2P-gel también provocaron una disminución considerable del recuento bacteriano en el tiempo, mayor en comparación con Ag/2P-gel ($p < 0.0001$ y $p = 0.0002$), con un efecto bactericida.

La evaluación de los Blanco/2P-gel frente a las colonias bacterianas no presentó actividad antibacteriana con lo cual se atribuye el efecto directamente a la presencia de las NPs en los geles, principalmente en los geles Cu/2P-gel en los cuales se observaron diferencias significativas al comparar la actividad con blanco ($p < 0.0001$), en comparación con los Blanco/1P-gel los cuales si mostraron un efecto bacteriostático inhibiendo significativamente las colonias bacterianas. Este efecto puede ser atribuido a las altas concentraciones de PVA utilizado, el cual se ha demostrado que también posee una actividad antibacteriana (Ghosh et al., 2022).

Por otro lado, la biocompatibilidad de los soles y los respectivos geles evaluados en las células HGFs en el tiempo (0 h, 24 h, 48 h y 72 h) en comparación con el control sin material,

se muestran de la Figura 29.f-h. Los porcentajes de muerte para el control sin material fueron del $6.3\% \pm 0.3$ a 0 h, $4.9\% \pm 1.0$ a 24 h, $3.2\% \pm 0.6$ a 48 h y $3.0\% \pm 0.5$ a 72 h. Se obtuvo una alta disminución de las células HGFs entre un 60 y 80% para los Ag/sol y Cu-sol Figura 29.f-g. A diferencia de los geles en un solo paso en los cuales el porcentaje de células muertas aumentó significativamente en el tiempo, los Ag/2P-gel inicialmente presentaron un mayor porcentaje de células muertas en relación con los controles ($10.0\% \pm 2.0$ a 0 h, $p=0.007$), sin embargo, estos valores disminuyeron en el tiempo sin diferencias significativas con el control ($5.8\% \pm 0.1$ a 24 h ($p=0.851$), $5.1\% \pm 0.7$ a 48 h ($p=0.278$), y $4.9\% \pm 1.3$ a 72 h ($p=0.270$). Mientras que los Cu/2P-gel al igual que los Cu/1P-gel, presentaron mayor porcentaje de células muertas en relación con el control ($15.6\% \pm 1.6$ a 0 h, $10.6\% \pm 0.2$ a 24 h, $9.1\% \pm 2.0$ a 48 h y $7.9\% \pm 2.1$ a 72 h con $p<0.05$). Sin embargo, tanto los geles en un solo paso como los geles en dos pasos mostraron muerte celular 60 veces menos en comparación con los respectivos soles. Aunque se ha reportado ampliamente el uso de NPs como posible alternativa de desinfección en endodoncia, estas han sido no funcionalizadas, es decir sin el uso de matrices poliméricas biocompatibles. Con nuestra investigación, se demostró que el proceso de obtención de geles nanoestructurados proporciona mejoras en las propiedades de las NPs, ya que se disminuye altamente su toxicidad al utilizar polímeros inocuos y biocompatibles, no se altera el tamaño de partícula y sus propiedades antibacterianas son comparables con respecto a los materiales que se usan actualmente en los procesos endodónticos.

Al comparar las propiedades de los geles en un solo paso y dos pasos, se determinaron algunos criterios para la selección de los geles para la siguiente etapa de evaluación con la biopelícula multiespecie, como por ejemplo la consistencia del gel, la actividad antibacteriana y el efecto citotóxico. Se seleccionaron los Ag/2P-gel ya que si presentaron un

marcado efecto bacteriostático y su citotoxicidad fue menor en comparación con los Ag/1P-gel con una muerte celular inferior al 5%. Mientras que los Cu/2P-gel se eligieron debido a que a pesar de que su efecto antibacteriano no disminuyó el 100% de las colonias como lo hizo los Cu/1P-gel, la actividad citotóxica de los geles de cobre en dos pasos fue evidentemente menor con una disminución de las células HGFs de alrededor de 10% (Figura 29.h).

Estudio antibacteriano ex vivo: los resultados de la actividad antibacteriana a distintos tiempos de acción utilizando el modelo de película multiespecie se muestran en la Figura 30, en la cual se observan los porcentajes de volumen de biomasa de células muertas y su variación en el tiempo. Ambos geles presentaron un aumento en el porcentaje de volumen de biomasa de células muertas en el tiempo, con un aumento cercano al 73% y 85%, respectivamente a las 168 h de uso, presentando diferencias significativas a medida que aumentó el tiempo de aplicación. Al comparar los tiempos de acción entre 1h y 24 h no hubo diferencias significativas en los porcentajes de ambos geles con $p=0.502$ y $p=0.912$. Sin embargo, Cu/2P-gel mostró un porcentaje de muerte celular de $25.7\% \pm 9.4$ y $84.5\% \pm 7.7$, respectivamente a 1 h y a 168 h, por su parte Ag/2P-gel mostró valores de $26.7\% \pm 4.5$ y $73.3\% \pm 18.9$, respectivamente, presentando diferencias significativas entre ellos con $p<0.0001$. Al comparar el cambio de volúmenes de biomasa de células vivas y muertas producidos luego de la acción de los geles y controles por 1 h y 168 h en contacto con la biopelícula multiespecie madura, se observó que los Cu/2P-gel a 1 h y a 168 h de acción presentaron menor volumen de biomasa de células vivas en comparación con el control ($p=0.014$). Asimismo, al comparar la acción de los Cu/2P-gel con el NaOCl, no se presentan diferencias en el volumen de biomasa de células vivas, resultado que no ocurre con el control $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a las 168 h de acción, donde los geles de cobre presentan mayor volumen. Esto

indica que las propiedades antibacterianas de los Cu/2P-gel son comparables con las obtenidas bajo el tratamiento con NaOCl.

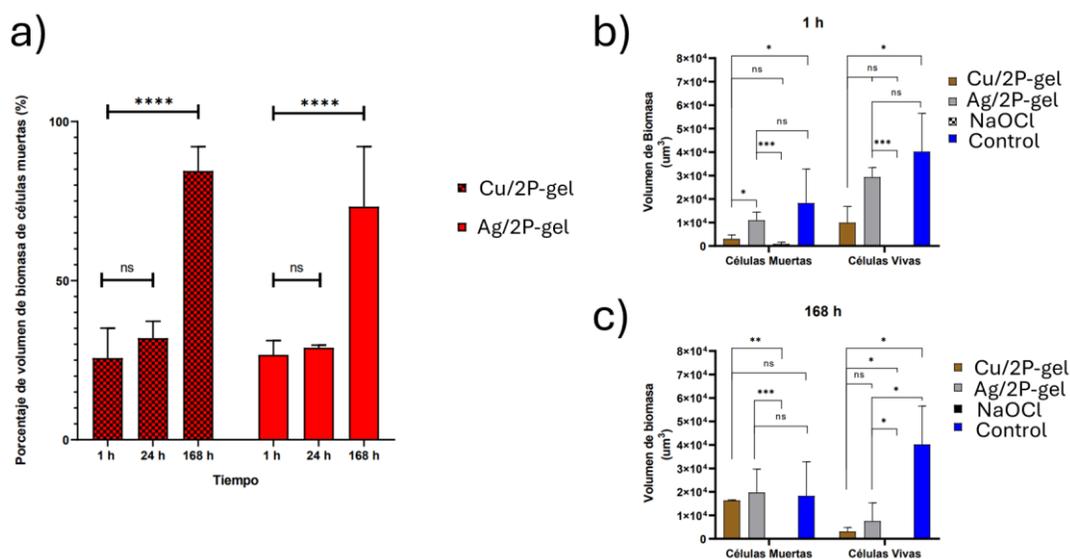


Figura 30. Actividad antibacteriana a distintos tiempos de acción utilizando el modelo de película multiespecie:

a) Porcentaje del volumen de biomasa de células muertas de biopelícula multiespecie madura frente a Ag/2P-gel y Cu/2P-gel a 1 h, 24 h y 168 h de acción. b) Volúmenes de biomasa de células vivas y muertas de biopelículas multiespecie madura en contacto con Ag/2P-gel y Cu/2P-gel a 1 h y c) 168 h.

En relación con Ag/2P-gel a 168 h de acción no presentaron diferencias significativas al compararlos con el efecto de los Cu/2P-gel ($p=0.775$). En comparación con el control de células bacterianas (biopelícula sin tratamiento) a 1 h no se presentaron diferencias significativas con un $p=0.54$, indicando que no hubo efecto antibacteriano hasta dicho tiempo de evaluación. No obstante, a las 168 h de acción los Ag/2P-gel presentaron menor volumen de células en comparación con el control con un $p=0.045$. Asimismo, presentaron mayor volumen de biomasa de células vivas frente al control NaOCl ($p=0.0008$).

No existen estudios que analicen actividad antibacteriana de matrices poliméricas de PVA/PVP con base a soles metálicos frente a una biopelículas bacterianas multiespecie

endodóntica, sin embargo, hay resultados de AgNPs frente a biopelículas endodónticas monoespecies (Hu et al., 2019) y CuNPs utilizando biopelículas bacterianas endodónticas multiespecie, con resultados positivos y comparables con los obtenidos en nuestro estudio con un modelo de biopelícula multiespecie madura (Rojas et al., 2021). Además, las evaluaciones realizadas con AgNPs recubiertas solamente con PVA frente a frente a biopelículas de 48 h de *E. faecalis*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*, mediante ensayo de tinción cristal violeta y su cuantificación mediante absorbancia, han mostrado que NaOCl presenta mayor reducción de la biomasa de biopelícula en los 3 microorganismos tanto a los 3 como a los 5 minutos de aplicación (Rojas et al., 2021). Los resultados obtenidos en nuestra investigación, demuestran que el uso de los geles obtenidos en dos pasos presentan mayor o similar actividad con respecto a los controles NaOCl y Ca(OH)₂.

Conclusiones

En este estudio se desarrollaron hidrosoles, soles y geles nanoestructurados con AgNPs y CuONPs mediante diversas estrategias de síntesis en uno y dos pasos, logrando sistemas que permiten un adecuado equilibrio entre la actividad antibacteriana y citotóxica que se genera al utilizar los tratamientos de endodoncia convencionales o en su defecto sistemas de NPs sin funcionalizar. En el proceso de obtención de los geles nanoestructurados en un solo paso se llevó a cabo la reducción de iones metálicos de plata y cobre para formar NPs *in situ* dentro de la matriz polimérica de PEG/PVP/PVA mediante el calentamiento asistido por microondas, sin necesidad de utilizar agentes externos que comprometan las propiedades biocompatibles de los geles y en periodos cortos de tiempo en comparación con los métodos de calentamiento tradicionales donde la eficiencia de la reacción depende del gradiente de energía aplicado. El proceso en dos pasos utilizando como base los Ag/soles y Cu/soles funcionalizados con soluciones de PVA permitió obtener geles con consistencia y viscosidad similares a los materiales utilizados en los tratamientos de endodoncia. Además, después de 2 h de tratamiento *in vitro*, estos geles mostraron una biocompatibilidad mejorada debido a la participación de cadenas de PVA y el enlace no covalente con PVP sin entrecruzadores adicionales, lo que permitió el libre movimiento y la dosificación gradual de las partículas metálicas en el medio, durante y después de la disolución del polímero. Este compartimento ofreció una gran ventaja ya que se mantuvo la actividad bactericida de los geles manteniendo la citotoxicidad controlada.

No obstante, aunque la biocompatibilidad de los Cu/2P-gel fue mejor que la de los Ag/2P-gel, ambos resaltan la proliferación celular en tiempo real y presentan propiedades antibacterianas en con efecto bactericida a las 2 h de evaluación frente a cepas de *E. faecalis*.

Además, el utilizar polímeros como PVA y PVP como matriz polimérica ofrecieron además de soporte a las nanoestructuras, ventajas como biocompatibilidad y biodegradabilidad. Características necesarias en un material para aplicaciones biomédicas.

Referencias

- Abd El-Kader, M. F. H., Elabbasy, M. T., Ahmed, M. K., & Menazea, A. A. (2021a). Structural, morphological features, and antibacterial behavior of PVA/PVP polymeric blends doped with silver nanoparticles via pulsed laser ablation. *Journal of Materials Research and Technology*, *13*, 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.04.055>
- Abd El-Kader, M. F. H., Elabbasy, M. T., Ahmed, M. K., & Menazea, A. A. (2021b). Structural, morphological features, and antibacterial behavior of PVA/PVP polymeric blends doped with silver nanoparticles via pulsed laser ablation. *Journal of Materials Research and Technology*, *13*, 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.04.055>
- Abdallah, O. M., EL-Baghdady, K. Z., Khalil, M. M. H., El Borhamy, M. I., & Meligi, G. A. (2020). Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of biogenic polyvinyl alcohol-silver and chitosan-silver nanocomposites. *Journal of Polymer Research*, *27*(3), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10965-020-02050-3>
- Abramovitz, I., Beyth, N., Paz, Y., Weiss, E. I., & Matalon, S. (2013). Antibacterial temporary restorative materials incorporating polyethyleneimine nanoparticles. *Quintessence International (Berlin, Germany : 1985)*, *44*(3), 209–20916. <https://doi.org/10.3290/j.qi.a29056>
- Acosta-Torres, L. S., Mendieta, I., Nuñez-Anita, R. E., Cajero-Juárez, M., & Castaño, V. M. (2012). Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *International Journal of Nanomedicine*, *7*, 4777–4786. <https://doi.org/10.2147/IJN.S32391>
- Aksel, H., Mahjour, F., Bosaid, F., Calamak, S., & Azim, A. A. (2020a). Antimicrobial Activity and Biocompatibility of Antibiotic-Loaded Chitosan Hydrogels as a Potential

- Scaffold in Regenerative Endodontic Treatment. *Journal of Endodontics*, 46(12), 1867–1875. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.09.007>
- Aksel, H., Mahjour, F., Bosaid, F., Calamak, S., & Azim, A. A. (2020b). Antimicrobial Activity and Biocompatibility of Antibiotic-Loaded Chitosan Hydrogels as a Potential Scaffold in Regenerative Endodontic Treatment. *Journal of Endodontics*, 46(12), 1867–1875. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.09.007>
- Althumairy, R. I., Teixeira, F. B., & Diogenes, A. (2014). Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *Journal of Endodontics*, 40(4), 521–525. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.11.008>
- Anggraeni, S. D., & Kurniawan, F. (2020). Synthesis of Aluminium Nanoparticles Using Electrochemical Method. *Journal of Physics: Conference Series*, 1445(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1445/1/012013>
- Anu, K., F, M. B. S., Rajesh, G., & P, R. D. K. (2016). *Wet Biochemical Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles Coated on Titanium Dental Implants*. 3(1), 1191–1194.
- Bapat, R. A., Joshi, C. P., Bapat, P., Chaubal, T. V., Pandurangappa, R., Jnanendrappa, N., Gorain, B., Khurana, S., & Kesharwani, P. (2019a). The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. *Drug Discovery Today*, 24(1), 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.08.012>
- Bapat, R. A., Joshi, C. P., Bapat, P., Chaubal, T. V., Pandurangappa, R., Jnanendrappa, N., Gorain, B., Khurana, S., & Kesharwani, P. (2019b). The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. *Drug Discovery Today*, 24(1), 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.08.012>
- Barquero, L., & Rodríguez, E. (2005). Efecto antibacteriano in vitro del hidróxido de calcio. *Odovtos - International Journal of Dental Sciences*, 7, 77–80.

- Blandón, L., Vázquez, M. V., Boannini, E., & Ballarin, B. (2015). Electrochemical synthesis of silver nanoparticles in presence of non-charge surfactant. *Afinidad*, 72(569), 48–52.
- Bleuel, K., Gehrke, P., & Fischer, C. (2018). Influence of margin location and luting material on the amount of undetected cement excess on CAD CAM implant abutments and cement-retained zirconia crowns. *Clinical Oral Implants Research*, 29, 333–333. https://doi.org/10.1111/clr.218_13358
- Bose, R., Nummikoski, P., & Hargreaves, K. (2009). A Retrospective Evaluation of Radiographic Outcomes in Immature Teeth With Necrotic Root Canal Systems Treated With Regenerative Endodontic Procedures. *Journal of Endodontics*, 35(10), 1343–1349. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.06.021>
- Boughbina-Portolés, A., Sanjuan-Navarro, L., Moliner-Martínez, Y., & Campíns-Falcó, P. (2021). Study of the stability of citrate capped agnps in several environmental water matrices by asymmetrical flow field flow fractionation. *Nanomaterials*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/nano11040926>
- Bruniera, J. F. B., Silva-Sousa, Y. T. C., Lara, M. G., Pitondo-Silva, A., Marcaccini, A. M., & Miranda, C. E. S. (2014). Development of intracanal formulation containing silver nanoparticles. *Brazilian Dental Journal*, 25(4), 302–306. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302431>
- Bryaskova, R., Pencheva, D., Nikolov, S., & Kantardjiev, T. (2011). Synthesis and comparative study on the antimicrobial activity of hybrid materials based on silver nanoparticles (AgNps) stabilized by polyvinylpyrrolidone (PVP). *Journal of Chemical Biology*, 4(4), 185–191. <https://doi.org/10.1007/s12154-011-0063-9>
- Bueno, C. R. E., Vasques, A. M. V., Cury, M. T. S., Sivieri-Araújo, G., Jacinto, R. C., Gomes-Filho, J. E., Cintra, L. T. A., & Dezan-Júnior, E. (2019). Biocompatibility and

- biomineralization assessment of mineral trioxide aggregate flow. *Clinical Oral Investigations*, 23(1), 169–177. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2423-0>
- Cantín L, M., Vilos O, C., & Suazo G, I. (2010). Nanodontología: el Futuro de la Odontología Basada en Sistemas Nanotecnológicos. *International Journal of Odontostomatology*, 4(2), 127–132. <https://doi.org/10.4067/s0718-381x2010000200005>
- Cardoso, P. (2016). Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Rev. Hosp. Niños (B. Aires)*, 58(260), 19–28. <http://revistapediatria.com.ar/wp-content/uploads/2016/04/260-Nanopartículas-de-plata.pdf>
- Cardoso Pereira, A., Herrera Morante, D. R., Correia Laurindo de Cerqueira Neto, A. C., Nagata, J. Y., Rocha Lima, T. F., & Soares, A. de J. (2017). Alternativas clínicas para el tratamiento de dientes traumatizados con rizogénesis incompleta: una visión actualizada. *Revista Estomatológica Herediana*, 26(4), 271. <https://doi.org/10.20453/reh.v26i4.3034>
- Carhuapoma-Bernabé, W., & Contreras, J. S. (2005). Caracterización de hidrogeles de quitosano-alcohol polivinílico obtenidos por radiación gamma. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 6(4), 333–346.
- Chang, S. W., Lee, Y. K., Zhu, Q., Shon, W. J., Lee, W. C., Kum, K. Y., Baek, S. H., Lee, I. B., Lim, B. S., & Bae, K. S. (2015). Comparison of the rheological properties of four root canal sealers. *International Journal of Oral Science*, 7, 56–61. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.33>
- Dasilva, L., Finer, Y., Friedman, S., Basrani, B., & Kishen, A. (2013). Biofilm formation within the interface of bovine root dentin treated with conjugated chitosan and sealer

containing chitosan nanoparticles. *Journal of Endodontics*, 39(2), 249–253.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.008>

Dhir, S. (2013). Biofilm and dental implant: The microbial link. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17(1), 5–11. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.107466>

Duran, A. (2015a). *Validación de la capacidad bactericida de aditivos basados en nanopartículas de cobre y plata para pinturas antivegetativas Tesis.*

Duran, A. (2015b). *Validación de la capacidad bactericida de aditivos basados en nanopartículas de cobre y plata para pinturas antivegetativas Tesis.*

Echeverri, C. E., Vallejo, C., & Londoño, M. E. (2009). Synthesis and Characterization of Polyvinyl Alcohol Hydrogels By Freezing/Thawing Technique for Medical Applications. *Revista EIA*, 12, 59–66.

Eisa, W. H., Abdel-Baset, T. A., Mohamed, E. M. A., & Mahrous, S. (2017). Crosslinked PVA/PVP Supported Silver Nanoparticles: A Reusable and Efficient Heterogeneous Catalyst for the 4-Nitrophenol Degradation. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 27(6), 1703–1711. <https://doi.org/10.1007/s10904-017-0632-7>

Espinosa-Cristóbal, L. F., Martínez-Castanon, G. A., Téllez-Déctor, E. J., Niño-Martínez, N., Zavala-Alonso, N. V., & Loyola-Rodríguez, J. P. (2013a). Adherence inhibition of *Streptococcus mutans* on dental enamel surface using silver nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 33(4), 2197–2202.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.039>

Espinosa-Cristóbal, L. F., Martínez-Castanon, G. A., Téllez-Déctor, E. J., Niño-Martínez, N., Zavala-Alonso, N. V., & Loyola-Rodríguez, J. P. (2013b). Adherence inhibition of *Streptococcus mutans* on dental enamel surface using silver nanoparticles. *Materials*

Science and Engineering C, 33(4), 2197–2202.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.039>

Fabricius, L., Dahlén, G., Sundqvist, G., Happonen, R. P., & Möller, A. J. R. (2006). Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *European Journal of Oral Sciences*, 114(4), 278–285. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2006.00380.x>

Febré, N., Silva, V., Báez, A., Palza, H., Delgado, K., Aburto, I., & Silva, V. (2016). Antibacterial activity of copper salts against microorganisms isolated from chronic infected wounds. *Revista Médica de Chile*, 144(12), 1523–1530. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872016001200003>

Galleguillos Morales, C. A. (2016a). *Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de nanopartículas de cobre frente a Enterococcus faecalis*.

Galleguillos Morales, C. A. (2016b). *Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de nanopartículas de cobre frente a Enterococcus faecalis*. <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/142358/Evaluación-de-la-actividad-antibacteriana-in-vitro-de-nanopartículas-de-cobre-frente-a-Enterococcus-faecalis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Gallo-Cordova, Á., Espinosa, A., Serrano, A., Gutiérrez, L., Menéndez, N., Del Puerto Morales, M., & Mazarió, E. (2020). New insights into the structural analysis of maghemite and (MFe₂O₄, M = Co, Zn) ferrite nanoparticles synthesized by a microwave-assisted polyol process. *Materials Chemistry Frontiers*, 4(10), 3063–3073. <https://doi.org/10.1039/d0qm00460j>

García-Contreras, R., Argueta-Figueroa, L., Mejía-Rubalcava, C., Jiménez-Martínez, R., Cuevas-Guajardo, S., Sánchez-Reyna, P. A., & Mendieta-Zeron, H. (2011). Perspectives

- for the use of silver nanoparticles in dental practice. *International Dental Journal*, 61(6), 297–301. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2011.00072.x>
- García-Rubio, A., Bujaldón-Daza, A. L., & Rodríguez-Archilla, A. (2015). Periapical lesions. Diagnosis and treatment | Lesiones periapicales. Diagnóstico y tratamiento. *Avances En Odontoestomatología*, 31(1).
- Ghaffari-Moghaddam, M., & Eslahi, H. (2014). Synthesis, characterization and antibacterial properties of a novel nanocomposite based on polyaniline/polyvinyl alcohol/Ag. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(5), 846–855. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.11.011>
- Giardino, L., Pedullà, E., Cavani, F., Bisciotti, F., Giannetti, L., Checchi, V., Angerame, D., Consolo, U., & Generali, L. (2021). Comparative evaluation of the penetration depth into dentinal tubules of three endodontic irrigants. *Materials*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/ma14195853>
- Guo, Y., Li, X., Fang, Y., & Guo, Y. J. (1998). Effect of EEO in agarose electrophoresis The effects of electroendosmosis in agarose electrophoresis. In *Electrophoresis* (Vol. 19).
- Hamouda, I. M. (2012). Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *Journal of Biomedical Research*, 26(3), 143–151. <https://doi.org/10.7555/JBR.26.20120027>
- Hassan, R., & Khallaf, M. (2018). Effect of a silver nanoparticle intracanal-based medicament on the microhardness of human radicular dentine. *Endo-Endodontic Practice Today*, 12(2), 125–131.
- Hiraishi, N., Yiu, C. K. Y., King, N. M., Tagami, J., & Tay, F. R. (2010). Antimicrobial efficacy of 3.8% silver diamine fluoride and its effect on root dentin. *Journal of Endodontics*, 36(6), 1026–1029. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.02.029>

- Horikoshi, S., & Serpone, N. (2017). 14. Microwave-assisted synthesis of nanoparticles. *Microwave Chemistry*, 248–269. <https://doi.org/10.1515/9783110479935-014>
- Hu, C., Wang, L. L., Lin, Y. Q., Liang, H. M., Zhou, S. Y., Zheng, F., Feng, X. L., Rui, Y. Y., & Shao, L. Q. (2019). Nanoparticles for the Treatment of Oral Biofilms: Current State, Mechanisms, Influencing Factors, and Prospects. In *Advanced Healthcare Materials* (Vol. 8, Issue 24). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901301>
- Huang, M., Hou, Y., Li, Y., Wang, D., & Zhang, L. (2017). High performances of dual network PVA hydrogel modified by PVP using borax as the structure-forming accelerator. *Designed Monomers and Polymers*, 20(1), 505–513. <https://doi.org/10.1080/15685551.2017.1382433>
- Islam, F., Shohag, S., Uddin, M. J., Islam, M. R., Nafady, M. H., Akter, A., Mitra, S., Roy, A., Bin Emran, T., & Cavalu, S. (2022). Exploring the Journey of Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO-NPs) toward Biomedical Applications. In *Materials* (Vol. 15, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ma15062160>
- Jaramillo, A. F., Riquelme, S. A., Sánchez-Sanhueza, G., Medina, C., Solís-Pomar, F., Rojas, D., Montalba, C., Melendrez, M. F., & Pérez-Tijerina, E. (2019). Comparative Study of the Antimicrobial Effect of Nanocomposites and Composite Based on Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Using Cu and Cu/Cu₂O Nanoparticles and CuSO₄. *Nanoscale Research Letters*, 14. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-2987-x>
- Jipa, I. M., Stoica, A., Stroescu, M., Dobre, L. M., Dobre, T., Jinga, S., & Tardei, C. (2012). Potassium sorbate release from poly(vinyl alcohol)-bacterial cellulose films. *Chemical Papers*, 66(2), 138–143. <https://doi.org/10.2478/s11696-011-0068-4>

- Khaydarov, R. A., Khaydarov, R. R., Gapurova, O., Estrin, Y., & Scheper, T. (2009). Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, *11*(5), 1193–1200. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9513-x>
- Khodaei, M. M., & Karegar, M. (2021). Synthesis and characterization of copper nanoparticles stabilized with polyvinyl pyrrolidone and its performance on the conductivity and stability of polyindole. *Journal of the Iranian Chemical Society*, *18*(4), 863–872. <https://doi.org/10.1007/s13738-020-02076-w>
- Kishen, A. (2012). Advanced therapeutic options for endodontic biofilms Biofilm as a therapeutic target in root canal treatment. *Endodontic Topics*, *22*, 99–123.
- Kishen, A., Shi, Z., Shrestha, A., & Neoh, K. G. (2008). An Investigation on the Antibacterial and Antibiofilm Efficacy of Cationic Nanoparticulates for Root Canal Disinfection. *Journal of Endodontics*, *34*(12), 1515–1520. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.08.035>
- Kyrychenko, A., Pasko, D. A., & Kalugin, O. N. (2017). Poly(vinyl alcohol) as a water protecting agent for silver nanoparticles: The role of polymer size and structure. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *19*(13), 8742–8756. <https://doi.org/10.1039/c6cp05562a>
- Lee, B.-N., Moon, J.-W., Chang, H.-S., Hwang, I.-N., Oh, W.-M., & Hwang, Y.-C. (2015). A review of the regenerative endodontic treatment procedure. *Restorative Dentistry & Endodontics*, *40*(3), 179. <https://doi.org/10.5395/rde.2015.40.3.179>
- Li, Z., Sun, Q., Zheng, Y., Wang, J., Tian, Y., Zheng, B., & Guo, Z. (2020). Effect of two-step microwave heating on the gelation properties of golden threadfin bream (*Nemipterus virgatus*) myosin. *Food Chemistry*, *328*(May), 127104. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127104>

- Liaqat, N., Jahan, N., Khalil-ur-Rahman, Anwar, T., & Qureshi, H. (2022). Green synthesized silver nanoparticles: Optimization, characterization, antimicrobial activity, and cytotoxicity study by hemolysis assay. *Frontiers in Chemistry*, 10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.952006>
- Liu, X., Feng, D., Ji, L., Zhang, T., Xue, Y., & Xue, C. (2018). Effects of microwave heating on the gelation properties of heat-induced Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) surimi. *Food Science and Technology International*, 24(6), 497–506. <https://doi.org/10.1177/1082013218768411>
- Liu, Y. J., Fu, L. H., Liu, S., Meng, L. Y., Li, Y. Y., & Ma, M. G. (2016). Synthetic self-assembled homogeneous network hydrogels with high mechanical and recoverable properties for tissue replacement. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(28), 4847–4854. <https://doi.org/10.1039/c6tb01249c>
- Llaquet, M., Mercadé, M., & Plotino, G. (2017). Procedura di rigenerazione endodontica: revisione della letteratura e caso clinico di un incisivo centrale immaturo. *Giornale Italiano Di Endodonzia*, 31(2), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.gien.2017.04.005>
- Longenberger, L., & Mills, G. (1995). Formation of Metal Particles in Aqueous Solutions by Reactions of Metal Complexes with Polymers. In *Physical Chemistry The Journal* (Vol. 0, Issue 2).
- Ma, Y., Bai, T., & Wang, F. (2016). The physical and chemical properties of the polyvinylalcohol/polyvinylpyrrolidone/hydroxyapatite composite hydrogel. *Materials Science and Engineering C*, 59, 948–957. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.081>
- Ma, Y., Pang, Y., Liu, F., Xu, H., & Shen, X. (2016). Microwave-assisted ultrafast synthesis of silver nanoparticles for detection of Hg²⁺. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular*

and *Biomolecular Spectroscopy*, 153, 206–211.

<https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.08.004>

Mao, H., Feng, J., Ma, X., Wu, C., & Zhao, X. (2012). One-dimensional silver nanowires synthesized by self-seeding polyol process. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(6).

<https://doi.org/10.1007/s11051-012-0887-4>

Martínez, B., & Ruiz, F. (2005). Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Avances En Periodoncia e Implantología Oral*, 3(3), 147–156.

<http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v17n3/147enfermedades.pdf>

Mishra, P., & Tyagi, S. (2018). Surface analysis of gutta percha after disinfecting with sodium hypochlorite and silver nanoparticles by atomic force microscopy: An in vitro study.

Dental Research Journal, 15(4), 242–247. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.237248>

Moreno, S., Parra, B., Botero, J. E., Moreno, F., Vásquez, D., Fernández, H., Alba, S., Gallego, S., Castillo, G., & Contreras, A. (2017). Microbiota periodontal y microorganismos aislados de válvulas cardíacas en pacientes sometidos a cirugía de remplazo valvular en una clínica de la ciudad Cali. *Biomedica*, 37(4), 1–36.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i4.3232>

Mortazavi, V., Mehdikhani Nahrkhalaji, M., Fathi, M. H., Mousavi, S. B., & Nasr Esfahani,

B. (2010). Antibacterial effects of sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle on aerobic bacteria. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 94(1), 160–168.

<https://doi.org/10.1002/jbm.a.32678>

Mozayeni, M. A., Dianat, O., Tahvildari, S., Mozayani, M., & Paymanpour, P. (2017).

Subcutaneous reaction of rat tissues to nanosilver coated gutta-percha. *Iranian Endodontic Journal*, 12(2), 157–161. <https://doi.org/10.7508/iej.2017.02.006>

- Nasretidinova, G. R., Fazleeva, R. R., Mukhitova, R. K., Nizameev, I. R., Kadirov, M. K., Ziganshina, A. Y., & Yanilkin, V. V. (2015). Electrochemical synthesis of silver nanoparticles in solution. *Electrochemistry Communications*, 50, 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2014.11.016>
- Neto, F. N. S., Morais, L. A., Gorup, L. F., Ribeiro, L. S., Martins, T. J., Hosida, T. Y., Francatto, P., Barbosa, D. B., Camargo, E. R., & Delbem, A. C. B. (2023). Facile Synthesis of PVP-Coated Silver Nanoparticles and Evaluation of Their Physicochemical, Antimicrobial and Toxic Activity. *Colloids and Interfaces*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/colloids7040066>
- Oliveira, R. N., Rouzé, R., Quilty, B., Alves, G. G., Soares, G. D. A., Thiré, R. M. S. M., & McGuinness, G. B. (2014). Mechanical properties and in vitro characterization of polyvinyl alcoholnano- silver hydrogel wound dressings. *Interface Focus*, 4(1). <https://doi.org/10.1098/rsfs.2013.0049>
- Ow, H., Antoniv, M., Zhu, S., & Poitzsch, M. (2020). *Flow synthesis of polymer nanoparticles* (Patent WO2020243234A1).
- Özkar, S., & Finke, R. G. (2017). Silver Nanoparticles Synthesized by Microwave Heating: A Kinetic and Mechanistic Re-Analysis and Re-Interpretation. *Journal of Physical Chemistry C*, 121(49), 27643–27654. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b06323>
- Pagonis, T. C., Chen, J., Fontana, C. R., Devalapally, H., Ruggiero, K., Song, X., Foschi, F., Dunham, J., Skobe, Z., Yamazaki, H., Kent, R., Tanner, A. C. R., Amiji, M. M., & Soukos, N. S. (2010). Nanoparticle-based Endodontic Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Journal of Endodontics*, 36(2), 322–328. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.10.011>

- Palacio, D. A., Urbano, B. F., & Rivas, B. L. (2018). Hydrogels based on alkylated chitosan and polyelectrolyte copolymers. *Journal of Applied Polymer Science*, *135*(31), 1–10. <https://doi.org/10.1002/app.46556>
- Pannerselvam, B., Alagumuthu, T. S., Cinnaiyan, S. K., Al-Dhabi, N. A., Ponmurugan, K., Saravanan, M., Kanth, S. V., & Thangavelu, K. P. (2020). In vitro Cytotoxicity and Antibacterial Activity of Optimized Silver Nanoparticles Against Wound Infectious Bacteria and Their Morphological Studies. *Journal of Cluster Science*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s10876-020-01759-x>
- Pinto, S. R. C., Rolo, A. G., Chahboun, A., Kashtiban, R. J., Bangert, U., & Gomes, M. J. M. (2010). Raman study of stress effect on Ge nanocrystals embedded in Al₂O₃. *Thin Solid Films*, *518*(19), 5378–5381. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2010.03.035>
- Prasetyo, E. P., Widjiastuti, I., Cahyani, F., Kuntjoro, M., Hendrijantini, N., Hariyani, N., Winoto, E., Nugraha, A. P., Goenharto, S., Susilowati, H., Hendrianto, E., & Rantam, F. A. (2020a). Cytotoxicity of Calcium Hydroxide on Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. *Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria e Clinica Integrada*, *20*, 1–7. <https://doi.org/10.1590/pboci.2020.153>
- Prasetyo, E. P., Widjiastuti, I., Cahyani, F., Kuntjoro, M., Hendrijantini, N., Hariyani, N., Winoto, E., Nugraha, A. P., Goenharto, S., Susilowati, H., Hendrianto, E., & Rantam, F. A. (2020b). Cytotoxicity of Calcium Hydroxide on Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. *Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria e Clinica Integrada*, *20*, 1–7. <https://doi.org/10.1590/pboci.2020.153>
- Proposito, P., Burratti, L., & Venditti, I. (2020). Silver nanoparticles as colorimetric sensors for water pollutants. In *Chemosensors* (Vol. 8, Issue 2). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/CHEMOSENSORS8020026>

- Rabanel, J. M., Hildgen, P., & Banquy, X. (2014). Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 185, Issue 1, pp. 71–87). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.017>
- Rodrigues Magalhães, A. P., Santos, L. B., Lopes, L. G., Estrela, C. R. de A., Estrela, C., Torres, É. M., Bakuzis, A. F., Cardoso, P. C., & Carrião, M. S. (2012). Nanosilver Application in Dental Cements. *ISRN Nanotechnology*, 2012, 1–6. <https://doi.org/10.5402/2012/365438>
- Rodríguez, Y., Castro, R., Arenas, F., López-Cabaña, Z., Carreño, G., Carrasco-Sánchez, V., Marican, A., Villaseñor, J., Vargas, E., Santos, L. S., & Durán-Lara, E. F. (2019). Preparation of hydrogel/silver nanohybrids mediated by tunable-size silver nanoparticles for potential antibacterial applications. *Polymers*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/polym11040716>
- Rojas, B., Soto, N., Villalba, M., Bello-Toledo, H., Meléndrez-Castro, M., & Sánchez-Sanhueza, G. (2021). Antibacterial activity of copper nanoparticles (Cunps) against a resistant calcium hydroxide multispecies endodontic biofilm. *Nanomaterials*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/nano11092254>
- Román, L. E., Castro, F., Maúrtua, D., Condori, C., Vivas, D., Bianclii, A. E., Paraguay-Delgado, F., Solis, J. L., & Gómez, M. M. (2017). CuO nanoparticles and their antimicrobial activity against nosocomial strains, Nanopartículas de CuO e sua propriedade antimicrobiana frente a cepas intrahospitalares, Nanopartículas de CuO y su propiedad antimicrobiana en cepas intrahospitalarias. *Revista Colombiana de Química*, 4. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n3.62386>
- Rózańska, A., Chmielarczyk, A., Romaniszyn, D., Majka, G., & Bulanda, M. (2018). Antimicrobial effect of copper alloys on Acinetobacter species isolated from infections

and hospital environment. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7(1), 1–8.

<https://doi.org/10.1186/s13756-018-0300-x>

Rudra, P. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using water soluble gum of *Sterculia foetida* and evaluation of its antimicrobial activity Moinack Rudra Green synthesis of silver nanoparticles using water soluble gum of *Sterculia foetida* and evaluation of its antimicrobial activity. In ©JK Welfare & Pharmascope Foundation | *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences* (Vol. 4, Issue 4). <https://www.researchgate.net/publication/286482135>

Safo, I. A., Werheid, M., Dosche, C., & Oezaslan, M. (2019). The role of polyvinylpyrrolidone (PVP) as a capping and structure-directing agent in the formation of Pt nanocubes. *Nanoscale Advances*, 1(8), 3095–3106. <https://doi.org/10.1039/c9na00186g>

Salas-Orozco, M., Niño-Martínez, N., Martínez-Castañón, G. A., Méndez, F. T., Jasso, M. E. C., & Ruiz, F. (2019). Mechanisms of resistance to silver nanoparticles in endodontic bacteria: A literature review. *Journal of Nanomaterials*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7630316>

Samiei, M., S, D., Valipour F, Davari A, Ghiasian T, & Lotfipour F, A. (2014a). Antibacterial Efficacy of Silver-Crosslinked Hydrogel Nanocomposite Versus Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine on *Enterococcus Faecalis* for Use in Root Canal Infection. *Ijbpas*, 3(11), 2316–2332.

Samiei, M., S, D., Valipour F, Davari A, Ghiasian T, & Lotfipour F, A. (2014b). Antibacterial Efficacy of Silver-Crosslinked Hydrogel Nanocomposite Versus Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine on *Enterococcus Faecalis* for Use in Root Canal Infection. *Ijbpas*, 3(11), 2316–2332.

- Santhosh, P., Mukhtar, L. A., Kamaraj, M., Nithya, T. G., Ganesh, M. R., Aswathy, K. A., Sadiq, M., Shobana, S., Nadeem, A., Lopes, B. S., & Saravanan, M. (2023). Phytomediated synthesis of copper oxide nanoparticles from floating fern *Salvinia cucullata* Roxb. and their antibacterial, antioxidant, and anticancer potential. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04700-0>
- Sayed, F. A. Z., Eissa, N. G., Shen, Y., Hunstad, D. A., Wooley, K. L., & Elsabahy, M. (2022). Morphologic design of nanostructures for enhanced antimicrobial activity. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01733-x>
- Shetty, S., Kahler, S. L., & Kahler, B. (2017a). Effects on roots of teeth. *Materials*, *10*(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ma10121412>
- Shetty, S., Kahler, S. L., & Kahler, B. (2017b). Effects on roots of teeth. *Materials*, *10*(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ma10121412>
- Shinnosuke, K., Takayuki, H., & Kazumichi, N. (2013). *Microwave reactor and method of producing polymer compound using the same* (Patent US 8383053 B2).
- Shrestha, A., Hamblin, M. R., & Kishen, A. (2014). Photoactivated rose bengal functionalized chitosan nanoparticles produce antibacterial/biofilm activity and stabilize dentin-collagen. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *10*(3), 491–501. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.10.010>
- Shrestha, A., & Kishen, A. (2013). Photodynamic therapy for inactivating endodontic bacterial biofilms and effect of tissue inhibitors on antibacterial efficacy. *Lasers in Dentistry XIX*, 8566, 85660G. <https://doi.org/10.1117/12.2007985>

- Shrestha, A., Zhilong, S., Gee, N. K., & Kishen, A. (2010). Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *Journal of Endodontics*, *36*(6), 1030–1035. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.02.008>
- Silva-herzog, D. F., Ma, L., & Velásquez, A. (2003a). medicamento intraconducto , Estudio in vitro. *Revista ADM*, *60*(1), 14–18.
- Silva-herzog, D. F., Ma, L., & Velásquez, A. (2003b). medicamento intraconducto , Estudio in vitro. *Revista ADM*, *60*(1), 14–18.
- Smith, W. B. (2002). Ethylene glycol to acetaldehyde-dehydration or a concerted mechanism. *Tetrahedron*, 2091–2094.
- Sohail, M., Ahmad, M., Minhas, M. U., Ali, L., Munir, A., & Khalid, I. (2014). Synthesis and characterization of graft PVA composites for controlled delivery of valsartan. *Latin American Journal of Pharmacy*, *33*(8), 1237–1244.
- Soltani, N., Saion, E., Erfani, M., Rezaee, K., Bahmanrokh, G., Drummen, G. P. C., Bahrami, A., & Hussein, M. Z. (2012). Influence of the polyvinyl pyrrolidone concentration on particle size and dispersion of ZnS nanoparticles synthesized by microwave irradiation. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(10), 12412–12427. <https://doi.org/10.3390/ijms131012412>
- Song, Y. J., Wang, M., Zhang, X. Y., Wu, J. Y., & Zhang, T. (2014). Investigation on the role of the molecular weight of polyvinyl pyrrolidone in the shape control of highyield silver nanospheres and nanowires. *Nanoscale Research Letters*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-17>
- Soto, D., & Oliva, H. (2012). Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: una revisión. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, *32*(2), 154–174.

- Souli, M., Galani, I., Plachouras, D., Panagea, T., Armaganidis, A., Petrikkos, G., & Giamarellou, H. (2013). Antimicrobial activity of copper surfaces against carbapenemase-producing contemporary Gram-negative clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(4), 852–857. <https://doi.org/10.1093/jac/dks473>
- Sumit Sharma, Kapil Choudhary, Ishu Singhal, & Rishabh Saini. (2014). Synthesis of Silver Nanoparticles by ‘Electrochemical Route’ through pure metallic Silver electrodes, and evaluation of their Antimicrobial Activities. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 28(2), 272–277.
- Thanh, N. T. K., Maclean, N., & Mahiddine, S. (2014). Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. In *Chemical Reviews* (Vol. 114, Issue 15, pp. 7610–7630). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/cr400544s>
- Theivasanthi, T., & Alagar, M. (2011). Nano sized copper particles by electrolytic synthesis and characterizations. *International Journal of the Physical Sciences*, 6(15), 3662–3671. <https://doi.org/10.5897/IJPS10.116>
- Thomas, J., Lowman, A., & Marcolongo, M. (2003). Novel associated hydrogels for nucleus pulposus replacement. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 67(4), 1329–1337. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10119>
- Tsuji, M. (2017). Microwave-Assisted Synthesis of Metallic Nanomaterials in Liquid Phase. In *ChemistrySelect* (Vol. 2, Issue 2, pp. 805–819). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/slct.201700011>
- Valdés, M. Á. S. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 16(3), 402–419.

- Vazquez-Garcia, F., Tanomaru-Filho, M., Chávez-Andrade, G. M., Bosso-Martelo, R., Basso-Bernardi, M. I., & Guerreiro-Tanomaru, J. M. (2016). Effect of silver nanoparticles on physicochemical and antibacterial properties of calcium silicate cements. *Brazilian Dental Journal*, *27*(5), 508–514. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600689>
- Vazquez-Muñoz, R., Arellano-Jimenez, M. J., Lopez, F. D., & Lopez-Ribot, J. L. (2019). Protocol optimization for a fast, simple and economical chemical reduction synthesis of antimicrobial silver nanoparticles in non-specialized facilities. *BMC Research Notes*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4813-z>
- Waltimo, T., Brunner, T. J., Vollenweider, M., Stark, W. J., & Zehnder, M. (2007). Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5. *Journal of Dental Research*, *86*(8), 754–757. <https://doi.org/10.1177/154405910708600813>
- Waltimo, T., Mohn, D., Paqué, F., Brunner, T. J., Stark, W. J., Imfeld, T., Schätzle, M., & Zehnder, M. (2009). Fine-tuning of bioactive glass for root canal disinfection. *Journal of Dental Research*, *88*(3), 235–238. <https://doi.org/10.1177/0022034508330315>
- Wang, J., Jia, Z., & Lv, C. (2018). Enhanced Raman scattering in porous silicon grating. *Optics Express*, *26*(6), 6507. <https://doi.org/10.1364/oe.26.006507>
- Wiśniewska, M., Urban, T., Grządka, E., Zarko, V. I., & Gun'ko, V. M. (2014). Comparison of adsorption affinity of polyacrylic acid for surfaces of mixed silica-alumina. *Colloid and Polymer Science*, *292*(3), 699–705. <https://doi.org/10.1007/s00396-013-3103-x>
- Wu, C., Mosher, B. P., Lyons, K., & Zeng, T. (2010). Reducing ability and mechanism for polyvinylpyrrolidone (PVP) in silver nanoparticles synthesis. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *10*(4), 2342–2347. <https://doi.org/10.1166/jnn.2010.1915>

- Wu, D., Fan, W., Kishen, A., Gutmann, J. L., & Fan, B. (2014a). Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of Endodontics*, *40*(2), 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.08.022>
- Wu, D., Fan, W., Kishen, A., Gutmann, J. L., & Fan, B. (2014b). Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of Endodontics*, *40*(2), 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.08.022>
- Xian, J., Hua, Q., Jiang, Z., Ma, Y., & Huang, W. (2012). Size-dependent interaction of the poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) capping ligand with Pd nanocrystals. *Langmuir*, *28*(17), 6736–6741. <https://doi.org/10.1021/la300786w>
- Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. *International Journal of Nanomedicine*, *15*, 2555–2562. <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>
- Yuan, G., Chang, X., & Zhu, G. (2011). Electrosynthesis and catalytic properties of silver nano/microparticles with different morphologies. *Particuology*, *9*(6), 644–649. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2011.03.011>
- Zafar, M. S., Amin, F., Fareed, M. A., Ghabbani, H., Riaz, S., Khurshid, Z., & Kumar, N. (2020). Biomimetic Aspects of Restorative Dentistry Biomaterials. *Biomimetics*, *5*(3), 34. <https://doi.org/10.3390/biomimetics5030034>
- Zein, R., Alghoraibi, I., Soukkarieh, C., Ismail, M. T., & Alahmad, A. (2022). Influence of Polyvinylpyrrolidone Concentration on Properties and Anti-Bacterial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles. *Micromachines*, *13*(5). <https://doi.org/10.3390/mi13050777>
- Zhang, K., Li, F., Imazato, S., Cheng, L., Liu, H., Arola, D. D., Bai, Y., & Xu, H. H. K. (2013a). Dual antibacterial agents of nano-silver and 12-

methacryloyloxydodecylpyridinium bromide in dental adhesive to inhibit caries. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 101 B(6), 929–938. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32898>

Zhang, K., Li, F., Imazato, S., Cheng, L., Liu, H., Arola, D. D., Bai, Y., & Xu, H. H. K. (2013b). Dual antibacterial agents of nano-silver and 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide in dental adhesive to inhibit caries. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 101 B(6), 929–938. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32898>

Zhu, H. T., Zhang, C. Y., & Yin, Y. S. (2004). Rapid synthesis of copper nanoparticles by sodium hypophosphite reduction in ethylene glycol under microwave irradiation. *Journal of Crystal Growth*, 270(3–4), 722–728. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2004.07.008>