

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y ETUDIOS DE POSGRADO

PROYECTO

**“EFECTO DE LA ADICIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO EN DIVERSAS
CONCENTRACIONES EN LA VIABILIDAD CELULAR Y CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE
APATITAS (BIOACTIVIDAD) EN UN CEMENTO MTA”**

que para obtener el grado de:

LICENCIATURA EN ESTOMATOLOGÍA

PRESENTA:

C. STEPHANY TREJO CASTILLO

201815386

DIRECTOR PRINCIPAL

**MTRA. ED. ARACELI ACEVEDO
CONTRERAS
ID: 100438466**

DIRECTOR DICIPLINARIO:

**DRA. EN C. ABIGAILT FLORES
LEDESMA
ID: 100324622**

DIRECTORA METODOLÓGICA:

**DRA EN C. MARÍA DE LOS
ÁNGELES MOYAHU BERNAL
ID: 100289266**

ASESOR EXTERNO:

**DR. EN C. JUAN ANTONIO
ARREGUIN CANO
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA**

LECTOR DE TESIS:

DC. BERNARDINO ISAAC CERDA CRISTERNA

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO

PROYECTO

**“EFECTO DE LA ADICIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO EN DIVERSAS
CONCENTRACIONES EN LA VIABILIDAD CELULAR Y CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE
APATITAS (BIOACTIVIDAD) EN UN CEMENTO MTA”**

que para obtener el grado de:

LICENCIATURA EN ESTOMATOLOGÍA

PRESENTA:

C. STEPHANY TREJO CASTILLO

201815386

DIRECTOR PRINCIPAL

**MTRA. ED. ARACELI ACEVEDO
CONTRERAS**

ID: 100438466

DIRECTOR DICIPLINARIO:

**DRA. EN C. ABIGAILT FLORES
LEDESMA**

ID: 100324622

DIRECTORA METODOLÓGICA:

**DRA EN C. MARÍA DE LOS
ÁNGELES MOYAHU BERNAL**

ID: 100289266

ASESOR EXTERNO:

**DR. EN C. JUAN ANTONIO
ARREGUIN CANO**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA**

LECTOR DE TESIS:

DC. BERNARDINO ISAAC CERDA CRISTERNA

I. DICTAMEN DE APROBACIÓN DE TESIS (S.I.E.P)



Oficio No. FESIEP/CIFE/098/2025

C. Stephany Trejo Castillo
Estudiante de la Licenciatura en Estomatología
Matrícula No.: 201815386
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, en mi doble calidad de Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado y Presidenta del Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; aprovecho para felicitarla por el avance significativo en su proceso académico. En atención a su solicitud, me permito notificarle que su tesis titulada:

"Efecto de la adición de nanotubos de carbono en diversas concentraciones en la viabilidad celular y la capacidad de formación de apatita (Bioactividad) en un cemento MTA".

ha recibido la aprobación oficial para su impresión.

Su trabajo ha sido registrado en el Libro de Registros No. 09, página 01, con el No. de Asignación 2024276ES quedando debidamente documentado en esta Secretaría de Investigación. Esta tesis será presentada como parte del procedimiento para su examen profesional, necesario para obtener el grado de Licenciatura en Estomatología.

Próximos pasos:

1. Impresión de la tesis: Procedan con los trámites de impresión conforme a los lineamientos establecidos por la Facultad.
2. Revisión del documento: Asegúrense de que el texto cumpla con los estándares académicos y formales.
3. Coordinación del examen profesional: Contacten a la Coordinación Académica de esta Facultad para agendar su examen profesional y completar los trámites administrativos correspondientes.

Le recordamos que el cumplimiento de los plazos y requisitos establecidos es fundamental para garantizar la fluidez del proceso.

Reconocimiento y mensaje final:

Este logro refleja su esfuerzo, dedicación y el impacto de su investigación en el ámbito de la Estomatología. Le felicitamos por este avance significativo y confiamos en que continuará demostrando su compromiso académico y profesional.


Para cualquier consulta o información adicional, no duden en comunicarse con nosotros. Estamos a su disposición para acompañarles en esta etapa crucial de su formación.

Sin otro particular, le reitero mi más atenta y distinguida consideración y le deseo éxito en la etapa final de esta carrera académica.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a viernes 26 de septiembre del 2025


MEP Giselle Nataly Rubin de Celis Quintana
Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



*Nota: Se anexa Formato de Impresión de Tesis – C. Stephany Trejo Castillo – Licenciatura en Estomatología – Facultad de Estomatología – BUAP. (origina) – p.a.c.y.a.
*C.c.p. Archivo
*MCO, FJMA/MEP, GNRCQ/yemeth

Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología
31 poniente 1304, Col. Volcanes
Puebla, Pue.
C.P. 72410
Tel. Of. 22*22 29 55 00
Ext. 5526

II. AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS RECEPCIONAL

Para obtener el Grado de: Licenciada en Estomatología.

No. Registro CIFE: 2024276E3 Fecha de Registro ante CIFE: miércoles 16 de octubre del 2024.

Título de la Tesis: "Efecto de la adición de nanotubos de carbono en diversas concentraciones en la viabilidad celular y la capacidad de formación de apatita (Bioactividad) en un cemento MTA.

Nombre del estudiante: Stephany Trejo Castillo.

Matrícula: 201815386.

Domicilio: Calle Cuauhtémoc poniente No.312, San Felipe Hueyotlipan, Puebla,

No. Cel.: 22 23 34 17 40.

Fecha de ingreso a la Facultad: lunes 06 de agosto. del 2018.

Firma: 

Director de Tesis: ME. Araceli Acevedo Contreras. **Grado académico:** Maestra en educación con orientación en innovación y tecnología educativa.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100438466.

No. Cel. 22*23 22 94 18

Firma: 

Director Disciplinario: DC. Abigail Flores Ledesma. **Grado académico:** Doctora en Ciencias con terminación en Biomateriales Dentales.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100324622.

No. Cel. 55*37 37 66 11.

Firma: 

Director Metodológico: DC. María de los Ángeles Moyaho Bernal. **Grado académico:** Doctora en Ciencias de la Salud.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100289266.

No. Cel. 22*22 78 88 41

Firma: 

Lector: DC. Bernardino Isaac Cerda Cristerna. **Grado académico:** Doctor en ingeniería y Ciencias de los Materiales. Doctor en Ciencias Biomédicas y Farmacéuticas.

Adscripción: Facultad de Odontología, UV

ID: S/N

No. Cel. 44*422 20 03 31

Firma: 

Nombre y firma de aprobación por parte del Presidente de la Academia de la Licenciatura en Estomatología.

ME. Francisco Javier Castillo Cano

Firma: 

La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado

Facultad de Estomatología,

Autoriza la impresión de la Tesis.

MEP. Gisela Nataly Rubín de Celis Quintana





Fecha oficial de emisión: martes 25 de febrero del 2025.

Sello _____

III. OFICIO DE ACEPTACIÓN C.I.F.E



Constancia No. FESIEP/CIFE/312/2024

CDEE. Araceli Acevedo Contreras
Responsable del Proyecto de Investigación
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo la que suscribe M^{ER}. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana en mi calidad de Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, y tras un detenido análisis y evaluación en el Proyecto de Investigación (Colectivo):

Nombre del Título del Proyecto:

"Efecto de la adición de nanotubos de carbono en diversas concentraciones en la viabilidad celular y la capacidad de formación de apatita (Bioactividad) en un cemento MTA".

Presentado por:

No.	Cargos	Nombres	ID y/o Matrícula
1	Responsable del Proyecto de Investigación:	CDEE Araceli Acevedo Contreras	100430466
2	Directora Disciplinaria:	DC Abigail Flores Ledesma	100324622
3	Directora Metodológica:	DC María de los Ángeles Mojaha Bernal	100289266
4	Asesor Externo:	DC Juan Antonio Arreguin Cano Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México.	S/N
5	Estudiante de Licenciatura en Estomatología	C. Stephany Trejo Castillo	201815308

HAGO CONSTAR, que, ha sido oficialmente **ACEPTADO**. Este relevante proyecto, ha sido registrado ante el Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología (C.I.F.E.), inscrito en el libro de registros No. 09, página 01, bajo el No. de asignación 2024276, en la Secretaría de Investigación de esta Unidad Académica.

Para los fines legales que los interesados convengan, y sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a miércoles 16 de octubre del 2024


M^{ER}. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



*C.p. Archivo
*MCO. FJM/MEP. GNRCQ/Janeth

Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología
31 puente 1304, Col. Volcanes
Puebla, Pue.
C.P. 72410
Tel. Of. 22*22 29 55 00
Ext. 5526

IV. REPORTE DE SIMILITUD






14% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 15 palabras)

Fuentes principales

- 11%  Fuentes de Internet
- 4%  Publicaciones
- 10%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
43 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.



V. EVIDENCIA DE PRODUCTOS ACADÉMICOS DERIVADOS DEL PROYECTO



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario del Sur

Secretaría Académica

Instituto de Investigaciones en Comportamiento Alimentario y Nutrición

Instituto de Investigación de la Red Universitaria

Otorga la presente

CONSTANCIA

a:

Stephany Trejo Castillo, Araceli Acevedo Contreras, María de los Angeles Moyaho Bernal, Carlos Enrique Cuevas Suárez, Juan Antonio Arreguín Cano, Abigail Flores Ledesma

Por su participación como **PONENTE** en modalidad **VIRTUAL** con el proyecto titulado Efecto de nanotubos de carbono en la viabilidad celular de un cemento MTA en el XVI COLOQUIO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN PARA ESTUDIANTES UNIVERSITARIOS Y EL VIII COLOQUIO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN UNIVERSITARIA

Atentamente

"Piensa y Trabaja"

Ciudad Guzmán, Municipio de Zapotlán el Grande, Jalisco a 22 de noviembre de 2024.

Dra. Nicoletta Righini

Secretaría del Instituto en Ciencia del Comportamiento con Orientación en Alimentación y Nutrición

Dr. José de Jesús Chávez Cervantes

Secretario Académico

Dra. Fátima Ezzahra Housni

Directora del Instituto en Ciencia del Comportamiento con Orientación en Alimentación y Nutrición



LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

A través de la
Facultad de Odontología
Otorga la presente

CONSTANCIA



A:

Trojo Castillo Stephany, Acevedo Contreras Araceli, Moyaho Bernal Maria De Los Angeles, Arreguin Cano Juan Antonio, Flores Ledesma Abigailt.



Por su participación con el trabajo titulado: **"Efecto de nanotubos de carbono en la viabilidad de un cemento mta."** en la categoría de **Biomateriales**, presentando en el Primer Encuentro Internacional de Semilleros de Investigación en Odontología, llevado a cabo en el marco de la XXVI Semana de Odontología, el 4 de abril de 2025.



"DUC IN ALTUM"


M.E.S. Juan Antonio Galache
Vega


M.E.O. Adelfo González
Acosta



VI. AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud a la Dra. Lourdes Soledad Bazán y al Dr. Omar Novelo Peralta del Laboratorio Universitario de Microscopía Electrónica (LUME-UNAM) en el Instituto de Investigación en Materiales UNAM por la sustentación en la observación y análisis de las muestras en el microscopio electrónico de barrido.

Mi agradecimiento a la M. En C. Adriana Tejeda Cruz del Laboratorio de Rayos X del Instituto de Investigación en Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el análisis de las muestras en el Rayos X, su aporte fue crucial para el desarrollo de esta tesis.

También quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Juan Antonio Arreguín Cano de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH) por su valiosa colaboración en la prueba de viabilidad, su contribución fue esencial para validar los resultados de este estudio.

Agradezco con todo mi corazón a la Dra. Abigail Flores Ledesma, por su apoyo incondicional y su inspiración constante. Su pasión por la investigación y su compromiso con la excelencia han sido un modelo a seguir para mí. Gracias, por tanto, ojalá la vida me permita poder seguir aprendiendo de usted y tener el honor de ser su colega.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Mtra. Araceli Acevedo Contreras, a la Dra. María de los Ángeles Moyaho Bernal y al Dr. Juan Antonio Arreguín Cano, por ser mis mentores, con guía constante y dedicación en cada etapa de mi tesis. Sus experiencias y conocimientos fueron fundamentales para llevar a cabo este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

En honor a mi abuelita Adela, mi fuente de inspiración y sabiduría. Aunque ya no estes físicamente conmigo, tu espíritu y amor continúan guiándome en cada paso de este camino.

A mis abuelitos Adela y Fernando, quienes me cuidaron con amor y dedicación desde el primer día de mi vida, por enseñarme el camino hacia la vida, por ser unos segundos padres para mí. Siempre vivirán en mi corazón.

A mi mamá Hilda, quien me ha enseñado a soñar en grande, a nunca rendirme. Tu pasión por la vida, a tu trabajo y tu dedicación a nuestra familia han sido un ejemplo constante para mí. Gracias por creer en mí, por estar siempre a mi lado, por todo tu amor, por tus sabios consejos y apoyo incondicional durante toda mi vida. Estoy orgullosa de ser tu hija y de tener una mamá como tú.

A mi papá Jules, por ser mi roca y mi protector, por ofrecerme un hombro en el que apoyarme. Te amo y te admiro más de lo que las palabras puedan expresar. Gracias por enseñarme el valor de la honestidad, la lealtad y la perseverancia. Estoy eternamente agradecida por tu amor, apoyo y sacrificio, me han ayudado a superar obstáculos y alcanzar mis metas, espero hacerte sentir orgulloso de mí.

A mi querido hermano Angel, quiero dedicarte este logro, no solo como un reconocimiento a tu apoyo y amor incondicional, sino también como un tributo a la increíble relación que compartimos desde siempre. Te amo con todo mi corazón.

A mi tía Xochitl, quiero dedicarte este logro como un reconocimiento a tu amor y dedicación hacia mí. Gracias por cuidar de mí de pequeña.

A mi esposo Diego, quien ha sido mi compañero de vida desde que éramos adolescentes en secundaria, me has apoyado en mis sueños y aspiraciones, has sido mi mayor fuente de inspiración. Me has enseñado a ser fuerte y valiente, y a nunca rendirme ante las adversidades. Ninguna medida de tiempo será suficiente, empecemos con “siempre”. Te amo con todo mi corazón.

A mi amada bebé Melanie, desde el momento en que llegaste a mi vida, supe que traías luz, propósito y aún más amor a nuestras vidas. Tu sonrisa, tus risas me han llenado de felicidad y me han dado la fuerza para seguir adelante, has cambiado mi vida y me has enseñado a ver el mundo de una manera diferente y con mucho amor. Eres lo que más amo en este mundo.

Esta dedicatoria va para mi “yo” del futuro, para que en unos años recuerdes las adversidades que tuviste que atravesar durante la universidad y que con mucha valentía superaste y jamás te rendiste, que todos aquellos desvelos y el empeño que pusiste a lo largo de todo esto, te llevaron justo a donde estas; esta dedicatoria es para ti mi querido “yo” del futuro, para que si algún día tienes en mente “rendirte” recuerdes que sí en el pasado pudimos afrontar situaciones e incluso personas que nos querían impedir avanzar, no hay motivo ni razón para rendirse y tirar la toalla así de fácil. Sigue aplaudiendo tus logros, motivándote para seguir cumpliendo cada meta que durante el transcurso de nuestra adolescencia soñamos y dijimos “algún día”.

Considera que yo me siento orgullosa de ti y que estoy plenamente feliz en donde estoy ahora, solo espero que en el futuro no dejes de brillar y que siempre sigas sonriendo y sobre todo **QUE NADA TE DETENGA.**

VII. ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 ANTECEDENTES GENERALES.....	3
3.1.1 Agregado de Trióxido Mineral (MTA).....	3
3.1.1.1 Aplicaciones clínicas	4
3.1.1.2 Composición química del MTA.....	5
3.1.1.3 Decoloración o discromía.....	7
3.1.1.4 Morfología del cemento MTA	8
3.1.1.5 Manipulación	9
3.1.1.6 Mecanismo de acción.....	9
3.1.1.7 Propiedades físicas y químicas.....	11
3.1.1.7.1 Tiempo de fraguado	11
3.1.1.7.2 pH	12
3.1.1.7.3 Solubilidad	12
3.1.2 Viabilidad celular	15
3.1.2.1 Ensayos funcionales	16
3.1.2.2 Método mediante la cuantificación de ATP: ensayo MTT	16
3.1.3 Bioactividad	18
3.1.3.1 Hallazgos de bioactividad.....	19
3.1.4 Nanomateriales	20
3.1.5 Nanotubos de carbono (carbon nanotubes, CNT's)	20
3.1.5.1 Estructura.....	21
3.1.5.2 Propiedades	22
3.1.5.3 Funcionalización de nanotubos de carbono	23
3.1.5.4 Aplicaciones	24
3.1.5.4.1 Aplicaciones médicas.....	24
3.1.5.5 Síntesis de nanomateriales	25
3.1.6 Hidroxiapatita.....	26
3.1.6.1 Estructura cristalina.....	28
3.1.7 Difracción de Rayos X	28

3.1.7.1 Componentes principales del difractómetro	29
3.1.7.2 Ensanchamiento de los picos.....	31
3.1.7.3 Tamaño del cristalito	32
3.1.8 Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)	34
3.1.8.1 Antecedentes del desarrollo del MEB	34
3.1.8.2 Componentes principales del MEB	34
3.1.8.3 Proceso de análisis MEB	42
3.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	43
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	46
5. JUSTIFICACIÓN	47
6. HIPÓTESIS	48
7. OBJETIVOS	49
7.1 Objetivo general.....	49
7.2 Objetivos específicos	49
8. MATERIALES Y MÉTODOS	50
8.1 Diseño experimental	50
8.2 Tamaño de muestra.....	50
8.3 Criterios de selección.....	50
8.3.1 Criterios de inclusión	50
8.3.2 Criterios de exclusión	50
8.3.3 Criterios de eliminación	51
8.4 Variables.....	52
8.5 Concordancia y fiabilidad.....	53
8.6 Ubicación espacio temporal.....	54
8.7 Procedimientos	54
8.7.1 Elaboración de los cementos.....	54
8.7.2 Elaboración de las pastillas y almacenamiento	54
8.7.3 Prueba de viabilidad celular.....	55
8.7.4 Prueba de bioactividad	57
8.7.5 Elaboración de solución de fluido corporal simulada (SBF).....	59
8.8 Análisis estadístico	61
9. RESULTADOS	62

9.1 Viabilidad celular.....	62
9.2 Bioactividad	65
10.2.1 Difracción de rayos X de haz rasante	65
9.2.2 Microscopía Electrónica de Barrido	67
9.2.2.1 Cementos sin hidratar	67
9.2.2.2 Superficies de los cementos después de la prueba de bioactividad	70
10. DISCUSIÓN	72
11. CONCLUSIONES.....	77
12. BIBLIOGRAFÍAS.....	78

VIII. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1 Aplicaciones clínicas del MTA.....	4
Figura 2 Presentaciones comerciales de ProRoot y MTA Angelus®.....	6
Figura 3 Polvo ProRoot MTA gris y blanco	7
Figura 4 Micrografía electrónica de barrido del polvo de MTA	8
Figura 5 Comparación de micrografía electrónica de barrido de (A) Cemento Portland y (B) MTA.....	9
Figura 6 Diagrama de nanotubos de carbono	21
Figura 7 Estructura de Nanotubos de carbono.....	22
Figura 8 HAp en celda hexagonal	26
Figura 9 Posición de los iones en la celda unitaria A) Calcio B) Fósforo	26
Figura 10 Patrón de difracción de la hidroxiapatita estequiométrica	27
Figura 11 Dispersión de Bragg.....	30
Figura 12 Configuración del difractómetro en la geometría Bragg-Brentano	31
Figura 13 Información presente en el difractograma, extraído de un pico de difracción de rayos-X.....	32
Figura 14 Comparación entre tamaño de cristalito y partícula	33
Figura 15 Patrones de difracción de rayos-X en polvos simulada de partículas esféricas de wurtzite Cds de diferentes tamaños con rangos de 1µm a 1nm	33
Figura 16 Las dos partes principales del MEB	35
Figura 17 Diagrama de electrones retrodispersados y secundarios.....	39
Figura 18 Protocolo de elaboración de pastillas de cemento MTA con diversas concentraciones de nanotubos de carbono.....	55
Figura 19 Evaluación de viabilidad celular	56
Figura 20 Protocolo de elaboración de pastillas de cemento MTA con diversas concentraciones de nanotubos de carbono.....	57
Figura 21 Recambio de solución de 21 días	58
Figura 22 Protocolo de preparación de la solución de fluido corporal simulada (SBF).....	60
Figura 23 Resultados de viabilidad celular a las 24h	62
Figura 24 Resultados de viabilidad celular a las 48h	63
Figura 25 Resultados de viabilidad celular a las 72h	64
Figura 26 Comparación de resultados a las 24, 48 y 72h	65
Figura 27 Difracción de rayos X de los 3 grupos.....	66
Figura 28 Bismuto (Bi) por medio de MEB, con magnificación de 500X	67
Figura 29 Composición de G1-SNT a 2,500X y 50,000X	68
Figura 30 Composición de G2- 0.1% NT a 2,500X y 50,000X	68
Figura 31 Composición de G3- 0.3% NT a 2,500X y 50,000X	69
Figura 32 Superficie del G1- SNT después de la prueba de bioactividad a 1,000X y 2,500X.....	70
Figura 33 Superficie del G2- 0.1% NT después de la prueba de bioactividad a 1,000X y 2,500X.....	71

Figura 34 Superficie del G3- 0.3% NT después de la prueba de bioactividad a 1,000X y 2,500X..... 71

IX. ABREVIATURAS

CNT's Nanotubos de carbono

DRX Difracción de rayos-X

DWNT Nanotubo de doble capa/ Double walled nanotube

GMTA Agregado de Trióxido Mineral gris

MTA Agregado de Trióxido Mineral

MWNT Nanotubo multicapa/ Multi Walled nanotube

MEB Microscopio electrónico de barrido

SWNT Nanotubo monocapa Single/Walled nanotube

WMTA Agregado de Trióxido Mineral blanco

WT Peso total/ Weight Total

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO EN DIVERSAS CONCENTRACIONES EN LA VIABILIDAD CELULAR Y LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE APATITA (BIOACTIVIDAD) EN UN CEMENTO MTA

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Objetivo: Comparar el efecto de la adición de nanotubos de carbono en diversas concentraciones en la viabilidad celular y la capacidad de formación de apatita (bioactividad) en un cemento MTA. **Materiales y métodos:** Se elaboró un cemento MTA experimental a partir de un cemento Portland blanco y 20% de trióxido de bismuto, posteriormente se agregaron 0.1% wt y 0.3% wt de nanotubos de carbono. Se realizaron pruebas de viabilidad celular y bioactividad. Finalmente, se evaluó la superficie de cada uno de los productos previamente hidratados por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). El análisis estadístico se realizó por medio de prueba de normalidad Shapiro Wilks, y los resultados fueron analizados en SPSS, con el análisis de ANOVA y la prueba *post hoc* Tukey, encontrándose diferencias estadísticamente significativas. **Resultados:** Se observó que a las 24h los tres grupos mostraron una viabilidad similar, G1-170%, G2-168% y G3-166% (ANOVA $p > 0.05$). A las 48h, se observó una disminución en la viabilidad, pero todos cercanos al 100% del basal, G1-110%, G2-95% y G3-108%, se encontraron diferencias estadísticas entre G1 vs G2 y G3 vs G2 (ANOVA $p < 0.05$, *post hoc* Tukey $p < 0.05$). Los valores disminuyeron en los 3 grupos (ANOVA $p < 0.05$, *post hoc* Tukey $p < 0.05$) a las 72h. En el análisis de DRX, no se encontró ningún indicio de formación de hidroxiapatita, sin embargo, se observó la presencia de Calcita (Carbonato de calcio) un precursor de apatitas, sus picos se compararon con la base de datos del "Power Diffraction File" PDF 05-0586. **Conclusiones:** El agregar nanotubos de carbonos, a las 24h presenta resultados favorables de más del 100%. A las 48h, se observó una disminución en la viabilidad celular pero no se considera citotóxico debido a que los valores son mayores al 95%. En la prueba de bioactividad, en ningún grupo se encontró indicio de formación de hidroxiapatita, sin embargo, se observó Calcita que es un precursor de apatitas, por lo que se sugiere aumentar el tiempo de prueba.

PALABRAS CLAVE

MTA, nanotubos de carbono, viabilidad celular, bioactividad

2. INTRODUCCIÓN

La endodoncia es una rama de la estomatología, reconocida desde 1963 por la Asociación Dental Americana, que se enfoca en el estudio de la estructura, fisiología y morfología de la pulpa dental. En la actualidad, los avances en el campo endodóntico, las técnicas de asepsia, los principios de preparación mínimamente invasiva y la obturación de los conductos radiculares han mejorado significativamente el éxito de los tratamientos endodónticos. Sin embargo, persisten dificultades derivadas de los procedimientos, generalmente relacionadas con variaciones anatómicas y otras circunstancias que complican el tratamiento, a menudo vinculadas a los materiales utilizados, ya que algunos pueden ser sensibles al agua y difíciles de manipular.

En los años noventa se desarrolló en la Universidad de Loma Linda por M. Torabinejad el Agregado de Trióxido Mineral también conocido como MTA, este es un material compuesto por cemento Portland y trióxido de bismuto con relación 4:1; es constituido por partículas finas hidrofílicas que solidifican en presencia de agua siendo esta su principal ventaja, así mismo dicha propiedad le ha permitido ser el material de elección en el sellado de perforaciones a nivel radicular, además de ser utilizado como inductor en la apexificación, recubrimientos pulpaes directos, resorciones radiculares y pulpotomías.

No obstante, pese a sus grandes ventajas y uso clínico, hoy en día el MTA continúa manifestando algunos inconvenientes como lo es el largo tiempo de fraguado. En investigaciones, se ha demostrado que algunas adiciones de nano compuestos particularmente de nanotubos de carbono en concentraciones del 0.1% y 0.3% en la viabilidad celular y bioactividad en el MTA modifican favorablemente su microestructura, generando cementos más resistentes.

3. ANTECEDENTES

3.1 ANTECEDENTES GENERALES

3.1.1 Agregado de Trióxido Mineral (MTA)

Durante el tratamiento endodóntico pueden establecerse comunicaciones entre los tejidos periodontales y el conducto radicular, lo que puede ocasionar perforaciones. Estas deben sellarse con materiales restauradores para impedir la migración de agentes externos (bacterias o fluidos) ⁽¹⁾.

El Agregado de Trióxido Mineral, conocido como Mineral Trioxide Aggregate (MTA), se desarrolló por primera vez en 1993 ⁽¹⁾ por Torabinejad y Chivian ^{2,3} en la Universidad de Loma Linda. Este material, elaborado a base de silicato de calcio, se utiliza como obturador en vías de comunicación, principalmente entre los tejidos pulpar y periodontal ⁴. Está compuesto por 80% de cemento Portland y 20% de trióxido de bismuto (Bi_2O_3) ^{1,3,5} y se presenta comúnmente en sobres herméticamente sellados que contienen en partículas hidrofílicas de silicato tricálcico, aluminato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato férrico tetracálcico, óxido de bismuto y sulfato de calcio dihidratado, que al fraguar en presencia de agua, forma un gel coloidal con un pH de 12.5 ^(1,3).

Además de sus propiedades fisicoquímicas, el MTA se destaca por su alta biocompatibilidad y capacidad para inducir la formación de tejido duro, lo que lo convierte en una opción eficaz para la reparación de perforaciones radiculares, apexificaciones y procedimientos de terapia pulpar vital, como lo son pulpotomías o recubrimientos pulpares. Su pH alcalino no solo ayuda a proteger el área tratada contra infecciones, sino que también favorece la regeneración del tejido perirradicular. A pesar de sus ventajas, el MTA presenta algunas limitaciones, como un tiempo de fraguado prolongado y un costo relativamente elevado en comparación con otros materiales convencionales, aspectos que deben considerarse en la planificación del tratamiento.

3.1.1.1 Aplicaciones clínicas

El cemento de ionómero mineral trióxido (MTA, por sus siglas en inglés) se utiliza principalmente para el sellado de perforaciones radiculares. Actualmente, también se emplea como material de elección en procedimientos como la apexificación, el tratamiento de resorciones radiculares, recubrimientos pulpaes directos y pulpotomías^{1,4,6,7}. Diversos estudios han demostrado que el MTA favorece la formación de tejido duro, así como la regeneración del tejido periapical, lo cual contribuye a una reparación dentinaria estable y duradera a largo plazo (Figura 1.)

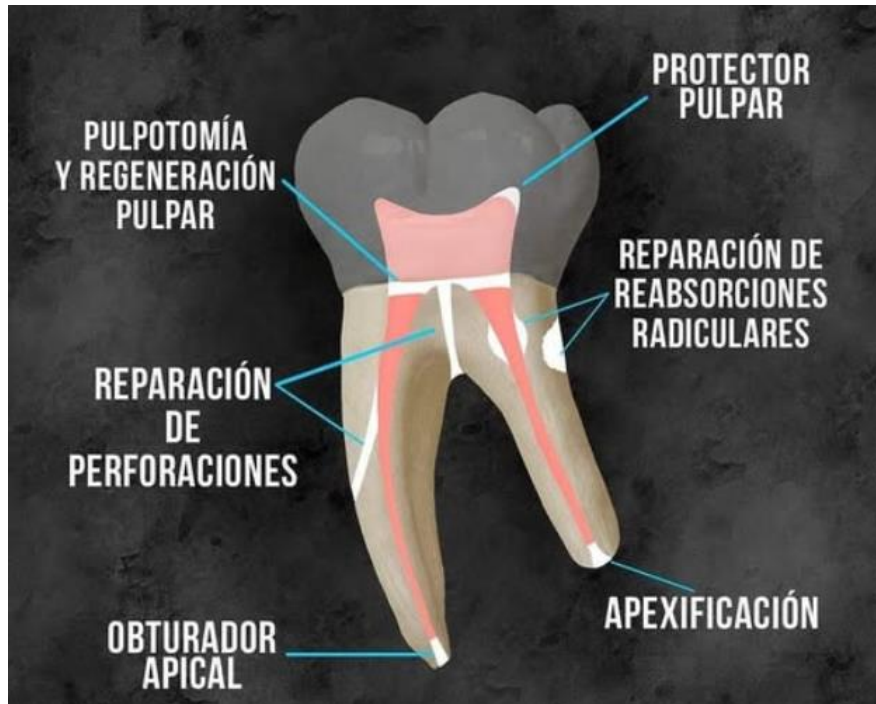


Figura 1 Aplicaciones clínicas del MTA

(Asociación Dental Mexicana, 2022)

Ventajas

- Material radiopaco

- Fácil remoción en caso de retirar excesos antes de su fraguado
- Excelente respuesta en los tejidos
- Promueve la inducción de dentina de reparación
- No es mutagénico ⁽¹⁾.

Desventajas

- Dificil manipulación
- Fuerza compresiva baja
- Baja solubilidad
- Largo tiempo de fraguado de 3 a 4 horas, en la presentación convencional (polvo/líquido), ya que actualmente existen presentaciones que fraguan en minutos.
- Libera oligoelementos ⁽¹⁾.

3.1.1.2 Composición química del MTA

El MTA se compone por un 80% de cemento Portland y un 20% de trióxido de bismuto (Bi_2O_3) ^{1,2,4,5}, mismo que le provee radiopacidad para su fácil identificación radiográfica. El Agregado de Trióxido Mineral (MTA), fue comercializado en 1993 bajo el nombre de ProRoot MTA ® (Dentsply, Tulsa Dental Products), exhibido en color gris (GMTA), sin embargo, ocasiona pigmentación en los tejidos blandos adyacentes; motivo por el cual, en el año 2002, se introdujo el MTA blanco (WMTA). (Figura 2) El óxido de hierro, es la principal diferencia entre el GMTA y WMTA ⁶⁻⁸.

Las concentraciones de los óxidos difieren, debido a que el WMTA contiene 54.9% menos de óxido de aluminio, 56.5% menos de óxido de magnesio y 90.8% menos de óxido de hierro en comparación con el GMTA ⁹.

Cabe mencionar que en 2017 Raghavendra *et.al*⁸ explicó que el WMTA tenía un tamaño de partícula más pequeño que el GMTA.

El silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico y una pequeña cantidad de aluminio- ferrita tetracálcico (GMTA) conforman el “Clinker”^{10,11}, es decir, la mezcla principal de fases minerales que componen el cemento Portland, antes de que se le agreguen modificadores. El sulfato de calcio en su presentación dehidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) denominado como yeso o en su presentación anhídrido conocido como anhidrita, se agregó al cemento Portland, con el objetivo de retardar el tiempo de endurecimiento del Clinker, evitando la reacción casi inmediata de fraguado conocido como “flash set”⁽¹⁰⁾.

Actualmente, Carita *et.al*¹² evaluó las propiedades del Clinker Angelus a partir de la adición de 30% tungstato de calcio (CaWO_4) como un radiopacificante sobre las propiedades fisicoquímicas del Clinker con diferentes tamaños de partícula de 2 a 30 μm y $<2 \mu\text{m}$, en donde el tiempo de fraguado final para el Clinker de 2 a 30 μm fue más extenso en relación con el Clinker $<2 \mu\text{m}$, así mismo, el valor de radiopacidad cumple con los 3 mm de aluminio de acuerdo a la norma ISO 6876:2012⁽¹³⁾.



Figura 2 Presentaciones comerciales de ProRoot y MTA Angelus®
(James Brozek)



Figura 3 Polvo ProRoot MTA gris y blanco
(James Brozek)

3.1.1.3 Decoloración o discromía

El MTA inicialmente se comercializó en presentación “gris” (GMTA), en donde el óxido de hierro tiene relación con el cambio de color o discromía, motivo por el cual se introdujo el MTA blanco (WMTA), eliminando este componente, además integra menos óxidos metálicos tales como el aluminio, MgO y FeO, no obstante, se ha demostrado que tanto el GMTA como el WMTA ocasionan pigmentación, de acuerdo en un 60% de casos clínicos que han reportado pigmentación en los órganos dentarios y encías ⁽¹⁴⁾.

En estudios recientes, se ha demostrado que uno de los mecanismos de discromía es la interacción entre el óxido de bismuto, el colágeno del tejido dental y el hipoclorito de sodio, en donde, el bismuto en forma de óxido, sedimenta en un bismuto metálico, ocasionando la pigmentación en las coronas clínicas ¹⁴⁻¹⁶. Otro posible mecanismo, es en relación con la oxidación e incorporación del hierro dentro del polvo de WMTA en la fase aluminoferrita de calcio del cemento fraguado. Por otro lado, la presencia de óxido de bismuto y la liberación de iones de los metales, son factores principales que ocasionan la pigmentación ⁽¹⁷⁾.

De tal modo que, el GMTA o el WMTA no deben ser utilizados en la zona anterior, debido a que el GMTA ocasiona pigmentación 1 mes después del tratamiento, mientras que a los 3 meses es sumamente perceptible la pigmentación por el WMTA (14–17).

3.1.1.4 Morfología del cemento MTA

Camilleri *et.al* ⁵ examinó el tamaño de las partículas del cemento Portland en el polvo WMTA mismas que oscilan entre $<1 \mu\text{m}$ a $30\text{-}50 \mu\text{m}$, mientras que las partículas de óxido de bismuto son de aproximadamente de $10\text{-}30 \mu\text{m}$. Komabayashi *et.al* ⁽⁸⁾ observó que el tamaño es más homogéneo en el WMTA en comparación con el GMTA. (Figura 4)

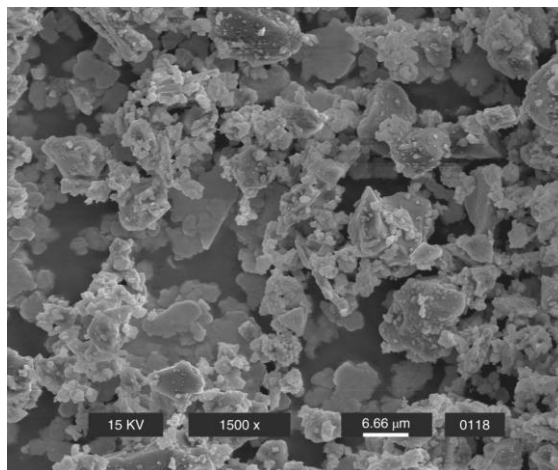


Figura 4 Micrografía electrónica de barrido del polvo de MTA (Lee et al, 2004)

Particularmente en la forma, las partículas son irregulares similares a una aguja, Dammaschake *et.al* ¹⁹, por medio de una micrografía electrónica de barrido se observó en el WMTA un tamaño de partículas más uniforme y pequeño en comparación con el cemento Portland. Las partículas de polvo iniciales en MTA son más pequeñas que las del cemento Portland, las partículas contenidas en el MTA fraguado (hidratado) también son más pequeñas que en el cemento Portland ordinario. En general, la fracción de cemento Portland de MTA parece ser más refinada que el cemento Portland industrial ordinario. (Figura 5)

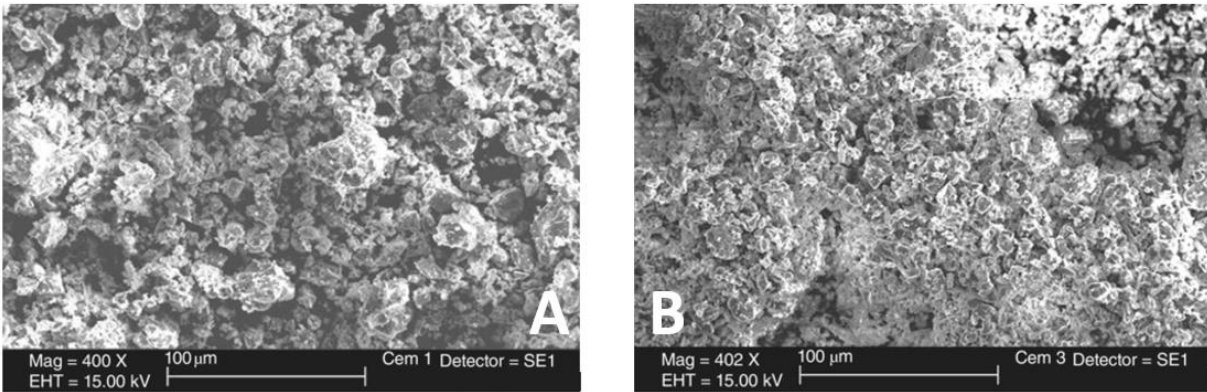


Figura 5 Comparación de micrografía electrónica de barrido de (A) Cemento Portland y (B) MTA (Dammaschke et al, 2005)

3.1.1.5 Manipulación

Las presentaciones de MTA que han sido utilizadas por más tiempo en la práctica clínica corresponden a aquellas que consisten en un polvo, generalmente de base cementante, el cual debe mezclarse con agua estéril antes de su aplicación. La manipulación implica mezclar 3 medidas de polvo por una medida de agua estéril (3:1), sobre una loseta limpia y fría con una espátula, se hidrata el material obteniendo una mezcla homogénea de consistencia arenosa poco seca ²⁰, favoreciendo las propiedades fisicoquímicas de los materiales hidráulicos.

3.1.1.6 Mecanismo de acción

Un material bioactivo constituido por silicato de calcio se caracteriza principalmente por su capacidad de formar una capa superficial con características semejantes a la apatita al entrar en contacto con fluidos fisiológicos *in vivo* o con fluidos corporales simulados *in vitro*.

El MTA es un material compuesto principalmente por calcio y silicato, que al ser utilizado y gracias a su bioactividad, que definimos como “la acción biológica a partir de la unión entre el material y los tejidos en el medio oral (fluidos)” (8,21-23) :

- Forma hidroxiapatita o apatita carbonatada en la superficie del MTA, favoreciendo al sellado biológico.
- Promueve un ambiente alcalino incompatible con la supervivencia de las bacterias en las paredes de los conductos radiculares.
- Promueve la acción de las células de reabsorción, debido a la eliminación de agentes patógenos, lo que favorece la reparación del ligamento periodontal.
- Fomenta la diferenciación y migración de células productoras de tejido duro.
- Modula la producción de citoquinas y modula temporalmente la acción de las células clásticas.
- En el tejido pulpar se origina la proliferación, migración y diferenciación de células similares a los odontoblastos.
- En estudios con fibroblastos gingivales proponen la capacidad del MTA para estimular la producción del factor de crecimiento.

Sarkar *et. al* ²⁴ en su investigación detectaron la presencia de una capa blanca presente entre las paredes del conducto radicular y el MTA, mediante un análisis de energía dispersiva de radiografías se concretó una estructura constituida por calcio, fósforo y oxígeno, similar a la hidroxiapatita.

La apatita carbonatada o biológica se forma sobre el MTA, lo que señala la bioactividad del material.

3.1.1.7 Propiedades físicas y químicas

3.1.1.7.1 Tiempo de fraguado

El agregado de trióxido mineral es un cemento auto fraguable ²⁵, cuya principal desventaja en el manejo clínico del material se centraba en el largo tiempo de fraguado; donde inicialmente era de 74h. Es decir, un tiempo de fraguado extenso representa grandes consecuencias tales como, mayor solubilidad y pérdida de material durante su colocación, dando como resultado mayor posibilidad de microfiltración y un tratamiento fallido ^(20–22,24–26).

La reacción de fraguado consiste en la hidratación del silicato tricálcico y dicálcico, con la posterior formación de hidróxido de calcio y un hidrogel de silicato de calcio ⁽²⁷⁾.

La velocidad de reacción en el tiempo de fraguado, es controlado por la cantidad de sulfato de calcio, en donde si se reduce su porcentaje en la composición química del MTA favorece al acortamiento del tiempo, pero altera negativamente la resistencia a la compresión y ocasiona discromía ²⁸; por ejemplo, cuando es mezclado con una solución de lactato de calcio el tiempo de fraguado disminuye de 108 min a 13.9 min, mientras que con aceleradores como el cloruro de calcio disminuye hasta 74 min, o cuando es mezclado con fosfato de sodio monobásico el tiempo se reduce de 151 min a 26 min ⁽²⁹⁾.

El tiempo de fraguado lento del MTA, representa un inminente problema respecto al manejo clínico del material, por esta razón, los nuevos materiales dentales han modificado su composición química con el objetivo de acelerar considerablemente el tiempo de fraguado.

En un estudio reciente se ha demostrado que al alterar la superficie del MTA con ácido cafeico $C_9H_8O_4$, reduce el tiempo de fraguado de 123 min a 58 min, además posee efecto osteogénico, angiogénico así como diferenciación celular ⁽²⁸⁾.

3.1.1.7.2 pH

El MTA consiste en un polvo fino que solidifica en presencia de agua, dando como resultado un gel coloidal con un pH de 12.5 convirtiéndose en una estructura rígida ⁽¹⁻³⁾.

Al proveer agua, las fases cristalinas del Clinker forman Silicato Cálcico Hidratado (CSH) e Ca(OH)_2 dando lugar a un ambiente alcalino con un pH de 12 ⁽³⁰⁾.

3.1.1.7.3 Solubilidad

El MTA es un cemento hidráulico que experimenta una reacción de hidratación y en las partículas ocurre un fenómeno de “disgregación” o “desintegración”. Aunque el término “solubilidad” hace referencia a la propiedad de una sustancia en disolverse en otra; los cementos hidráulicos presentan “disgregación” o “desintegración”, ya que hace mención al porcentaje de material que se desprende de una muestra en un tiempo preciso al ser sumergida en agua. En este texto se utilizará el término “solubilidad” para hacer mención de esta reacción, a pesar de su imprecisión técnica.

La relación polvo-agua influye en la solubilidad del cemento, así como en las propiedades mecánicas ^(3,31). Además, el óxido de bismuto influye en el incremento de la solubilidad, como consecuencia de la disminución de su resistencia mecánica y el aumento de la porosidad ⁽³²⁾.

Según Fridland *et.al* ³¹ el grado de solubilidad aumenta proporcionalmente con la cantidad de agua utilizada en la preparación del MTA. Diversos autores discrepan en los estudios donde se evalúa esta propiedad. Viapiana *et. al* ³³ en su investigación, obtuvo que la solubilidad del MTA corresponde a un 14.49% mientras que Vitti *et.al* ³⁴, informó que MTA cumple con los requisitos de la norma ISO 6876/2001⁽¹³⁾. El sellador MTA posee baja solubilidad debido a la matriz de sílice cristalina que preserva su integridad aún en presencia de agua, además presentan una alta solubilidad, cambios dimensionales y estructurales después de entrar en contacto con el agua, por lo tanto, es sumamente importante que la aplicación clínica sea cuidadosa en especial en tratamientos con ápices abiertos. Ha *et.al* ³⁵ realizó una revisión de las propiedades del MTA, en donde

encontró que es más soluble en agua destilada que en soluciones isotónicas. Vergalito *et. al* ³⁶, en su estudio de solubilidad en agua encontró disminución de masa del 3.3% a las 24h y presencia de sólidos en un 6.4%, lo que indica que durante la prueba acontece la solubilización del material y la incorporación del material, lo que dificulta medir correctamente esta propiedad.

Sin embargo, pese a la diversa literatura, Leonhardt *et.al* ³² menciona que los materiales selladores de conductos presentan limitaciones al ser un material higroscópico con una composición química a base de agua, debido a las normativas actuales para el estudio de la solubilidad, además para una correcta evaluación del MTA debería fraguar en condiciones similares al medio bucal.

3.1.1.7.4 Resistencia a la compresión

De acuerdo con su composición química el silicato dicálcico se hidrata con mayor lentitud en comparación al silicato tricálcico, debido a esto alcanza su máxima resistencia a la compresión a los 21 días ^(1,3,4,32).

La resistencia a la compresión ha sido una de las propiedades más estudiadas y comparadas con los cementos Portland. Se ha observado que ambos cementos presentan a los 3 días una resistencia a la compresión de 50 MPa y a los 28 días de 100 MPa, concluyendo que los cementos Portland presentan menor resistencia a la compresión ^(1,3,4).

Además, se ha analizado que esta propiedad mecánica puede alterarse como consecuencia de la exposición a un pH ácido.

3.1.1.7.5 Radiopacidad

Como se ha mencionado, el óxido de bismuto es un radiopacificador que permite la identificación radiográfica del cemento ³⁷, según el método descrito por la Organización Internacional de Estandarización, la radiopacidad media del MTA es de 7.17 mm de espesor de aluminio (Al), así mismo, es el principal factor de discromía en las coronas clínicas. Camilleri *et. al* ³², determinó que el MTA en su composición presenta 21.6% de óxido de bismuto, el MTA Angelus contiene 14% de óxido de bismuto, por lo que presenta una menor densidad radiográfica.

Diversos investigadores han propuesto el uso de agentes radiopacificadores, como el yodoformo, el óxido de zirconio, el circonato de bario, el sulfato de bario y el óxido de tantalio. No obstante, dichos materiales provocan cambios adversos en las propiedades del MTA, motivo por el cual el bismuto sigue siendo el principal radiopacificador en las marcas comerciales; así mismo, la patente de MTA estableció un 20% en peso para el trióxido de bismuto, en donde los valores de radiopacidad se distribuyen entre 1.25 mm de Al y 5.95 mm de Al ⁽⁴⁾.

3.1.1.7.6 Sellado apical, microfiltración, adaptación marginal

El éxito del material endodóntico depende de su capacidad de sellado. Se han llevado a cabo múltiples estudios para verificar el sellado y la prevención de la microfiltración en el MTA, a partir de diversos métodos, como microfiltración por tinción, penetración bacteriana y/o de fluidos, réplicas, entre otros ⁽¹⁾.

En estudios, se ha reportado que el MTA presenta gran capacidad de liberación de ion hidroxilo (OH⁻), lo que incrementa el pH y Ca²⁺, es decir, mejora la biocompatibilidad del material, lo que conlleva la disminución de microfiltración.

En investigaciones recientes, se ha reportado que el espacio entre el MTA y la pared del conducto radicular oscila entre 1.05 y 8.17 μm ⁽³²⁾.

De acuerdo a diversas investigaciones, el barrillo dentinario da lugar a una menor microfiltración, ya que al usar sustancias quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) aumenta la calidad del sellado ⁽³²⁾.

Xavier *et. al* ³⁸, en su estudio utilizando la técnica de penetración de colorante (nitrate de plata) y microscopio electrónico de barrido (MEB) determinó el sellado apical de MTA, Super-EBA y Vitremer, en donde los resultados de MEB mostraron una brecha menor con MTA, mientras que la penetración de colorante arrojó que MTA y Super-EBA mostraban menor microfiltración en comparación a Vitremer.

Vajja *et. al* ³⁹, comparó la microfiltración a partir del tamaño de la brecha entre el material de obturación y las paredes dentinarias del MTA e IRM, en donde demostró que el espesor de 2 mm de MTA, 3 mm de cemento de ionómero de vidrio modificado con resina (RMGIC) y 4 mm de IRM evitan la microfiltración, así mismo, concluyó que el MTA presentó mejor capacidad de sellado.

Mokhtari *et. al* ⁴⁰, evaluó y comparó la adaptación marginal entre MTA y cerámica fría utilizando MEB, en donde midió el espacio más grande creado entre la interfaz de material y la pared dentinaria después de 24h, obteniendo un espacio marginal menor en la cerámica fría; sin embargo, la diferencia entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa.

Jovanovic *et. al* ⁴¹, contrastó la adaptación marginal entre MTA, Biodentine y amalgama por medio de MEB, a partir del tamaño creado entre el material y la pared del conducto radicular en secciones longitudinales, concluyendo que el espacio fue menor en MTA y mayor en amalgama.

3.1.2 Viabilidad celular

La viabilidad celular se define como el número de células vivas en una muestra y/o población; permite el control de calidad para instaurar el momento óptimo de utilización de dichas células ⁽⁴²⁾.

Los métodos utilizados para determinar la viabilidad celular son comunes para la detección de la proliferación celular, además se basan en diversas funciones celulares (43):

1. Evaluación de la integridad de la membrana celular:
 - Métodos de sustancias colorantes o fluorescentes.
 - Métodos de tinciones catiónicas.
 - Métodos basados en la liberación de sustancias al medio extracelular.
2. Ensayos funcionales:
 - Cuantificación de los niveles de adenosín trifosfato (ATP), a través de la prueba 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) – 2,5-difenil-2h-tetrazolio (MTT).
 - Síntesis del nuevo ADN.
 - Detección de proteínas (proliferación celular).
 - Métodos biosensores de fluorescencia (marcadores de proteínas).
3. Métodos de acuerdo a la morfología celular:
 - Métodos de microanálisis por energía dispersiva de rayos X.
 - Métodos de determinación de la expresión génica (microarrays).

3.1.2.1 Ensayos funcionales

Los métodos para estimar la viabilidad celular se basan en la medición de un indicador de la actividad metabólica (44):

3.1.2.2 Método mediante la cuantificación de ATP: ensayo MTT

La prueba con (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difenil-2h-bromuro tetrazolio) o MTT es el estándar de oro de los ensayos de citotoxicidad y recuento de proliferación celular por

ser un ensayo colorimétrico rápido, fácil de efectuar y de resultados consistentes, utilizando bromuro debido a su correlación directa de funcionalidad mitocondrial y supervivencia celular, es decir, presenta mayor sensibilidad en comparación con otras pruebas que evalúan citotoxicidad ^(45,46).

El ensayo MTT implica la conversión enzimática del colorante (color amarillo) del tetrazolio a cristales de formazán (color morado) insolubles en agua, principalmente por deshidrogenasas succínicas mitocondriales. Además, pueden estar implicadas enzimas citosólicas como la nicotimida adenina dinucleótido (NADH) reductasa y flavina oxidasa. La tasa de la conversión de formazán ha demostrado estar en relación directa con el número de células vivas ⁽⁴⁴⁾.

El MTA ha demostrado buena viabilidad celular y bioactividad, pero algunas investigaciones indican que el Bi_2O_3 es ligeramente citotóxico y promueve la muerte celular en concentraciones altas ⁽⁴⁷⁾. El trióxido de bismuto nanométrico induce estrés en las células de los fibroblastos gingivales, genera cambios en la morfología celular, pero no altera la viabilidad celular. El trióxido de bismuto desencadena la proliferación celular en concentraciones de 15% y 25%, particularmente en las células de tejido periodontal presentan una proliferación baja ⁽⁴⁾.

Se han estudiado las propiedades de biocompatibilidad de los cementos MTA, debido a que es indicado en el tratamiento con pulpas vitales (terapia pulpar vital). Las células madre de la pulpa dental (DPSC) son trascendentes en el transcurso de sanación del tejido, debido a su capacidad de transformación de un tipo celular a otro, particularmente a odontoblastos. Las DPSC se denominan clonogénicas, son células capaces de generar una réplica exacta de otra célula, a este proceso se le conoce como capacidad de autorrenovación y diferenciación multifacética. Las DPSC actúan sobre los traumas dentales en donde al diferenciarse y adherirse a células iguales a los odontoblastos se forma dentina terciaria, lo que conlleva la formación de puentes de dentina. Por tal motivo, este cemento debe ser biocompatible con las células de la pulpa dental ^(4,48).

El mecanismo biológico del MTA está asociado con el aumento del pH, ocasionando una lesión inicial (muerte celular) desencadenando a la quimio atracción de proteínas, enzimas y células para su posterior reparación y mineralización ^(4,48).

3.1.3 Bioactividad

La bioactividad en el ámbito científico, se define como “una acción biológica en la interfase del material con intercambio de iones de naturaleza físico química, originada a partir de la formación de la unión entre el material y los tejidos al entrar en contacto con el medio oral (fluidos)”^{8,23}, por lo que el MTA es considerado un material bioactivo, debido a que durante su proceso de hidratación se produce hidroxiapatita. Además, el MTA posee una propiedad osteoinductiva intrínseca, si hay un proceso cercano de cicatrización óseo. La bioactividad del MTA se atribuye a la capacidad de liberar iones de calcio (Ca_2) y producir precipitados cristalinos de portlandita (hidróxidos de calcio) que sirven de nucleación para la formación de apatitas al estar en contacto con los fluidos fisiológicos que contienen fosfato^(8,23).

Los materiales de reparación radicular en endodoncia desempeñan un papel fundamental en el tratamiento de superficies radiculares dañadas o perforadas. El pronóstico de la reparación de la perforación depende de diversos factores tales como; la ubicación, el tamaño de la perforación, el tiempo transcurrido antes de la perforación, la contaminación previa de la lesión y la biocompatibilidad del material de reparación.

El agregado de trióxido mineral (MTA) es uno de los materiales de reparación endodóncica más utilizados debido a su biocompatibilidad, inducción de la formación de tejido mineralizado similar a la dentina en la interfaz con la dentina. En donde su tamaño de partícula a escala nanométrica permite un mejor acoplamiento a las irregularidades en el sitio de la perforación, dando lugar a un sellado hermético y estable, además, permiten una mejor interacción con las células y los tejidos, concediendo la formación de un puente dentinario biológicamente activo, mejorando el proceso regenerativo natural.

Los materiales derivados del silicato de calcio como el MTA tienen la capacidad de inducir la proliferación de fibroblastos periodontales, permitiendo la diferenciación de células de la pulpa dental, osteoblastos, células madre mesenquimatosas y cementoblastos, es decir, promueven la diferenciación de células madre mesenquimatosas induciendo a la reparación periapical^(23,49).

La formación de la capa de apatitas en la superficie, de acuerdo a diversos estándares y estudios, debe ser evaluada a través de difracción de rayos x de haz rasante y puede ser complementada con EDS acoplada a un microscopio electrónico de barrido, para observar las imágenes características de las apatitas, así como una semicuantificación de la relación P/Ca ⁽⁵⁰⁻⁵²⁾.

Se realiza para evaluar la formación de depósitos de fosfato de calcio en la superficie de los materiales (capacidad de formación de apatita). Inmediatamente después de la preparación de la muestra, se sumergen individualmente los discos en 40 mL de HBSS (fluido corporal simulado), se almacenan a 37°C durante 28 días. En donde el HBSS se renueva semanalmente.

Posteriormente la superficie de cada disco se examina en estado seco mediante microscopio electrónico de barrido ambiental, conectado a un detector de electrones secundarios para el análisis de rayos X de energía dispersiva (EDX) con software controlado por computadora a bajo vacío (100 Pascal) voltaje de aceleración de 20 kV, distancia de trabajo de 8.5 mm, nivel de detección de 0.5% en peso, resolución de 133 eV, tiempo de aumento de 100 microsegundos, tiempo de medición: 600 s para el mapeo de elementos y 60 s para los espectros.

La apatita es un compuesto mineral que es un componente importante tanto del hueso como del esmalte dental. Por lo tanto, la capacidad de formación de apatita de un material de reparación de perforaciones es una característica necesaria que se relaciona con su bioactividad y capacidad para promover la curación y regeneración de tejidos ⁽⁴⁹⁾.

3.1.3.1 Hallazgos de bioactividad

La evaluación EDX de los materiales probados proporciona la composición elemental cualitativa y semicuantitativa. El análisis elemental revela la composición principalmente de carbono (C), oxígeno (O), calcio (Ca) y silicio (Si) ⁽⁵³⁾.

Varios estudios han demostrado que los materiales a base de silicato de calcio tienen la capacidad de formar depósitos de apatita (cristales de fosfato de calcio) en su superficie

cuando entran en contacto con fluidos corporales. Los cristales de apatita de calcio y fosfato permiten la regeneración y remineralización de los tejidos duros adyacentes cuando se aplica un material a base de silicato de calcio como material de reparación de perforaciones.

Los resultados del análisis EDX muestran que el MTA desarrolla una capa rica en fosfato de calcio que contiene iones de carbono después de la inmersión en una solución fisiológica simulada. La solución salina balanceada de Hanks (HBSS) se utilizaba como solución de almacenamiento para simular el entorno clínico ⁽⁵³⁾.

3.1.4 Nanomateriales

En 2011, la Comisión Europea ⁵⁴ adoptó la definición de *nanomaterial*, siendo un material natural, accidental o fabricado con partículas, sueltas o unidas, en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presentan una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre un nanómetro y 100 nanómetros ^(55,56). En casos específicos y cuando se justifique por preocupaciones de medio ambiente, salud, seguridad o competitividad, el umbral de la granulometría numérica del 50% puede sustituirse por un umbral comprendido entre el 1% y el 50%. Los nanomateriales son materiales que contienen partículas con una o más dimensiones en la nanoescala, es decir: el nanómetro (nm) equivale a una milmillonésima parte de un metro ($1 \text{ m} = 10^{-9} \text{ m}$) ^(55,57-59).

Particularmente, en materiales dentales y biomateriales el tamaño nanométrico de una partícula puede influir de forma significativa de una estructura en el comportamiento físico, químico y biológico.

3.1.5 Nanotubos de carbono (carbon nanotubes, CNT's)

En 1952, surgieron los primeros indicios de la existencia de los nanotubos de carbono, debido a la difusión de imágenes de dicha estructura, en el diario oficial de química y

física de la Unión Soviética, sin embargo, sucedió durante la guerra fría, y no fue relevante al ser publicado en su idioma oficial ⁽⁵⁴⁾. Años más tarde en 1991, fueron descubiertos accidentalmente por S. Iijima ^{51,52,54-57}, ya que en un principio se pensó que eran fullerenos.

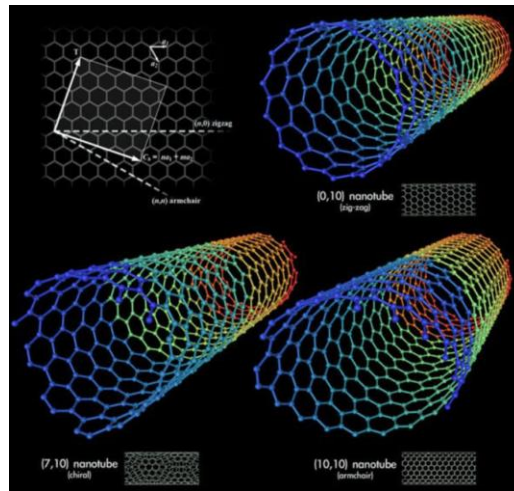


Figura 6 Diagrama de nanotubos de carbono (Nanotec)

3.1.5.1 Estructura

Posee una estructura alotrópica del carbono, el nombre se destina a los nanotubos de carbono o CNT's, por sus siglas en inglés (Carbon Nanotubes); cuya configuración del nanotubo deriva del enrollamiento de la hoja de grafeno sobre sí misma, formando una estructura cilíndrica hueca unidimensional, cubiertos o destapados en los extremos. Presenta diámetros entre 1 y 50 μm y longitudes en la escala nano, micro o incluso milimétrica, de aspecto muy grande con relación a la longitud/diámetro, incluso pudiendo ser mayores a 10^4 ⁽⁵⁶⁾.

Existen diferentes tipos de nanotubos de carbono en función de las capas de grafeno que los conforman ^(54,55,57,60-62): (Figura 7)

- Nanotubo monocapa o SWNT (Single/Walled Nanotube): integrado por una hoja de grafeno o pared simple.

- Nanotubo de doble capa o DWNT (Double-Walled Nanotube): nanotubo conformado por doble capa de grafeno.
- Nanotubo multicapa o MWNT (Multi-Walled Nanotube) nanotubo constituido por más de dos capas o pared múltiple, con un espacio de 0.34 μm entre capas, además son los más utilizados en el campo del MTA

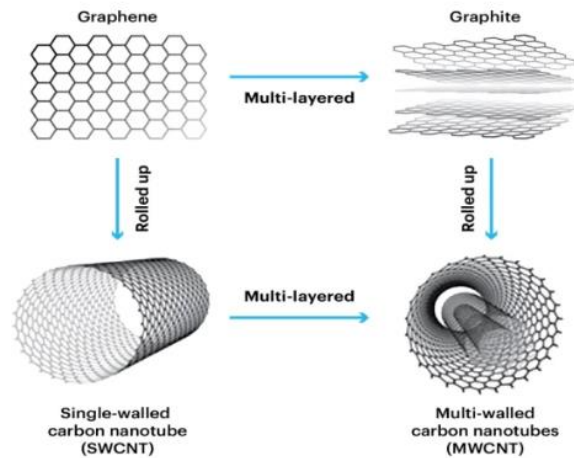


Figura 7 Estructura de Nanotubos de carbono
[\(https://cnanotube.com/es/what-are-multi-walled-carbon-nanotubes-structure-properties-and-applications/\)](https://cnanotube.com/es/what-are-multi-walled-carbon-nanotubes-structure-properties-and-applications/)

3.1.5.2 Propiedades

Las propiedades de los CNT's, dependen en gran medida de su morfología, tamaño y diámetro; son materiales química y térmicamente estables, presentan una elevada elasticidad, conductividad eléctrica y térmica, alta relación resistencia-peso y baja densidad, gran resistencia a la deformación y al estiramiento ⁽⁵⁶⁾.

Sin embargo, la principal desventaja es su tendencia a formar aglomerados debido a su alta energía superficial, por lo que el principal reto al ser utilizado es lograr su adecuada dispersión durante el procesamiento ⁽⁶⁰⁾.

3.1.5.3 Funcionalización de nanotubos de carbono

La *funcionalización* se define como la modificación de propiedades como consecuencia de la adsorción de átomos o moléculas en las paredes externas de los nanotubos de carbono. Se obtienen cambios en las propiedades físicas de la superficie de las nanopartículas, como lo son la solubilidad y dispersión, ambas propiedades son importantes, debido a que conceden la interacción con las moléculas biológicas ⁽⁶¹⁾. El proceso da inicio por moléculas de alta reactividad química como el flúor, posteriormente se sustituyen los átomos de flúor por grupos, amino, alquilo o hidroxilo. La funcionalización llevada a cabo por grupos de ácido carboxílico (-COOH) o hidroxilo (-OH) son utilizados como precursores de silanización, esterificación, tiolación, alquilación y arilación, además se ha demostrado que los nanomateriales muestran una excelente interacción con la matriz polimérica.

Las fuerzas de Van der Waals entre los CNT's originan la formación de haces aglomerados más grandes, dificultando su dispersión en agua, en disolventes orgánicos o en matrices poliméricas ⁽⁶¹⁾.

La modificación de la superficie de los CNT's es un método eficaz, para mejorar su dispersabilidad, categorizada en ^(61,62):

- Covalente (oxidación ácida, tratamiento con plasma, halogenación, injerto covalente de polímeros); Se introducen grupos funcionales creando enlaces con los CNT's, la unión sucede a partir de la adsorción y la exposición de interacciones de tipo n-n con los CNT's; por ejemplo, la funcionalización con ácidos carboxílicos y aminas.
- Las modificaciones no covalentes: (interacciones π - π , hidrofóbicas-hidrofílicas, interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, modificación de neopartículas inorgánicas, modificación de polímeros no covalentes); Se basan en la adsorción de moléculas como surfactantes, compuestos aromáticos y polímeros como poliacrilamida, poliestireno. Particularmente, el MWCNT's, presenta excelentes resultados en su dispersión, al utilizar ácido maléico y anhídrico maléico.

La funcionalización por medio de enlaces covalentes ha resultado muy prometedora, debido a que se origina un enlace fuerte entre los grupos funcionales adicionados y los SWCNT's.

El MTA, presenta un papel importante en diversas aplicaciones clínicas, sin embargo, no está exento de sus desventajas como la fragilidad, escasa resistencia al agrietamiento. Con el propósito de mejorar las deficiencias del MTA, se ha descubierto tras diversos estudios y experimentos, que las propiedades mecánicas y durabilidad han mejorado significativamente al agregar nanotubos de carbono; debido a sus propiedades físicas, surgiendo como nanorellenos que atribuyen propiedades mecánicas y térmicas ⁽⁶²⁾.

3.1.5.4 Aplicaciones

Las propiedades fisicoquímicas de los CNT's tales como sus propiedades estructurales, electrónicas, físicas, ópticas, electromecánicas y mecánicas, lo han posicionado como un elemento importante en la nanociencia. Estas propiedades lo hacen el material prometedor en diversas aplicaciones, tales como el almacenamiento de energía, sensores químicos y bioquímicos, liberadores y transportadores controlados de medicamentos y bio-composites, purificador de destilados de petróleo y como filtros de contaminantes bacterianos (*Escherichia coli* y poliovirus) en agua, superficies hidrofóbicas, en película delgada para transistores, dispositivos optoelectrónicos y dispositivos nano-electrónicos y biosensores a base de estos nanomateriales ⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾.

3.1.5.4.1 Aplicaciones médicas

La nanomedicina es una disciplina reciente, en la cual la síntesis de nanofármacos con diversas aplicaciones; se encuentra en investigaciones, principalmente los nanotubos de carbono modificados, debido a sus excelentes propiedades. En estudios *in vitro*, se confirma que el tamaño nanométrico, composición química, superficie de

funcionalización y dispersión contribuye a la administración y transporte de fármacos ⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾.

En estudios de fármacos anticancerígenos y antivirales analizaron los métodos de transporte, uno de los transportes de los CNT's que llevan a cabo es la ruptura de membrana debido a que actúan como aguja; otro tipo de transporte es por endocitosis cuando los CNT's son funcionalizados con moléculas más grandes ⁽⁵⁸⁾.

Los MWCNT's en el sistema MWCNT's-PCA-PTX, manifiestan propiedades biológicas interesantes, es decir, inicialmente los MWCNT's fueron funcionalizados con ácido policítrico (PCA) con el objetivo de aumentar su naturaleza hidrofílica y funcionalidad con grupos carboxílicos. Posteriormente el paclitaxel (PTX) (agente anticancerígeno) es unido vía covalente en los sitios carboxilo del PCA, originando el sistema MWCNT's-PCA-PTX, con un 38% en peso de fármaco. Además, el PTX puede ser fácilmente liberado del sistema a un pH de 6.8 y 5.0, siendo compatible con la liberación en células y tejidos de tipo tumoral ⁽⁵⁸⁾.

La toxicología y la farmacología se encuentran íntimamente en lo que se refiere al proponer la nanomedicina a base de CNT's, debido a que deben realizarse estudios in vivo para determinar si la administración de los nanotubos de carbono no causa daño a las células del cuerpo humano ⁽⁵⁸⁾.

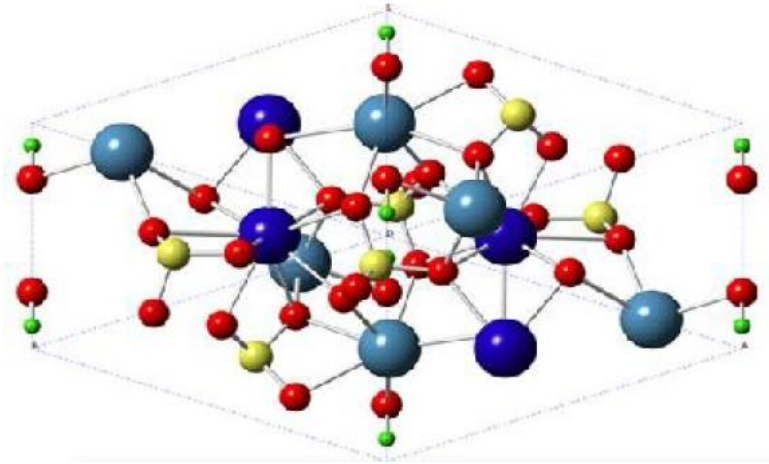
3.1.5.5 Síntesis de nanomateriales

La síntesis de nanomateriales, se realiza a partir de dos métodos ⁽⁶³⁾:

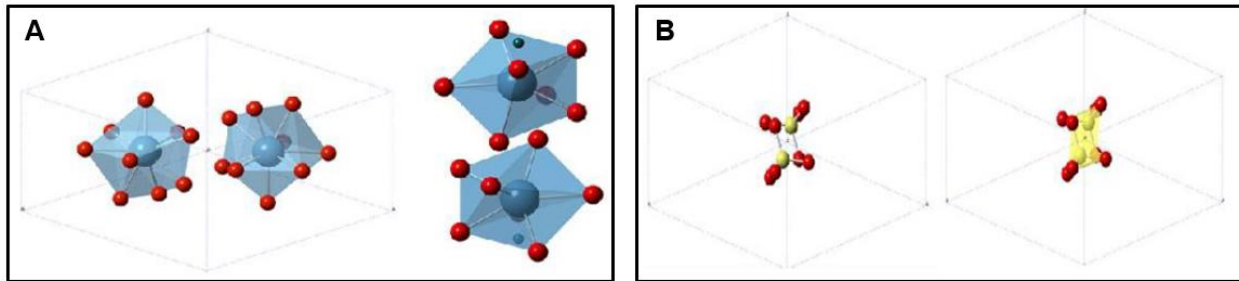
1. Método bottom-up: la síntesis de nanopartículas es a nivel atómico en donde se integran entre sí hasta la formación de nanomateriales.
2. Método top-down: se obtiene de manera macroscópica en donde se fracciona hasta llegar a la escala nano.

3.1.6 Hidroxiapatita

La hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ se compone por fosfato de calcio y un grupo hidroxilo con una relación molar de calcio y fósforo (Ca/P) de 1.67 ^(64,65). La hidroxiapatita tiene una estructura cristalina hexagonal, con parámetros de red $a=9.43 \text{ \AA}$ y $c=6.88$, como se representa en la figura 8, así como las posiciones de los iones en la celda unitaria de la hidroxiapatita, en la figura 9.



*Figura 8 HAp en celda hexagonal
(Gómez et al, 2017)*



*Figura 9 Posición de los iones en la celda unitaria A) Calcio B) Fósforo
A) Calcio 1 Número de coordinación 9 (izquierda) y Calcio 2 Número de
coordinación 7 (derecha). B) Fósforo, representado en tetraedros con 4 oxígenos
para formar el PO_4 (Número de coordinación 4)
(Gómez et al, 2017)*

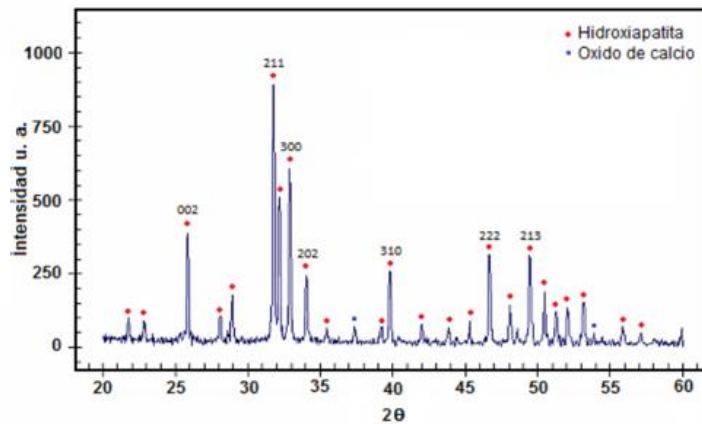


Figura 10 Patrón de difracción de la hidroxiapatita estequiométrica (Ratner, B D 2004)

La figura 10 representa el difractograma de la hidroxiapatita donde se aprecian las bandas correspondientes a los iones PO_4^{3-} , CO_3^{2-} y OH^- .

Tiene propiedades bioactivas, biocompatibilidad, osteoconductoras, no inflamatorias e inmunológicas, debido a esto es un material ideal para la reparación de tejidos duros, en aplicaciones ortopédicas y dentales siendo la hidroxiapatita estequiométrica quien ha promovido la regeneración ósea, en revestimientos de prótesis, regeneración de tejidos blandos (piel, músculos y encías), sistema de liberación de fármacos, terapia de genes, agente absorbente y purificación en cromatografía para la separación de proteínas, ácidos nucleicos y anticuerpos ^(64,65).

La composición química, cristalinidad, tamaño y morfología influye en sus propiedades y aplicaciones. La hidroxiapatita microestructurada presenta baja resistencia mecánica, baja tasa de biodegradación, es osteoinductiva y con carga relativa deficiente. Además de mejor capacidad de sinterización, mayor bioactividad lo que promueve la cicatrización ósea debido al favorecimiento de la adhesión y proliferación celular, así mismo presenta una mayor capacidad de reabsorción, tiene mejores propiedades mecánicas, mayor tasa de disolución, una mayor dispersabilidad y área superficial, confiriéndole mayor capacidad de carga y liberación de fármacos.

3.1.6.1 Estructura cristalina

Los átomos se encuentran agrupados en una unidad estructural denominada celda unidad, en donde, los átomos se encuentran ordenados de manera periódica de largo alcance ⁶⁶, como se muestra en la tabla 1, información obtenida de la base de datos cristalográfica Inorganic Material database (Atomwork).

Se originan catorce posibles puntos de red o “Redes de Bravais”, de acuerdo a la posición de los átomos en la celda unitaria y la posición de los planos cristalográficos. Así mismo, los materiales cristalinos durante el crecimiento pueden presentar modificaciones estructurales como dislocaciones, defectos de aplicación y defectos puntuales ^(66,67).

Tabla 1 Información cristalográfica de la hidroxiapatita (HAp), obtenido de Inorganic Material Database (AtomWork)

Información cristalográfica de la hidroxiapatita (HAp)	
Fórmula química	Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH)
Símbolo Pearson	hP44
Grupo espacial	P63/m
No.	176
Parámetros de celda	a= 0.9417 μm α = 90° b= 0.9417 μm β= 90° c= 0.6877 μm γ = 120°
Volumen de la celda	0.52 μm ³
Densidad de la celda (calculado)	3.16 Mgm ⁻³
Z	2

3.1.7 Difracción de Rayos X

La difracción de rayos X es un método analítico versátil y no destructivo utilizado para la caracterización de las propiedades de materiales orgánicos e inorgánicos como composición de fases, estructura, textura en donde otorgan información estructural relacionada al nivel de la celda unitaria y microestructural de materiales cristalinos

relacionados a los cristalitos ⁽⁶⁸⁾. Además, es utilizado en diversos campos de estudio biomédico, debido a su alta sensibilidad para detectar diversos elementos en los tejidos, particularmente nanopartículas ⁽⁵³⁾.

Los rayos X son ondas electromagnéticas de alta energía, en donde la longitud de onda oscila entre los 0.01 y 10 nm, de tal modo que se puede parangonar con las distancias interplanares de la estructura cristalina, dando como resultado el fenómeno de difracción.

3.1.7.1 Componentes principales del difractómetro

Constituido por un tubo al vacío en el que contiene un filamento de tungsteno (cátodo) y un bloque de cobre (ánodo) en los que la diferencia potencial oscila entre 30 kV y 50 kV. El filamento de tungsteno es calentado por una corriente de 3 Amperios, originando la emisión de electrones, los cuales son atraídos al bloque de cobre como consecuencia del alto voltaje. Los electrones son enfocados por la copa metálica. Además, algunos electrones de alta energía cinética desaceleran rápidamente generando radiación electromagnética, mientras que, otros electrones colisionan entre sí, en las capas internas de los átomos ^(69,70).

Cuando un electrón de la capa interna del átomo de cobre es golpeado por un electrón del filamento, el átomo es excitado como consecuencia del paso del electrón de la capa interna hacia un nivel más alto e incluso ionizando al átomo. Posteriormente, un electrón de la capa externa ocupa el lugar del electrón liberado, es decir, emite radiación dejando al átomo en un estado normal de energía. Por lo tanto, el espectro de la radiación emitida es constituido por radiación continua y radiación característica.

Los análisis de DRX necesitan radiación monocromática, motivo por el cual, se utiliza un filtro que absorbe la radiación continua y característica no deseada. Mientras que los rayos-X filtrados inciden sobre el material a analizar ^(69,70).

Consideremos la interferencia de los rayos X a partir de la dispersión por planos paralelos de átomos en un cristal separados por una distancia d , como se observa en la figura 11.

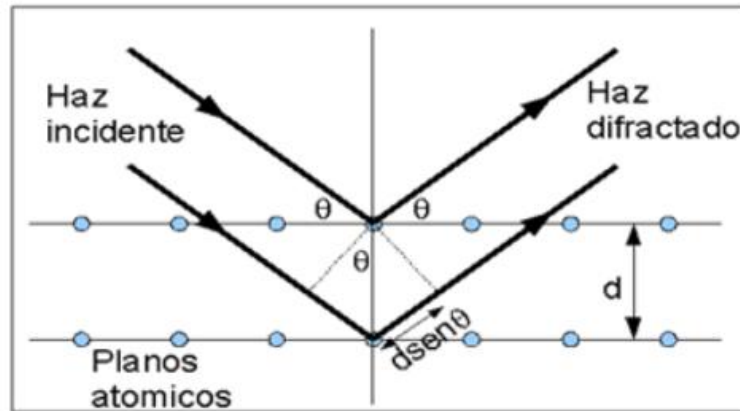


Figura 11 Difracción de Bragg

(<https://liquidossolidos607.blogspot.com/2014/01/difraccion-de-bragg.html>)

Al incidir una radiación se formará un ángulo θ con los planos, todos los átomos de un mismo plano darán origen a una interferencia constructiva si el ángulo de dispersión es igual al de incidencia. De igual manera, el rayo inferior transita una distancia adicional $2d \sin(\theta)$ en comparación al rayo superior. Si la distancia adicional es un número entero de longitudes de onda, $n\lambda$, los dos rayos reflejados estarán en fase originando una interferencia constructiva. Mientras que, el entero n se suele denominar número de orden.

Por tanto, los rayos interactúan con los electrones de los átomos, que a su vez son desviados de su trayectoria original. La difracción sucede cuando la diferencia de las trayectorias de las ondas es equivalente a un múltiplo de la longitud de onda. En esta instancia se cumple con la ecuación de Bragg.

La ecuación resultante, se denomina Ecuación de Bragg o Ley de Bragg fue postulada en 1913 por W.H Bragg y W.L Bragg, en donde se menciona que es una interpretación geométrica del fenómeno de difracción debido a interferencias constructivas, representada en la ecuación 1; ^(69,70).

$$2d \sin(\theta) = n\lambda \quad n = 1,2,3..$$

Ecuación SEQ Ecuación * ARABIC 1
Ecuación de Bragg

En donde d = es la distancia interplanar, θ = es el ángulo de la onda difractada, λ = es la longitud de onda del haz incidente y n = es el orden de interferencia ($n = 1, 2, 3, \dots$)

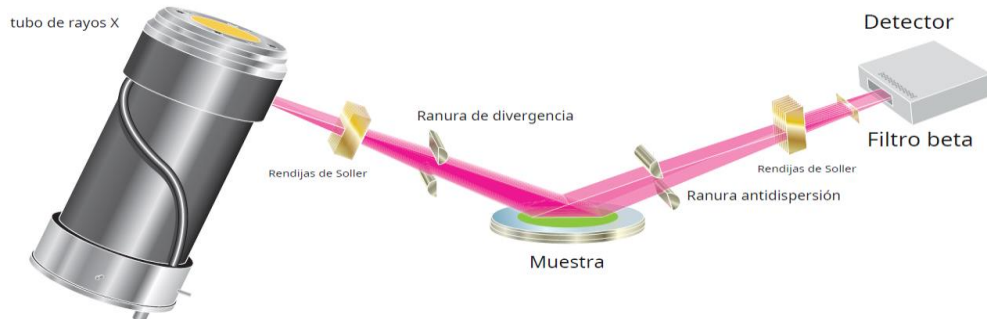


Figura 12 Configuración del difractómetro en la geometría Bragg-Brentano (PANalytical, 2011)

La difracción de rayos X, se emplea en ^(69,70):

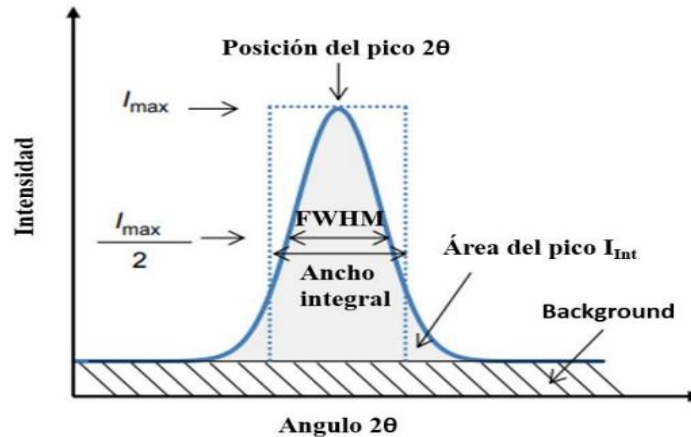
- Análisis cualitativos de fases
- Análisis cuantitativos de fases
- Grado de cristalinidad
- Cálculo de parámetros reticulares e indizado
- Tamaño de cristalitos y microdeformaciones
- Textura cristalográfica
- Tensiones residuales
- Análisis estructural

3.1.7.2 Ensanchamiento de los picos

La distribución de la intensidad en función del ángulo difractado (2θ), representa el parámetro extraído del análisis de difracción de rayos-X. La posición del pico, el fondo o *background* (intensidad máxima del pico), el ancho a media altura del pico (FWHM), el área bajo el pico y el ancho integral (ancho de un rectángulo de área correspondiente a

la intensidad y de altura igual a la intensidad máxima); son la información presente en el difractograma ⁶⁹, mismas que se representan en la figura 13.

Así mismo, estos puntos de referencia se dividen en tres grupos: posición, intensidad y perfil del pico, en donde cada categoría aporta información característica del material analizado ⁽⁶⁹⁾.

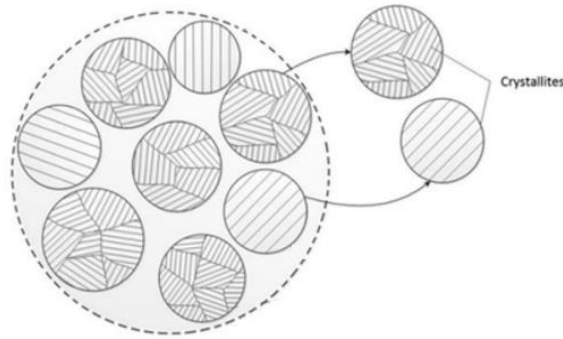


*Figura 13 Información presente en el difractograma, extraído de un pico de difracción de rayos-X
Epp, 2016*

El ensanchamiento de los picos (perfil del pico) es empleado para la determinación del tamaño promedio del cristalito. Sin embargo, la forma del perfil depende del ensanchamiento instrumental, así como de las microdeformaciones y el tamaño del cristalito ⁽⁷⁰⁾.

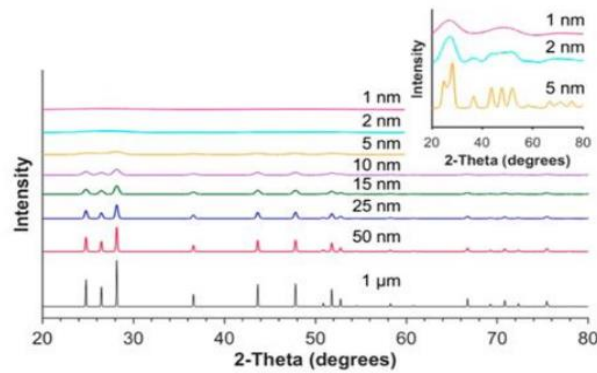
3.1.7.3 Tamaño del cristalito

El tamaño del cristalito, hace referencia al tamaño de un dominio coherente de difracción. Mientras que, el tamaño de una partícula está constituido por una agrupación de cristalitos ⁶⁷; como se representa en la figura 14.



*Figura 14 Comparación entre tamaño de cristalito y partícula
(Fan, Wen, Liu & Yang, 2018)*

La técnica de difracción de rayos-X, permite conocer el tamaño medio de cristalito el cual puede ser menor o igual al tamaño de la partícula, además cuanto menor sea el tamaño del cristalito mayor será el ensanchamiento de los picos ⁷⁰, tal y como se observa en la figura 15.



*Figura 15 Patrones de difracción de rayos-X en polvos simulada de partículas esféricas de wurtzite Cds de diferentes tamaños con rangos de 1μm a 1nm
La imagen de los patrones DRX a 1,2 y 5 nm está expandida en el eje-y
(Holder & Schaak, 2019)*

3.1.8 Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

3.1.8.1 Antecedentes del desarrollo del MEB

En 1933, dos científicos físicos Ruska y Knoll construyeron el primer microscopio electrónico conocido como *microscopio electrónico de transmisión (TEM)*, posteriormente en 1938, Von Ardenne agregó una bobina de barrido al TEM originando un *microscopio electrónico de transmisión de barrido (STEM)* con un voltaje de 23 kV, con aumento de 8000x y resolución de 50-100 μm , el cual se convirtió en un estándar, sin embargo, fue nula la producción del instrumento. En 1942, Zworykin, Hillier y Snyder desarrollaron una nueva presentación del MEB enfocado en las muestras gruesas. Oatley y su estudiante McMullan, en 1952 desarrollaron el microscopio electrónico de barrido (MEB) con lentes electrostáticas, con voltaje de 40 Kv para el cañón de electrones, no obstante, Smith agregó la amplificación de señales no lineales, así como el escaneo de doble deflexión para actualizar el sistema de escaneo.

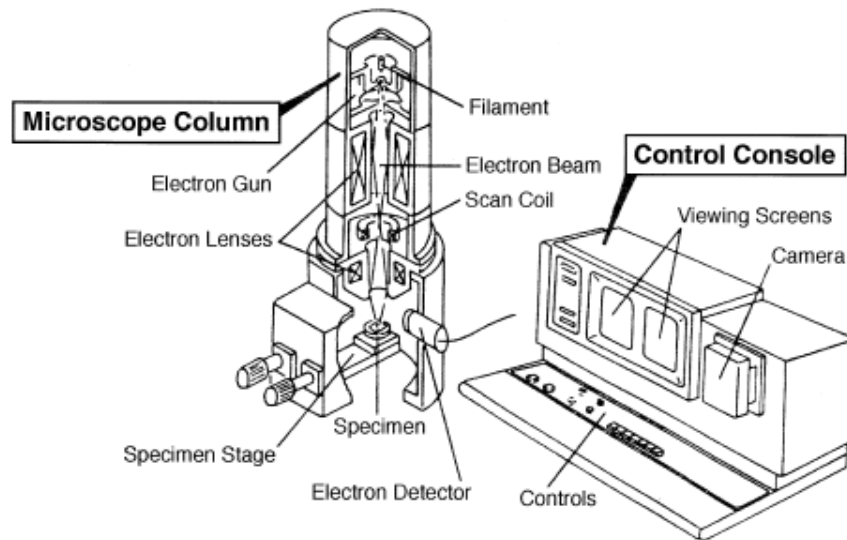
En 1963, Pease construyó el sistema MEB V con tres lentes magnéticas; comercializado desde 1965, bajo el nombre de "Stereoscan" de Cambridge Scientific Instruments Mark 1. En la actualidad ha tenido grandes avances como la sofisticación de las fuentes de electrones para la emisión de más electrones y la mejora de la calidad de la imagen.

Desde 1968, el espectrómetro de energía dispersiva (EDS) se utilizó en conjunto con MEB para medir los rayos X mediante un detector de estado sólido. La evolución más reciente de MEB es la generación digital de imágenes, la visualización de las imágenes en la computadora. Motivo por el cual, la mayoría de los MEB comerciales son equipados con el sistema EDS y un software el cual permite analizar los datos recibidos a partir de la conversión de la intensidad de la relación de rayos X a composiciones químicas en pocos segundos ⁽⁷¹⁾.

3.1.8.2 Componentes principales del MEB

La máquina MEB consta de los siguientes componentes ^(72,73) figura 16:

- a. Pistola de electrones, fuente para generar electrones de alta energía.
- b. Columna descendente para viajar los electrones a través de dos o más lentes electromagnéticos.
- c. Sistema de deflexión c, que consiste en bobinas de escaneo.
- d. Detector de electrones para electrones retrodispersos y secundarios.
- e. Cámara para la muestra.
- f. Sistema informático, consiste en la pantalla para mostrar las imágenes escaneadas y el teclado para controlar el haz de electrones.



*Figura 16 Las dos partes principales del MEB
La columna de electrones y la consola electrónica
(The Morning Call, Allentown, PA)*

El microscopio electrónico de barrido es constituido por siete sistemas operativos principales: vacío, generador del haz, detección, procesamiento de señales y visualización y registro, dichos componentes determinan los resultados y las cualidades de una micrografía, como el aumento, la resolución, la profundidad de campo, el contraste y el brillo ⁽⁷¹⁻⁷³⁾.

1. Sistema de vacío.

Se requiere vacío cuando se utiliza un haz de electrones debido a su rápida dispersión. Sin el vacío suficiente en el MEB, es imposible generar y controlar el haz de electrones, es decir, si hay oxígeno u otras moléculas, la vida del filamento se acorta drásticamente. Es fundamental el control y funcionamiento del sistema de vacío. Al cambiar las muestras, el haz debe apagarse y el filamento debe aislarse de la presión atmosférica por medio de válvulas. El vacío se obtiene eliminando tantas moléculas de gas como sea posible de la columna. La presión atmosférica a nivel del mar es igual a 760 mm Hg. Una presión de 1 mm Hg se denomina Torr. El vacío del MEB debe ser inferior a 10^{-4} Torr. Cuanto mayor sea el vacío (menor la presión), mejor funcionará el microscopio ^(72,73).

2. Sistema de generación de haz de electrones.

Localizado en la parte superior de la columna del microscopio, este sistema genera el haz de electrones “iluminador” conocido como haz primario de electrones. El cañón de electrones es integrado por tres componentes: 1) un filamento o cátodo hecho de alambre de tungsteno, cristal de hexaboruro de lantano (LaB6) o hexaboruro de cerio (CeB6), 2) un cilindro de Wehnelt que controla el flujo de electrones (polarización) y 3) una placa de ánodo con carga positiva para atraer y acelerar los electrones a lo largo de la columna hasta llegar a la muestra. De acuerdo al tipo de muestra y de la resolución necesaria, dependerá el voltaje el cual oscila entre 0.1 y 40 kV, la más común para muestras biológicas o sensibles al calor es de 10 Kv ^(72,73).

El sistema de generación de haces, consta de ⁽⁷³⁾:

- I. Interruptor principal de encendido y apagado para el alto voltaje, se puede denominar “HV” para alto voltaje o “HT” para alta tensión.
- II. Resistencia de polarización variable, para regular la corriente del haz.
- III. Fuente de alimentación de control de corriente de filamento, permite ajustar la corriente del filamento, proporcionando la corriente de calentamiento

necesaria para obtener un flujo constante de electrones para la emisión térmica.

La emisión térmica y la emisión de campo son dos tipos de emisión de haz.

La *emisión térmica* excita a los electrones del filamento, mediante calor. Existen tres tipos de filamentos de emisión térmica: filamentos de tungsteno que tienen forma de pluma, filamentos de LaB₆ siendo de hexaboruro de lantano y filamentos de CeB₆.

Los filamentos de tungsteno pueden ser utilizados en vacíos más bajos (10^{-4} torr), sin embargo, presenta una vida útil corta de aproximadamente 100 horas y baja emisión de electrones, lo que se traduce en un material inadecuado para trabajos de alta resolución en un microscopio de barrido.

Los filamentos LaB₆ presentan mayor emisión de electrones, mejor resolución y mayor vida útil de aproximadamente 2000 horas en comparación a los filamentos de tungsteno. No obstante, tienen un costo elevado y requieren de un mayor vacío (10^{-6} torr). Mientras que los filamentos CeB₆ tienen las mismas características, pero una larga vida útil.

La *emisión de campo* no se utiliza para excitar los electrones, se caracterizan por ser una fuente de electrones fríos, debido a que se extraen magnéticamente. El filamento consta de un alambre de tungsteno puntiagudo fino que se mantiene con una carga negativa alta junto con el resto del cátodo, mientras que, el ánodo se mantiene con una carga positiva ⁽⁷³⁾.

3. Sistema de manipulación de haz de electrones.

Consta de lentes y bobinas electromagnéticas ubicadas en la columna del microscopio, así mismo, controla el tamaño, la forma y la posición de los electrones.

Los campos electrostáticos y magnéticos, afectan a los electrones en movimiento. Los electrones son controlados por un campo electrostático, en el cañón, mientras que en el resto del MEB son controlados por lentes magnéticos.

Los MEB utilizan diversos lentes electromagnéticos para reducir el tamaño del haz. La relación entre las dimensiones del tubo de rayos catódicos (TRC) y el área a escanear

controla la ampliación del MEB. La ampliación aumenta a medida que se escanean áreas más pequeñas en la muestra. Existen dos formas de ajustar el aumento en el MEB: 1) Con el control de aumento para cambiar el área escaneada de la muestra 2) Ajustar el punto focal del haz y el eje Z (distancia de trabajo) hasta obtener un aumento apropiado, así mismo, existen cuatro ejes de movimiento de la muestra con respecto al detector: 1) el eje X (movimiento de lado a lado), 2) el eje Y (movimiento hacia adelante y hacia atrás), 3) el ángulo de inclinación y 4) rotación planar ⁽⁷³⁾.

4. Sistema de interacción del haz con la muestra.

Acontece la interacción del haz de electrones con la muestra y los tipos de señales detectados. Se define como dispersión al proceso en el que un electrón primario entra en una muestra antes de chocar con otra partícula.

El resultado del impacto del haz primario en la muestra es la formación de un recipiente de reacción en forma de lágrima. En el recipiente de reacción se producen seis o más eventos diferentes ⁽⁷³⁾. En la figura 17 se representan los electrones retrodispersados y secundarios.

i. *Electrones retrodispersados*. Son electrones del haz original con un alto nivel de energía, cercano al voltaje del cañón. Su funcionamiento es útil para mostrar información de densidad atómica relativa en conjunto con información tipográfica. Un electrón del haz primario puede dispersarse escapando de la muestra, pero no atravesándola.

ii. *Electrones secundarios*. Se generan cuando un electrón primario desaloja un electrón de la muestra de la superficie, tienen un nivel bajo de energía, por lo tanto, solo se detectan cuando se desaloja cerca de la superficie del recipiente de reacción. Su principal función radica en obtener información topográfica y de alta resolución.

iii. *Rayos X*. Son emitidos cuando los electrones se desalojan de las órbitas específicas de un átomo en la muestra, los cuales tienen una longitud de onda y energía específicas del átomo por el que se originaron. Los detectores de

espectrómetros de rayos X miden la longitud de onda (espectrómetro de dispersión de longitud de onda o WDS) o el nivel de energía (espectrómetro de dispersión de energía o EDS).

iv. *Luminiscencia catódica*. Esta reacción se define como la fluorescencia de algunas moléculas de muestra cuando se expone a un haz de electrones, en el microscopio electrónico de barrido.

v. *Muestra actual*. La corriente de muestra hace referencia al electrón primario que sufre una dispersión suficiente de tal modo que la energía del electrón disminuye hasta un punto en el que el electrón es absorbido por la muestra.

vi. *Electrones transmitidos*. Si la muestra es suficientemente delgada, los electrones primarios pueden atravesarla. Estos electrones son denominados como electrones transmitidos y proporcionan información sobre la densidad atómica.

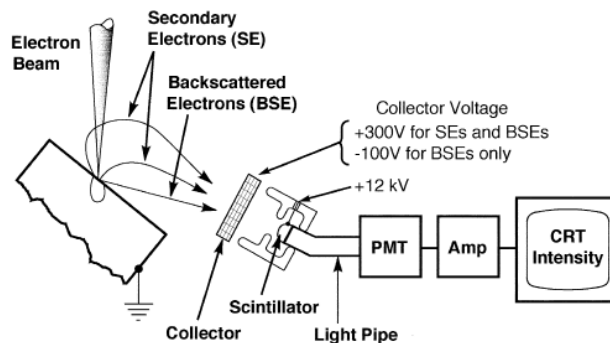


Figura 17 Diagrama de electrones retrodispersados y secundarios (Goldstein et al, 2003)

5. Sistema de detección de señales.

Conformado por diferentes detectores, cada uno sensible a distintas emisiones de energía/ partículas producidas en la muestra. El microscopio electrónico de barrido, obtiene información topográfica proporcionada por electrones secundarios.

El detector de electrones secundarios atrae magnéticamente por un potencial de +200 voltios aplicado a la copa de Faraday, al entrar en el anillo, el electrón es atraído y acelerado con un potencial de +10 kV en el centellador, en donde golpean al centellador para emitir fotones, para posteriormente viajar por el tubo de luz que golpea el fotomultiplicador (PM). La función del fotomultiplicador es aumentar o amplificar la señal original.

Los rayos X son característicos del elemento del que se originaron; pero si un rayo X choca y es dispersado por otra partícula, el rayo perderá energía y cambiará la longitud de onda. Actualmente, existen dos detectores, siendo el detector de rayos X EDS, mismo que recopila todo el espectro de rayos X desde 0 eV hasta más de 30 eV. El detector WDS detecta un rango específico de longitudes de onda, pero las longitudes de onda fuera de este rango no serán detectados. Debido a esto, el WDS es configurado para detectar un rango pequeño, es decir, la sensibilidad del detector es mayor y permite una mayor precisión en el trabajo analítico ⁽⁷¹⁻⁷³⁾.

6. Sistema de procesamiento de señales.

Este sistema electrónico procesa la señal generada por el sistema de detección y permite una manipulación electrónica adicional de la misma. La señal en el MEB es percibida en una imagen que se ve en un tubo de rayos catódicos (CRT). La pantalla del CRT, constituida por una serie de puntos o píxeles. La imagen se ve en términos de brillo y contraste. El brillo es el valor real de cada pixel. Un pixel con un valor de 50 es más brillante que un pixel con un valor de 10. El contraste es la diferencia entre dos pixeles, por ejemplo, el pixel A=50 y el pixel B=49, por lo tanto, el contraste entre ellos sería 1 unidad, lo que se considera como un contraste bajo. Por el contrario, si el pixel A=50 y el pixel B=10, el contraste será mayor.

El control de brillo o control de negro, controla el brillo de las pantallas de visualización y grabación a partir de la suma o resta de algún valor. El control de voltaje PM (contraste) ajusta el amplificador del detector secundario o de retrodispersión, de forma similar al control de volumen de una radio. El control de voltaje PM multiplica los pixeles por una cantidad dada. Los ajustes entre los controles de brillo y contraste son los dos controles principales para configurar una micrografía. El control de la imagen inverso o negativo

invertirá los valores de gris de la imagen, es decir, el negro se convierte en blanco y el blanco se convierte en negro, esta función es utilizada para crear diapositivas ⁽⁷¹⁻⁷³⁾.

7. Sistema de visualización y registro.

Permite la visualización de una señal electrónica mediante un tubo de rayos catódicos, permitiendo el registro de los resultados mediante medios fotográficos o magnéticos.

El brillo, el contraste, la resolución, el aumento, la profundidad de campo, el ruido y la composición determinan la calidad de una micrografía.

I. Brillo. Cuanto más altos sean los valores generales de los pixeles, más brillante será la imagen.

II. Contraste. Diferencia entre el valor del pixel más bajo y el valor del pixel más alto.

III. Resolución. El factor fundamental que afecta la resolución en el MEB es el tamaño del punto del haz, además existen otros factores, tales como la distancia de trabajo, el tamaño de la apertura, corriente de polarización del haz, voltaje y la cilindridad del haz.

IV. Ampliación. Es la función del área escaneada y del tamaño de visualización (CRT o película).

V. Profundidad de campo. Se define como la región de nitidez aceptable delante y detrás del punto de enfoque. La gran profundidad de campo obtenida en el MEB permite realizar micrografías estereoscópicas con facilidad, además son valiosas para muestras nuevas y desconocidas.

VI. Ruido. Es cualquier nivel de brillo observado en una micrografía, blanca o negra, que no sea resultado de la interacción planificada del haz con la muestra, mismo que se hace evidente cuando la relación señal-ruido se vuelve desfavorable.

VII. Composición. Es la forma en que se presenta la micrografía, además representa la combinación de todos los caracteres más la forma en la que se enmarca el sujeto ⁽⁷¹⁻⁷³⁾.

3.1.8.3 Proceso de análisis MEB

Goldstein ⁷³, describió el proceso de análisis del microscopio electrónico de barrido (MEB):

- a. El análisis es realizado con un haz de electrones de alta energía con un rango de 100-30000 eV.
- b. El tamaño del punto de los MEB es menor a 10 μm , mientras que los electrones recolectados de la lente final interactúan con la muestra y penetran con una profundidad de 1 μm , dando como resultado la producción de la imagen.
- c. La imagen se crea punto por punto de acuerdo al movimiento de las bobinas de escaneo, es decir, el haz de electrones se mueve en forma de línea recta hasta producir una trama rectangular en la superficie de la muestra,
- d. El detector de electrones sirve para localizar los electrones emitidos (señales) de la muestra escaneada. Los electrones secundarios (SE) como los electrones retrodispersados (BSE) son utilizados para la formación de las imágenes MEB.
- e. Las señales se muestran en la pantalla, y el operador puede modificar el brillo y la intensidad hasta obtener una imagen ideal. Además, si se requiere exactitud se aplica una ampliación de 10 000x.
- f. El voltaje de los electrones tiene influencia en los detalles proporcionados, por ejemplo; la imagen escaneada será ideal si se utilizan voltajes de aceleración bajos o menores a 5 keV.

g. La imagen parcialmente tridimensional depende de la topografía de la muestra en términos de forma, tamaño y textura de la superficie, además de la cantidad de BSE y SE.

3.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Torabinejad y cols. ⁷³ en 1995 informó que el MTA se considera como un material bioactivo. Presentando propiedades de regeneración de tejido duro en tratamientos de recubrimiento pulpar, pulpotomía, tratamiento de perforaciones de furca, raíz y apexogénesis. Inicialmente tiene un pH de 10.2 y a las tres horas posteriores de su aplicación alcanza un pH de 12.5.

Melo y cols. ⁷⁴ en el 2011, comprobaron el desempeño idóneo de las nanopartículas al ser adicionadas en mezclas y morteros de cemento Portland, en concentraciones de 0.30%, 0.50% y 0.75% debido a su tamaño las partículas contribuyen al buen llenado de los espacios vacíos. Utilizó dos aditivos químicos policarboxilato modificado y melamina-formaldehído. Las propiedades investigadas fueron la resistencia a la tracción y a la compresión y el módulo de elasticidad secante (MOE), para el análisis de la microestructura se utilizó microscopía electrónica de barrido (MEB) y área de superficie específica (BET). El análisis de los resultados de las pruebas, concluyó que el mejor desempeño de los morteros fabricados con 0.30% de nanotubos de carbono y un aditivo reductor de agua de policarboxilato modificado de alto rango.

Marcondes y cols. ⁶⁰ en el 2015, en investigaciones realizadas en el área de nanotecnología y cemento, demostraron que algunas adiciones de nanocompuestos al cemento confieren modificaciones importantes en su microestructura lo que a su vez proporciona resistencia, menos porosidad y mayor durabilidad. Además, con 95% de significancia, se evidenció que las propiedades mecánicas de resistencia a la compresión y a tracción por compresión diametral, son afectadas por la eficiencia de la dispersión de los nanotubos de carbono en el concreto de cemento Portland.

Flores y cols. ⁷⁵ en el 2016 analizaron y comparó a partir de la Emisión de Rayos X inducido por partículas (PIXE), Calorimetría diferencial de barrido (DSC), termogravimetría (TGA) y difracción de Rayos X (DRX) la composición química del cemento MTA Angelus® y un cemento Portland Blanco (CPB-CA), cuyos resultados obtenidos en PIXE manifestaron que los componentes en mayor cantidad para los cementos fueron el aluminio, silicio y calcio, a su vez, el bismuto solo se detectó en el MTA Angelus®. Los elementos traza fueron el cobre y estroncio en el MTA Angelus® y zirconio en el CPB-CA. En contraparte, el análisis de las fases de MTA-A y CPB-CA demostraron que están compuestos por tres fases iguales, silicato dicálcico, silicato tricálcico y aluminato de tricálcico, la fase bismita se detectó únicamente en el MTA-A; por lo tanto, concluyeron que ambos materiales son constituidos en mayor porcentaje por calcio, silicio y aluminio y sus fases minerales son compuestas por silicato dicálcico, silicato tricálcico y aluminato tricálcico.

An y cols. ⁷⁶ en el 2018 evaluaron la viabilidad de las nanoláminas de óxido de grafeno (GONF) molidas mediante bolas producidas a partir de un proceso mecánico químico a base de cemento Portland ordinario (OPC). Se añadieron distintas concentraciones de GONF (0.01-1% en peso) a la mezcla de pasta de OPC. Para el desarrollo de la investigación, se emplearon dos métodos de diseño de mezcla: en primer lugar, fue una mezcla seca, donde se mezclaron los GONF y los polvos de OPC antes de la formación de la pasta, y en segundo lugar fue una mezcla húmeda, se agregó una solución de GONF sonicada. Realizaron pruebas mecánicas de compresión y flexión, cuyos datos arrojaron que la pasta de OPC en que se incorporó 0.05% de GONF obtuvo mayor resistencia. Además, se realizaron pruebas con microscopio electrónico de barrido (MEB) y una espectroscopia de energía dispersa (EDS) para identificar los GONF dentro de los productos de hidratación del cemento. Para analizar la viabilidad de los GONF mezclados en seco (0.01-1 % en peso). Concluyeron que las propiedades mecánicas de todas las pasas y hormigones con GONF han mejorado en comparación del grupo control. De acuerdo a las pruebas de resistencia a la compresión y a la flexión, se concluye que 0.05% y 0.01% de GONF son ideales en combinación de la pasta y el hormigón.

Liu y cols. ⁷⁷ en el 2019 indicaron el potencial del MTA de impulsar la diferenciación osteo/odontogénica al aumentar la expresión de marcadores osteo/odontogénicos y el depósito

de calcio, promoviendo la migración celular de hSCAP a través del Wnt/Vía de señalización de catenina sin citotoxicidad.

Cerro-Prada y *cols.* ⁷⁸ en el 2020 observaron en un estudio de 90 días, utilizando pruebas mecánicas convencionales; que una mínima cantidad de MWNT aumenta un 25% la resistencia a la compresión y un 20% la resistencia a la flexión. Además, el mejoramiento de las propiedades mecánicas y durabilidad del MTA, es atribuido al tamaño y relleno de los CNT's.

Ramezani y *cols.* ⁷⁹ en el 2020 establecieron que la longitud y diámetro de los CNT's eran de 10-20 μm y 20-32.5 μm respectivamente, siendo las medidas óptimas para mejorar las propiedades mecánicas de los materiales.

Lozano y *cols.* ⁸⁰ en el 2022 realizaron una investigación centrada en la evaluación de la migración celular a partir del ensayo de herida por raspado, en donde, sembraron HDPC de los pasajes 2 a 4 a una concentración de 2×10^{-1} células en una placa de 12 pocillos. Después de 48h, realizó el raspado en la monocapa celular con una punta de pipeta estéril de 100 μL y se expuso a los extractos de material o al grupo control (medio sin extractos de material). Las distancias de migración celular se evaluaron en tres intervalos de tiempo: el primer período de 24h (0 a 24h), el segundo período de 24h (24 a 48h) y el tercer período de 24h (48 a 72 h). Finalmente, el grupo control mantuvo la viabilidad celular en todas las condiciones. A las 24 h de cultivo MTA mostró una viabilidad celular disminuida en comparación con el grupo control ($p < 0.0001$; $p < 0.05$, respectivamente). A las 48h de cultivo, las células tratadas con MTA sin diluir evidenciaron una ligera disminución en la viabilidad celular ($p < 0.001$). Sin embargo, las diluciones 1:2 de los materiales exhibieron una citocompatibilidad comparable a la del grupo control a las 48 y 72h de cultivo. Mientras que la migración celular, a las 72h de cultivo, el MTA promovió la cicatrización de heridas sin diferencias significativas respecto al grupo control.

Niu y *cols.* ⁶² en el 2024 observaron que el tamaño y relleno de los nanotubos de carbono (CNT's) promueven el proceso de hidratación del cemento MTA, a partir del relleno de orificios internos y favoreciendo las propiedades mecánicas y la durabilidad de la matriz de cemento.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

El Agregado de Trióxido Mineral (MTA) es ampliamente utilizado en tratamientos endodónticos debido a su capacidad de sellado y biocompatibilidad. Sin embargo, su principal limitación es el tiempo de fraguado, lo que puede aumentar el riesgo de solubilidad y fallas clínicas, prolongar el procedimiento y comprometer los resultados. Esto representa un reto significativo para los odontólogos, quienes requieren materiales con mejores características.

Por esta razón, investigaciones recientes han incorporado nanotubos de carbono (CNT's) en pequeñas concentraciones (0.1% y 0.3%), observando una disminución en el tiempo de fraguado sin comprometer la resistencia a la compresión, radiopacidad o solubilidad del material. Sin embargo, es fundamental continuar con la evaluación de su comportamiento biológico. A partir de ello, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cómo afecta la adición de nanotubos de carbono en concentraciones de 0.1% y 0.3% a la viabilidad celular y la capacidad de formación de apatita (bioactividad) en un cemento MTA?

5. JUSTIFICACIÓN

El Agregado de Trióxido Mineral (MTA) ha sido reconocido como uno de los materiales más eficaces en diversos procedimientos endodónticos, gracias a su capacidad de sellado, biocompatibilidad y su habilidad para promover la formación de tejido mineralizado. No obstante, su principal desventaja es el prolongado tiempo de fraguado, lo que puede comprometer la eficacia de tratamiento, aumentar el riesgo de microfiltraciones, prolongar el procedimiento clínico y disminuir el confort del paciente. Estos factores representan un desafío significativo para los profesionales odontológicos, especialmente en situaciones donde la rapidez y efectividad del sellado son críticas.

Por otro lado, se ha demostrado que los nanotubos de carbono (CNT's) mejoran el comportamiento de diversos materiales de construcción debido a sus excepcionales propiedades físicas y químicas. Por esta razón, investigaciones recientes han incorporado CNT's a cementos a base de silicato de calcio (MTA) en pequeñas concentraciones (0.1% y 0.3%), observando una disminución en el tiempo de fraguado sin comprometer su resistencia a la compresión, radiopacidad ni solubilidad. Sin embargo, es importante verificar la influencia de esta incorporación en la viabilidad celular y la bioactividad (formación de hidroxiapatita), ya que un MTA modificado con nanotubos de carbono podría representar una nueva generación de cementos con propiedades mejoradas, incrementando la seguridad y los resultados clínicos.

Al realizar este estudio, no solo se busca contribuir a la mejora de los materiales dentales disponibles, sino también avanzar en el conocimiento sobre la interacción entre nanomateriales y su comportamiento biológico.

6. HIPÓTESIS

- H01. La adición de nanotubos de carbono en diversas concentraciones no tendrá efecto en la viabilidad celular en un cemento MTA.
- Ha1: La adición de nanotubos de carbono en diversas concentraciones tendrá efecto en la viabilidad celular en un cemento MTA.
- H02. La adición de nanotubos de carbono en diversas concentraciones no tendrá efecto en la capacidad de formación de apatita (bioactividad) en un cemento MTA.
- Ha2: La adición de nanotubos de carbono en diversas concentraciones tendrá efecto en la capacidad de formación de apatita (bioactividad) en un cemento MTA.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Comparar el efecto de la adición de nanotubos de carbono en diversas concentraciones en la viabilidad celular y la capacidad de formación de apatita (bioactividad) en un cemento MTA.

7.2 Objetivos específicos

- Comparar el efecto de la adición de nanotubos de carbono en concentración de 0.1% y 0.3% en la viabilidad celular en un MTA a 24, 48 y 72h.
- Evaluar el efecto de la adición de nanotubos de carbono en concentración de 0.1% y 0.3% en la bioactividad en un MTA a los 7 y 14 días.
- Evaluar la formación de apatitas en la superficie de los cementos por medio de Difracción de rayos X de haz rasante.
- Evaluar la formación de apatitas en la superficie de los cementos por medio de Microscopía Electrónica de Barrido.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Diseño experimental

Experimental *in vitro*.

8.2 Tamaño de muestra

Se utilizó el método de Tang, calculando el tamaño de la muestra con base a un estudio previo trabajando a una potencia del 85% y un intervalo de confianza del 95%. Se obtiene un tamaño de muestra de $n=12$, por grupo, para la prueba de viabilidad. Mientras que para la prueba de bioactividad al ser un análisis descriptivo ya la sensibilidad de las pruebas de caracterización (difracción de rayos X de haz rasante y microscopía electrónica de barrido) solo se necesitó una muestra por grupo.

8.3 Criterios de selección

8.3.1 Criterios de inclusión

- Muestras que sean íntegras al momento del ensayo.
- Muestras que cumplan con las dimensiones para las muestras de ensayo postuladas por los requerimientos especificados para los cementos dentales de obturación retrógrada.

8.3.2 Criterios de exclusión

- Muestras que al momento de la preparación se fracturen.

- Muestras que no cumplan con las características para ensayarlos.

8.3.3 Criterios de eliminación

- Muestras que durante el trabajo experimental se fracturen o que tengan la presencia de burbujas.

8.4 Variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Unidad de medida
Variables independientes				
Cementos MTA	Polvo color blanco desarrollado para endodoncia indicado para recubrimientos pulpares directos	Se utilizó cemento MTA experimental con concentraciones de 0.1 y 0.3% de nanotubos de carbono.	Cualitativa nominal	<ul style="list-style-type: none"> ● G1- MTA sin nanotubos de carbono ● G2- MTA con 0.1% de nanotubos de carbono ● G3- MTA con 0.3% de nanotubos de carbono
Variables dependientes				
Viabilidad celular	Cantidad de células sanas en una población	Conteo celular a las 24, 48 y 72 horas, después de la elaboración de la muestra	Cuantitativa de razón	Conteo celular
Bioactividad	Propiedad que provoca una respuesta biológica específica en la interfaz de material, lo que resulta en la formación de un vínculo entre el tejido y el material	Capacidad de producir una capa de apatitas sobre la superficie del material a los 7 y 21 días de elaboración de la muestra, por medio de difracción de rayos x de haz rasante y microscopía electrónica de barrido	Nominal dicotómica	Ausencia o presencia de apatita

8.5 Concordancia y fiabilidad

El alumno investigador fue capacitado en la metodología de evaluación biológica de dispositivos médicos: preparación de muestras y materiales de referencia con base a la norma ISO 10993-5 ⁸¹ y en la metodología de la preparación de muestras con base a la norma ISO 23317 ⁵². Fue asesorada en la interpretación de los resultados por los investigadores participantes en el proyecto.

8.6 Ubicación espacio temporal

Las pruebas de viabilidad celular se realizaron en la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Chihuahua y la prueba de bioactividad, se realizó en la Facultad de Estomatología BUAP, Laboratorio de Materiales y Biomateriales Dentales, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México, las pruebas de caracterización se realizaron en el Instituto de Investigación en Materiales de la UNAM. En el periodo agosto 2024 – enero 2025.

8.7 Procedimientos

8.7.1 Elaboración de los cementos

Se elaboró un cemento MTA experimental a partir de un cemento Portland blanco y 20%wt de trióxido de bismuto. El cemento Portland blanco y el cemento experimental fueron previamente caracterizados ^(3,75,82). Posteriormente, se agregó el 0.1% wt y 0.3% wt de nanotubos de carbono, los cuales fueron adquiridos de Sigma Aldrich, como reactivo de alta pureza

8.7.2 Elaboración de las pastillas y almacenamiento

Materiales:

- Cemento MTA.
- Losetas de vidrio estériles (15 × 10 × 2 cm).
- Espátula para cemento.
- Guantes de vinilo.
- Bandas de polietileno.
- Pinzas de algodón.

- Agua destilada.
- Nanotubos de carbono (Aldrich, 724769, Lot.MKBQ3087V)
- Moldes para elaboración de muestras de 2 mm de diámetro x 3 mm de profundidad.

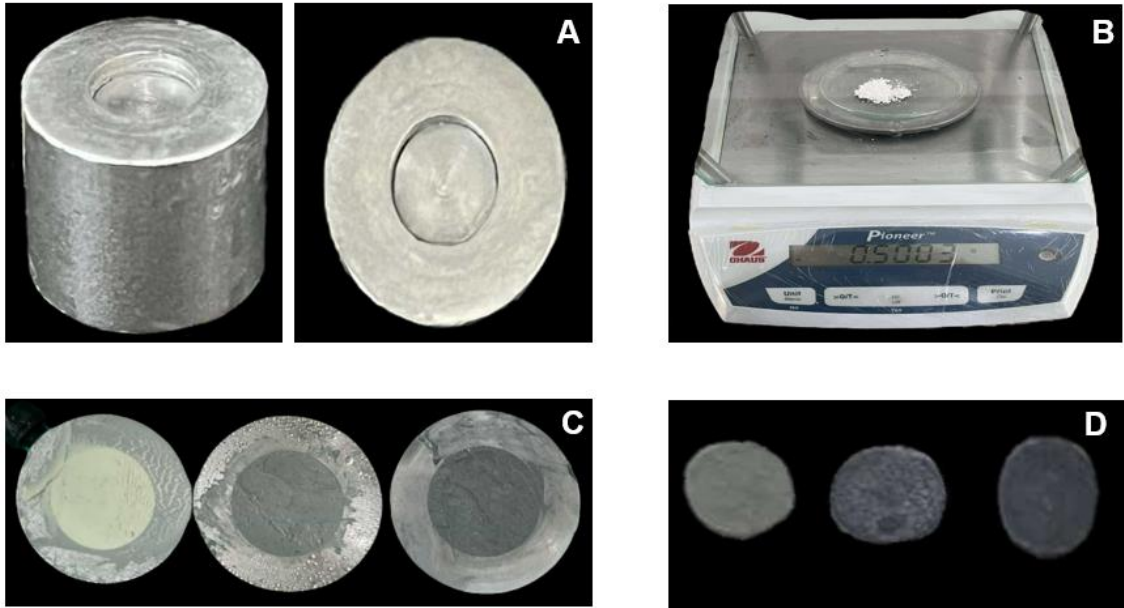


Figura 18 Protocolo de elaboración de pastillas de cemento MTA con diversas concentraciones de nanotubos de carbono

A) Molde cilíndrico estéril de 2 mm de diámetro x 3 mm de profundidad. B) MTA en diversas concentraciones, con peso de 500g. C) Pasta de MTA en diversas concentraciones (G1- SNT, G2- 0.1% NT, G3- 0.3% NT de izquierda a derecha). D) Retiro de la pastilla de MTA con diversas concentraciones de NTC's de los moldes cilíndricos estériles.

(Fuente propia)

8.7.3 Prueba de viabilidad celular

Se preparó el cemento MTA en relación polvo líquido (1g polvo- 0.33 de agua) en una loseta de vidrio estéril, limpia y fría. Se colocó la mezcla de MTA con diversas concentraciones de nanotubos de carbono, en el molde de acero inoxidable cilíndrico

estéril (2 mm de diámetro × 3 mm de profundidad, con relación entre área de superficie del material y volumen medio de 3 cm² mL⁻¹, de acuerdo a lo establecido por la Norma ISO 10993 ⁽⁸¹⁾). Se dejó fraguar la muestra durante 4h y posteriormente se retiró del molde de acero, posteriormente, las muestras se almacenaron a 37°C y en ambiente húmedo en 1 mL de DMEM (HyClone, UT, USA) durante 24h para obtener el medio condicionante. Para obtener los resultados en la evaluación de viabilidad celular, el recuento de células se llevó a cabo a las 24 h, 48 h y 72 h, se utilizaron células L929 en placas de cultivo (96 pocillos con densidad de 2.5x10³ células por pocillo). Después de 24 horas se designó el día “cero”, en donde se suplió el medio con Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) al 10% de suero fetal bovino y DMEM condicionado (24 h). Se separó el cultivo y se añadió 10 µL de MTT (0.5 mg/mL), donde se incubó durante 3 horas, después se retiró el MTT y se agregó 100 µl de Dimetilsulfuro (DMSO), se llevó a la incubadora durante 15 minutos. Se realizaron las pruebas de absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro.



Figura 19 Evaluación de viabilidad celular
A) Placas de cultivo (96 pocillos con densidad de 2.5×10^3 células por pocillo). B) Sustitución del medio con Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) al 10% del suero fetal bovino y DMEM condicionado (24h). C) Separación del cultivo e incorporación de 10 µL de MTT (0.5 mg/mL) para su incubación durante 3h. D) Prueba de absorbancia a 570 µm en un espectrofotómetro.

(Fuente propia)

Las células se colocaron en placas de 96 pocillos estériles (50-10000 células/pocillo) en un medio estándar. Para la reproductibilidad, la incubación se realizó a 37°C con 5% de

CO₂ después de 24 h o 48 h; se agregó 20 µL de una solución MTT, 5 mg/gr a cada pocillo y la placa se incubó durante 4 horas adicionales, el medio se aspiró o eliminó y los pocillos se lavaron con PBS (solución tamponada con fosfato), el colorante convertido se solubilizó con etanol al 100%. La absorbancia del colorante convertido se midió a una longitud de onda de 570 µm con sustracción de fondo a 630-690 µm.

8.7.4 Prueba de bioactividad

Se confeccionaron muestras de discos para cada grupo (15 mm de diámetro × 1 mm de espesor) en moldes de acero inoxidable (Figura 20). Las muestras fraguaron durante 1 hora a 37°C, con humedad relativa del 95%.

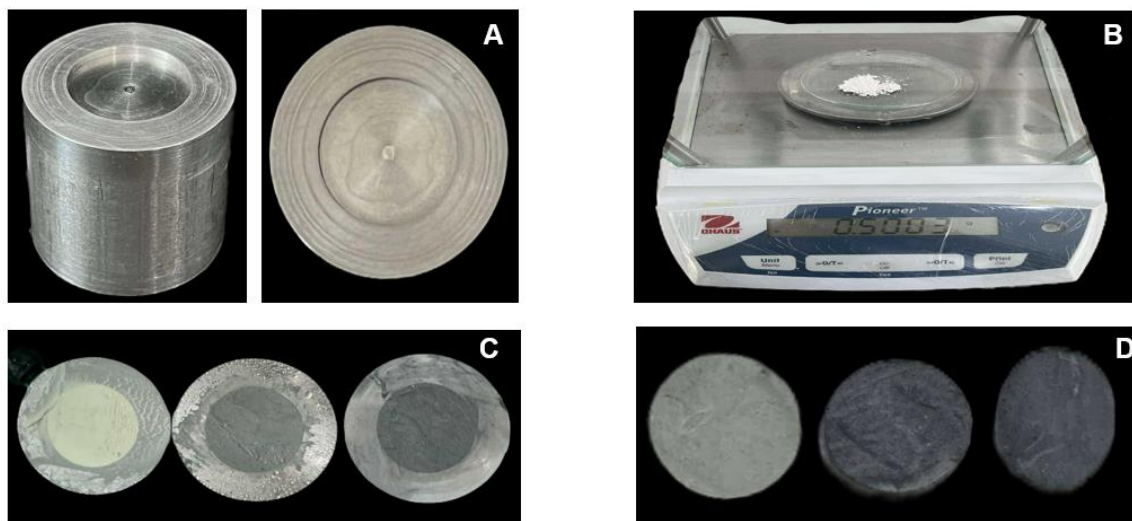


Figura 20 Protocolo de elaboración de pastillas de cemento MTA con diversas concentraciones de nanotubos de carbono

- A) Molde cilíndrico estéril de 15 mm de diámetro y profundidad variable. B) MTA en diversas concentraciones, con peso de 500 g. C) Pasta de MTA en diversas concentraciones (G1- SNT, G2- 0.1% NT y G3- 0.3% NT de izquierda a derecha) colocada en los moldes cilíndricos estériles. D) Retiro de las pastillas de MTA con diversas concentraciones de NTC's de los moldes cilíndricos estériles.
(Fuente propia)

Posteriormente, las muestras se sumergieron verticalmente en SBF, cambiando semanalmente la solución SBF (Figura 21). Llevándola a una temperatura de 36.5°C bajo agitación, previo al recambio.

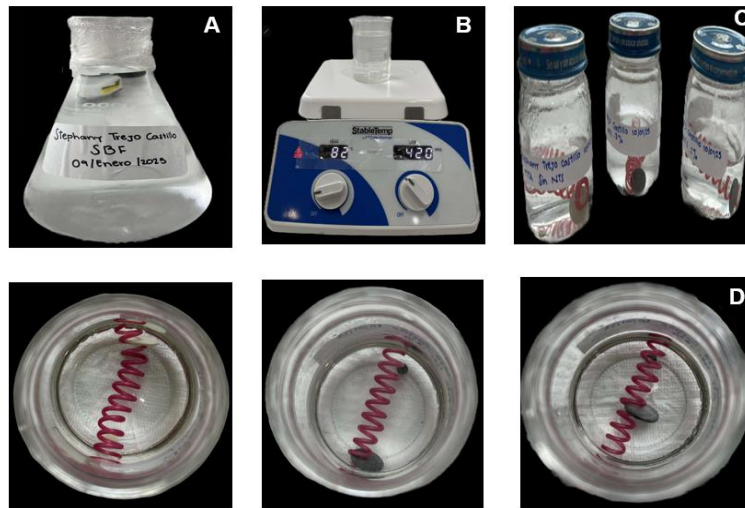


Figura 21 Recambio de solución de 21 días

SBF almacenado en matraz a 37°C. B) Barra agitadora con 140 mL de SBF a 36.5°C en un vaso de precipitados de plástico con agitador magnético. C) Frascos herméticos de vidrio con las pastillas de MTA y diversas concentraciones de NT's (sin NTC's, 0.1% NTC's y 0.3% NTC's de izquierda a derecha); con SBF. D) Recambio de 45.5 mL de la nueva solución de SBF en cada recipiente de vidrio de las pastillas de los grupos G1-SNT, G2- 0.1% NT y G3- 0.3%.

(Fuente propia)

Los discos fueron sometidos a un proceso de recubrimiento con oro para obtener imágenes de superficie en MEB y se evaluó la formación de apatita, utilizando difracción de rayos X de haz rasante, en donde se colocaron las pastillas en el portamuestras, para identificar las fases, se compararon los picos con los del PDF-2 (2004) otorgado por el ICDD (Centro Internacional de Datos de Difracción).

8.7.5 Elaboración de solución de fluido corporal simulada (SBF).

A partir de la metodología de la norma ISO 23317 ⁽⁵²⁾, se preparó una solución de fluido corporal simulada (SBF) ⁽⁵⁰⁾:

Para preparar 1000 mL de SBF, Se colocaron 700 mL de agua destilada en vaso de precipitado de plástico con superficie lisa y sin rayones, en baño de agua sobre el agitador magnético y se cubrió con un film plástico. Se calentó el agua en el a 36.5°C bajo agitación. Posteriormente se disolvieron los reactivos del 1° al 8° en orden como se indica en la Tabla 2, en la solución a 36.5 °C uno por uno, con la condición de que el reactivo anterior se haya disuelto por completo. Los reactivos 9° (Tris) y 10° se disolvieron con el debido ajuste de pH y protocolo de disolución del Tris, teniendo en consideración que los reactivos higroscópicos como KCl, K₂OHP₄, MgCl₂6H₂O, CaCl₂, se midieron en el menor tiempo posible. La temperatura fue establecida a 36.5°C y con pH de 2.0. Al disolver toda la cantidad de Tris, se ajustó el pH de la solución mediante el electrodo del medidor de pH con HCl poco a poco a un pH de 7.4 a 36.5°C, posteriormente se retiró el electrodo de la solución, se enjuagó con agua destilada e intercambiada con iones, agregando los lavados a la solución. Se vertió la solución ajustada al pH del vaso de precipitados en un matraz aforado de 1000 mL. Se añadió el agua intercambiada con iones y destilada hasta la línea marcada, se tapó el matraz y se cubrió con film plástico, finalmente se enfrió la solución a temperatura ambiente.

Tabla 2 Pedido, cantidades, recipientes para pesar, purezas y pesos de fórmula de reactivos para preparar 1000 mL de SBF

Orden	Reactivo	Cantidad	Recipiente	Pureza (%)	Peso de la fórmula
1	NaCl	8.03 g	Papel para pesar	99.5	58.44
2	NaHCO ₃	0.35 g	Papel para pesar	99.5	84.00
3	KCl	0.22 g	Botella de pesaje	99.5	74.55
4	K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	0.23 g	Botella de pesaje	99.0	228.22

5	MgCl ₂ * 6H ₂ O	0.31 g	Botella de pesaje	98.0	203.30
6	1.0M-HCl	39 mL	Cilindro graduado	-	-
7	CaCl ₂	0.29 g	Botella de pesaje	95.0	110.98
8	Na ₂ SO ₄	0.07 g	Botella de pesaje	99.0	142.04
9	Tris	6.11 g	Papel para pesar	99.0	121.13
10	1.0M - HCl	0-5 mL	Jeringa	-	-



Figura 22 Protocolo de preparación de la solución de fluido corporal simulada (SBF)

A) Reactivos a utilizar para la preparación de la solución de fluido corporal simulada. B) Balanza analítica para el pesaje de los reactivos. C) Pesaje del primer reactivo NaCl 8.035 g en la balanza analítica. D) Electrodo para medir pH de la solución de fluido corporal simulada. E) Medición de pH de 7.40 con el electrodo de la solución de fluido corporal simulada. F) SBF en matraz cubierto con film plástico para su almacenamiento.

(Fuente propia)

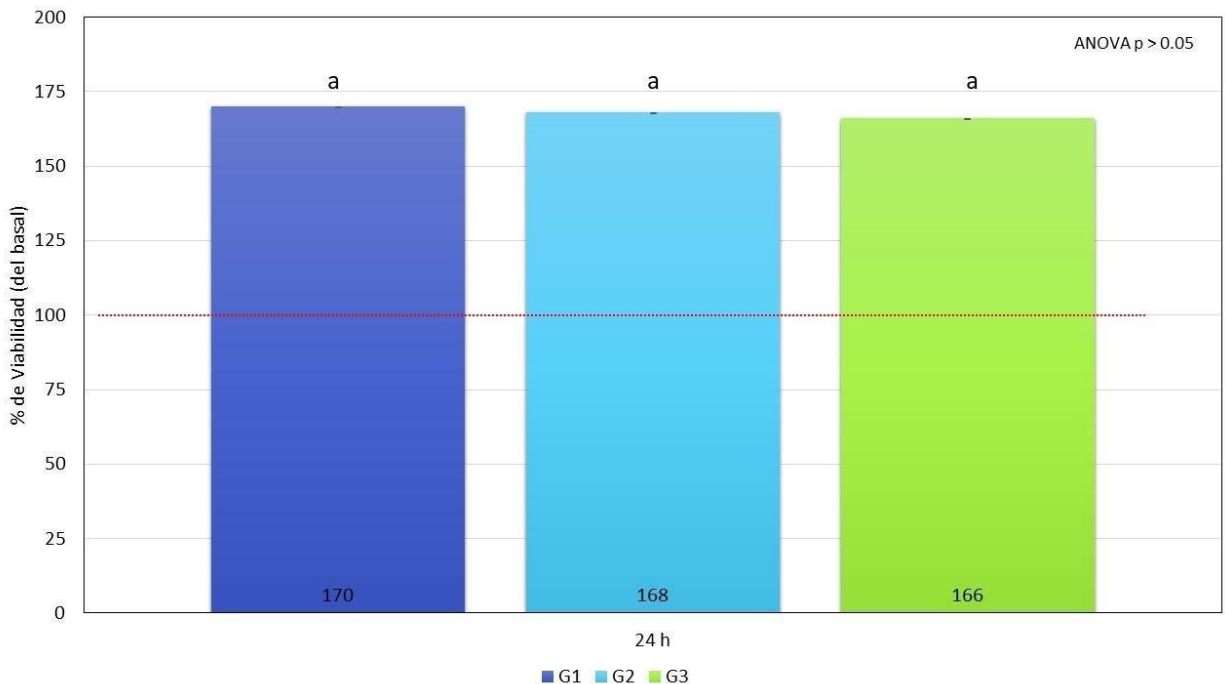
8.8 Análisis estadístico

Una vez capturados los datos, se realizó prueba de normalidad Shapiro Wilks, para verificar el uso de pruebas paramétricas. Los resultados fueron analizados en SPSS, con el análisis de ANOVA, ya que se tienen tres grupos, se aplicó la prueba *post hoc* Tukey para comparaciones múltiples, debido a que se encontraron diferencias entre los grupos.

9. RESULTADOS

9.1 Viabilidad celular

La viabilidad celular a las 24h, es similar en los 3 grupos de investigación, en donde, el G1- SNT muestra una viabilidad de 170%, G2- 0.1% NT una viabilidad celular de 168% y G3- 0.3% NT, presentó una viabilidad celular de 166% (ANOVA $p > 0.05$), no se encontraron diferencias estadísticas en este periodo de tiempo entre los grupos, como se observa en la figura 23.



*Figura 23 Resultados de viabilidad celular a las 24h
Se graficó la media y las barras de error representan la desviación estándar
(Fuente propia)*

A las 48h se presentó en el G1- SNT una viabilidad celular de 110%, el G2- 0.1% NT expuso una viabilidad celular de 95%, mientras que el G3-0.3% NT expuso una viabilidad celular de 108%. Se observó una disminución en la viabilidad en todos los grupos; sin embargo, todos cercanos al 100% del basal, se encontraron diferencias estadísticas entre todos los grupos (ANOVA $p < 0.05$, *post hoc* Tukey $p < 0.05$). Los resultados no se

consideran citotóxicos debido a que están por arriba del 90% del porcentaje de viabilidad (del basal), los resultados se muestran en la figura 24.

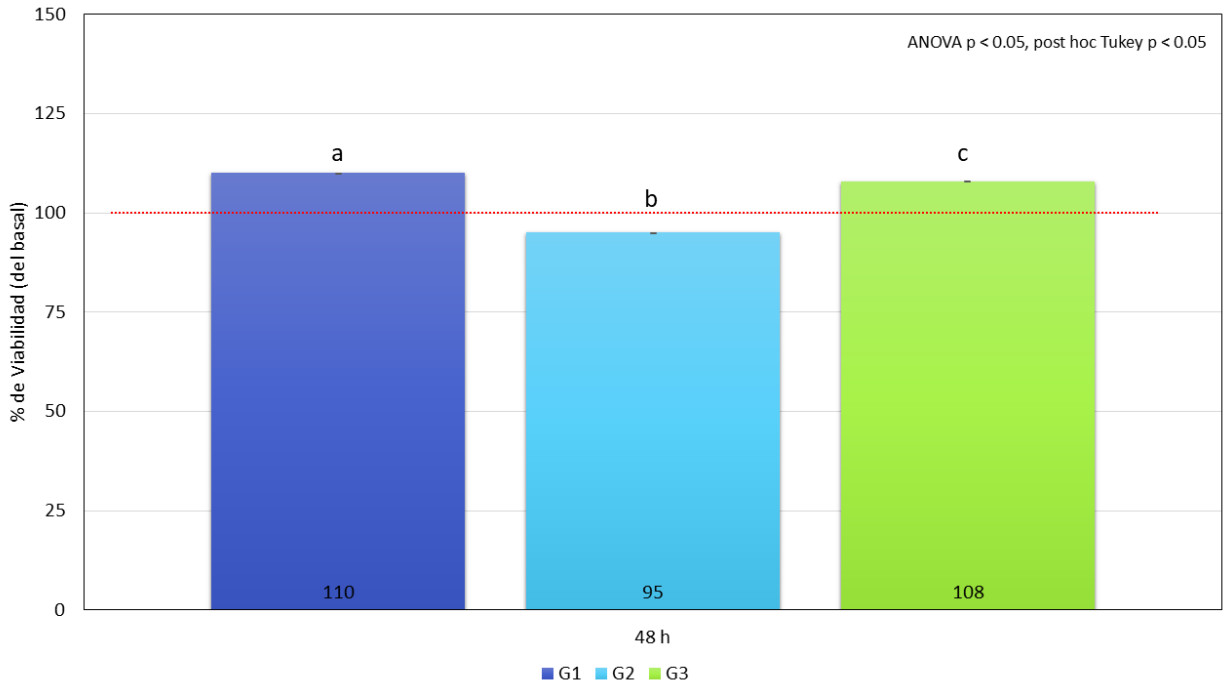


Figura 24 Resultados de viabilidad celular a las 48h
Se graficó la media y las barras de error representan la desviación estándar. Las letras diferentes entre grupos representan las diferencias estadísticas.
(Fuente propia)

Los resultados a las 72h se muestran en la figura 25, se observó que en el G1- SNT aumentó la viabilidad a 140%, mientras que el G2- 0.1% NT y el G3- 0.3% NT disminuyeron a 84 y 63% respectivamente, se encontraron diferencias entre todos los grupos (ANOVA p < 0.05, post hoc Tukey p < 0.05).

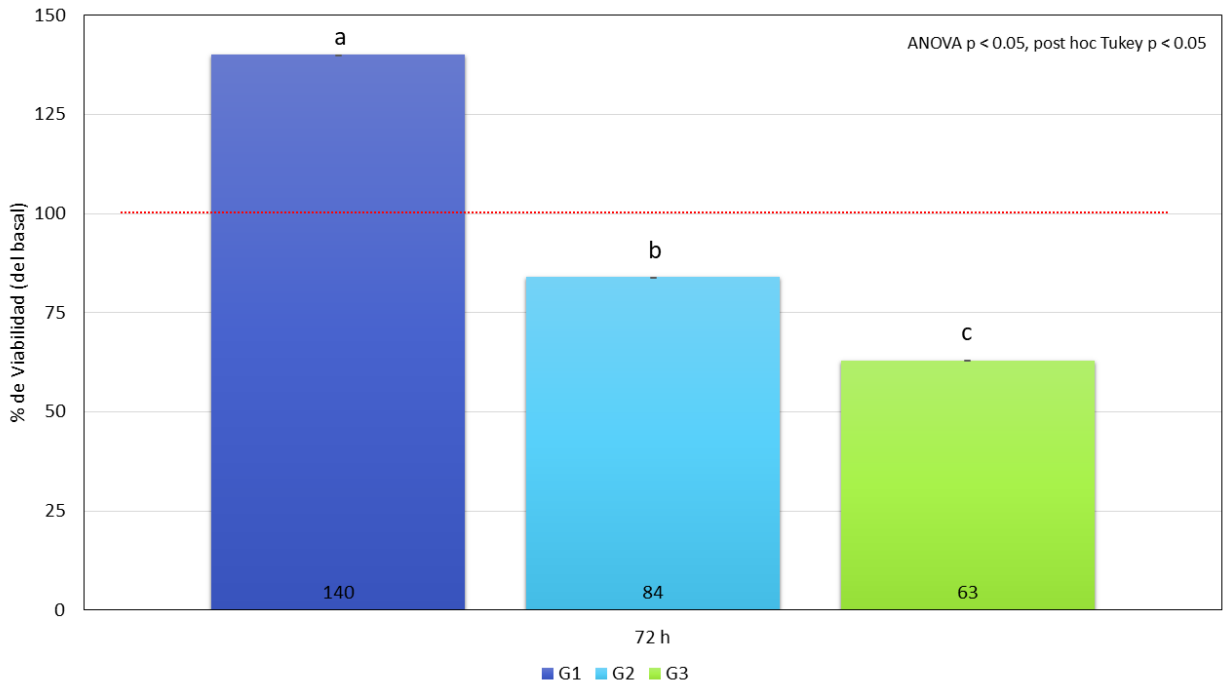
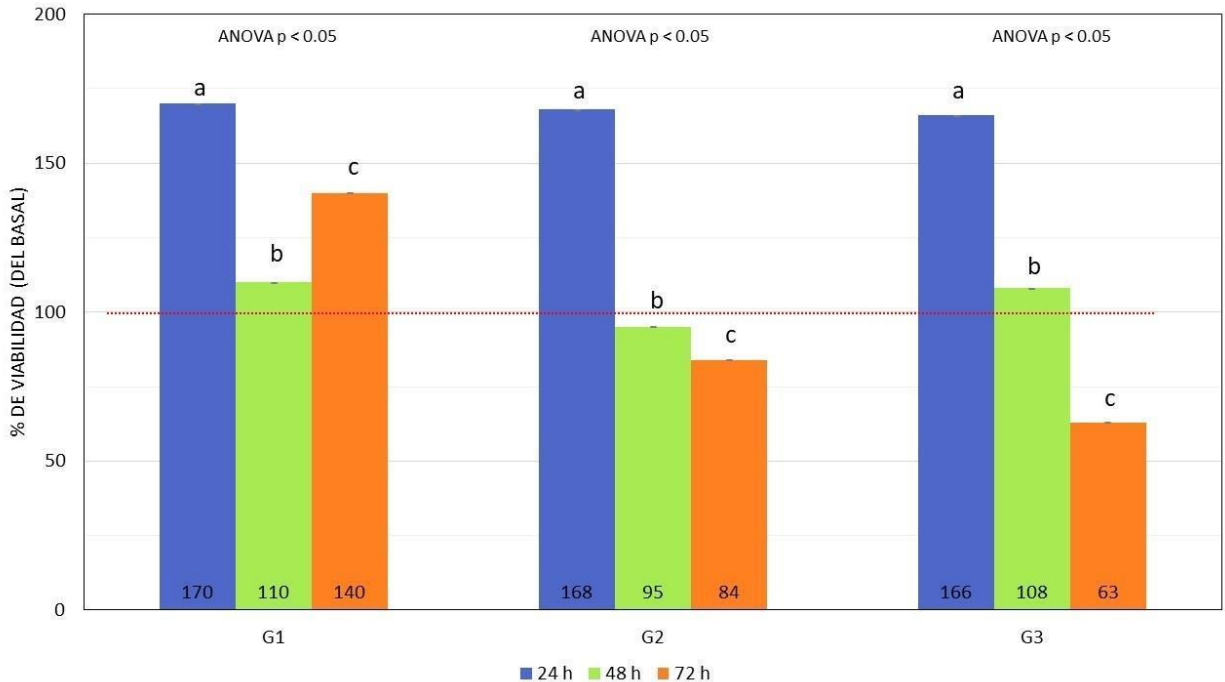


Figura 25 Resultados de viabilidad celular a las 72h
Se graficó la media y las barras de error representan la desviación estándar. Las letras diferentes entre grupos representan las diferencias estadísticas.
(Fuente propia)

La comparación de la viabilidad de cada grupo experimental por tiempo se observa en la figura 26, de acuerdo a los intervalos de tiempo 24h, 48h y 72h. Se observa una reducción de la viabilidad a las 48 h en todos los grupos, sin embargo, solo el G1- SNT aumentó la viabilidad las 72h, se encontraron diferencias estadísticas en cada grupo por tiempo (ANOVA p < 0.05, *post hoc* Tukey p < 0.05).



*Figura 26 Comparación de resultados a las 24, 48 y 72h
(Fuente propia)*

9.2 Bioactividad

10.2.1 Difracción de rayos X de haz rasante

En el análisis de DRX, no se encontró ningún indicio de formación de hidroxiapatita, sin embargo, se observó la presencia de Calcita (Carbonato de calcio) un precursor de apatitas, sus picos se compararon con la base de datos del “Power Diffraction File” PDF 05-0586, los picos se encuentran identificados en los 3 grupos en la figura 27. De igual manera se observan picos asociados al trióxido de bismuto en su forma mineral de Bismita PDF 41-1449.

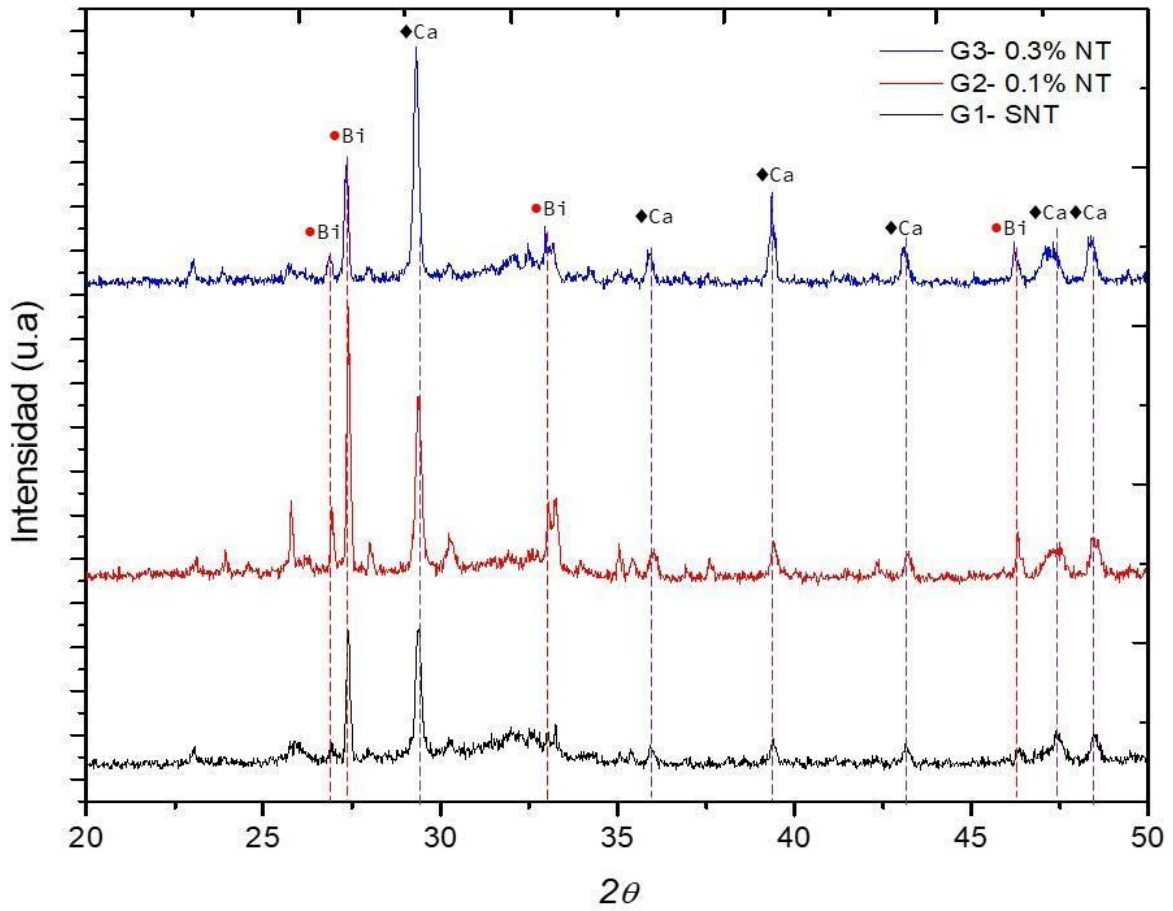


Figura 27 Difracción de rayos X de los 3 grupos
 ♦Ca- Calcita/Carbonato de calcio marcada con línea roja punteada. ●Bismita/ Trióxido
 de Bismuto marcado en línea morada punteada.

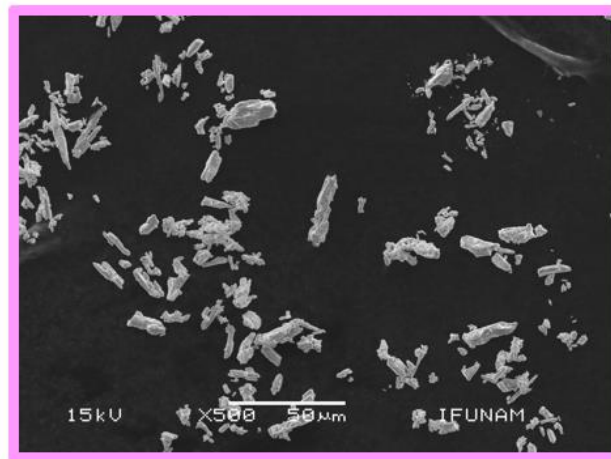
(Fuente propia)

9.2.2 Microscopía Electrónica de Barrido

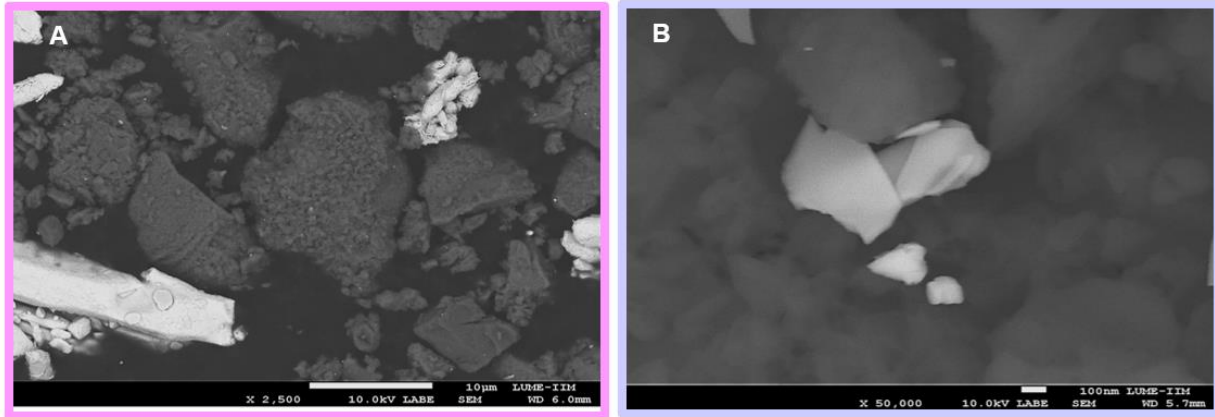
9.2.2.1 Cementos sin hidratar

Se tomaron imágenes de bismuto y MTA experimental antes de ser agregados a las mezclas de los cementos. Las figuras 28, 29, 30 y 31 corresponden al bismuto y MTA después de haber sido tratados en el molino respectivamente.

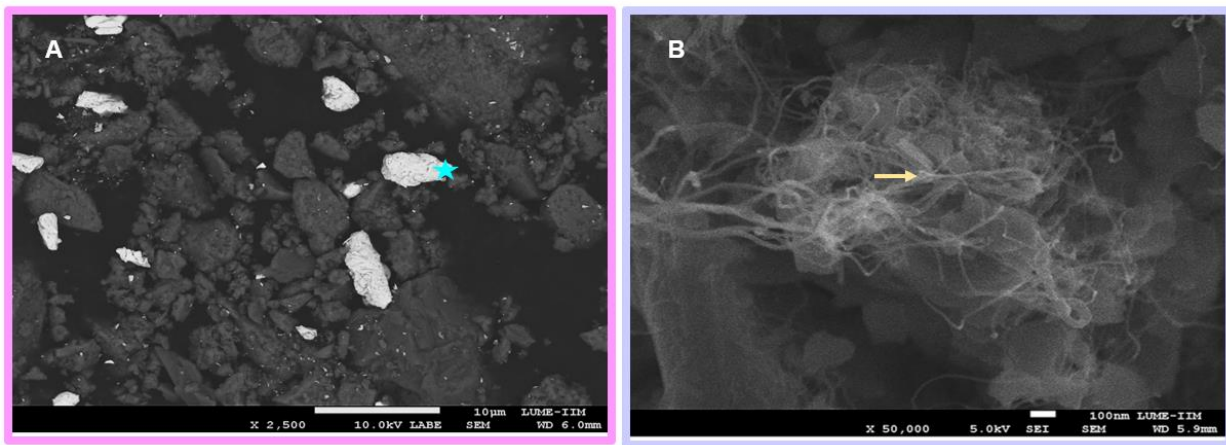
Se observa que las partículas de Bismuto (Bi) presentan una superficie heterogénea, con partículas de forma irregular y un tamaño entre $0.5\ \mu\text{m}$ y $50\ \mu\text{m}$, mientras que las de los nanotubos de carbono se encuentran entre menores a 10nm .



*Figura 28 Bismuto (Bi) por medio de MEB, con magnificación de 500X
Se observan las partículas de Bismuto (Bi) de forma de cristales alargados brillantes
con tamaño de entre $5\text{-}25\ \mu\text{m}$
(Fuente propia)*



*Figura 29 Composición de G1-SNT a 2,500X y 50,000X
(Fuente propia)*



*Figura 30 Composición de G2- 0.1% NT a 2,500X y 50,000X
En la figura A) se observan partículas de Bismuto (Bi) representado con una estrella,
con tamaño de entre 2-10 μm. B) Nanotubos de carbono señalados con una flecha.
(Fuente propia)*

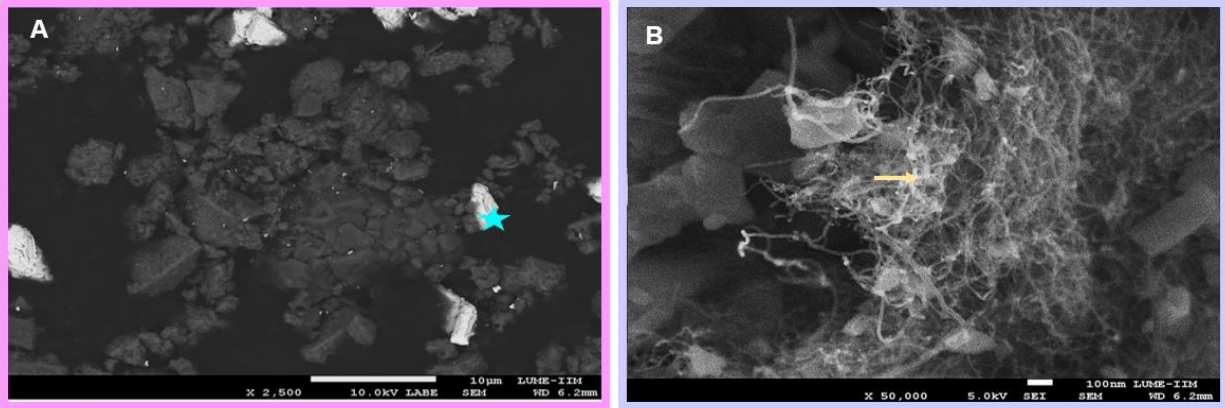


Figura 31 Composición de G3- 0.3% NT a 2,500X y 50,000X
Figura A) se observan partículas de Bismuto (Bi) con tamaño de entre 2-10 μm . En la figura B) se observan nanotubos de carbono señalados con una flecha.
(Fuente propia)

9.2.2.2 Superficies de los cementos después de la prueba de bioactividad

A partir del MEB con electrones secundarios se tomaron las imágenes de la superficie de los cementos, en donde, se observan aglomerados en la superficie que corresponden a imágenes de apatitas de acuerdo a lo reportado por la literatura.

A los 21 días, el tamaño de los aglomerados en G1- SNT y G2- 0.1% NT aumentaron de tamaño, con un diámetro uniforme cercano a las 10 μm , mientras que el G3- 0.3% NT de manera similar presenta un diámetro uniforme, pero con tamaño que oscila entre 2.5 μm - 5 μm .

El G1- SNT y G3- 0.3% NT muestran aglomerados con estructura definida en comparación al G2- 0.1% NT.

Los grupos con los agregados muestran crecimientos de aglomerados en toda la superficie de los clúster, el G2- 0.1% NT muestra más clúster en comparación al G3- 0.3% NT.

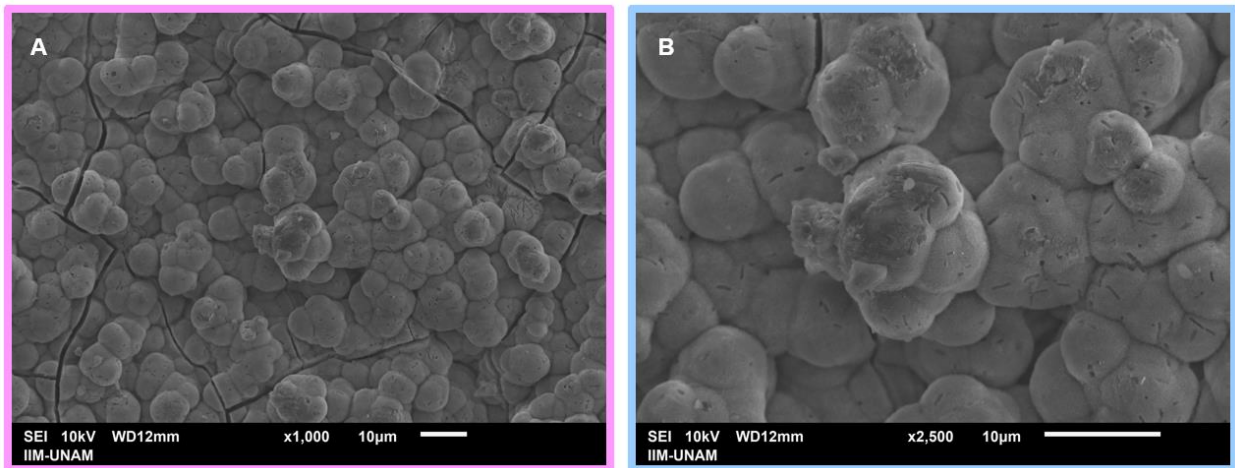


Figura 32 Superficie del G1- SNT después de la prueba de bioactividad a 1,000X y 2,500X

Figura A) se observan aglomerados en la superficie con tamaño de entre 2.5-10 μm , mientras que en la figura B) los aglomerados oscilan entre 10-15 μm .

(Fuente propia)

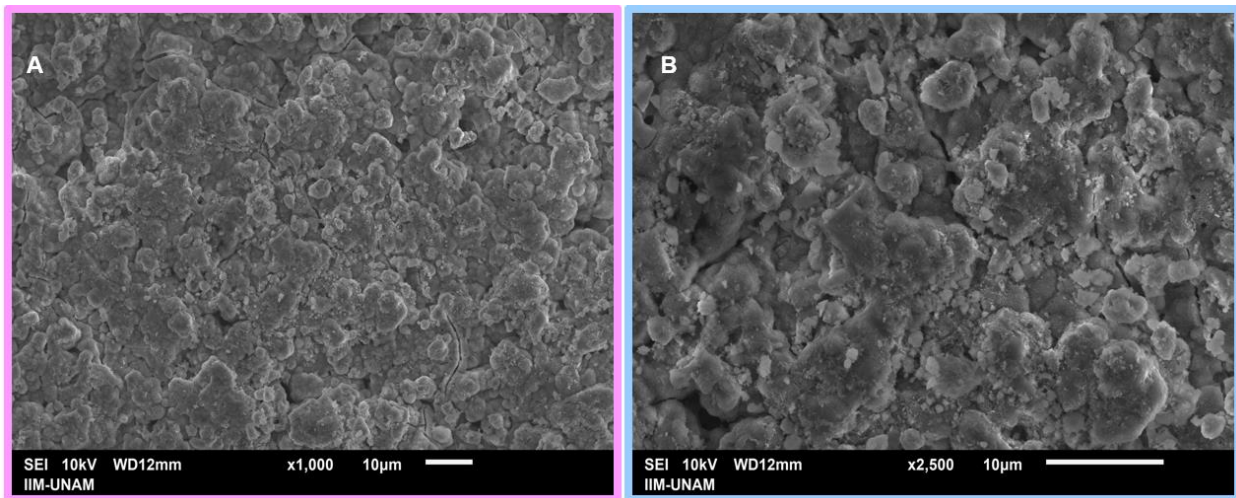


Figura 33 Superficie del G2- 0.1% NT después de la prueba de bioactividad a 1,000X y 2,500X

Las imágenes de la superficie del G2- 0.1% NT, A) y B) muestran aglomerados no homogéneos con un diámetro uniforme cercano a las 2.5 µm.

(Fuente propia)

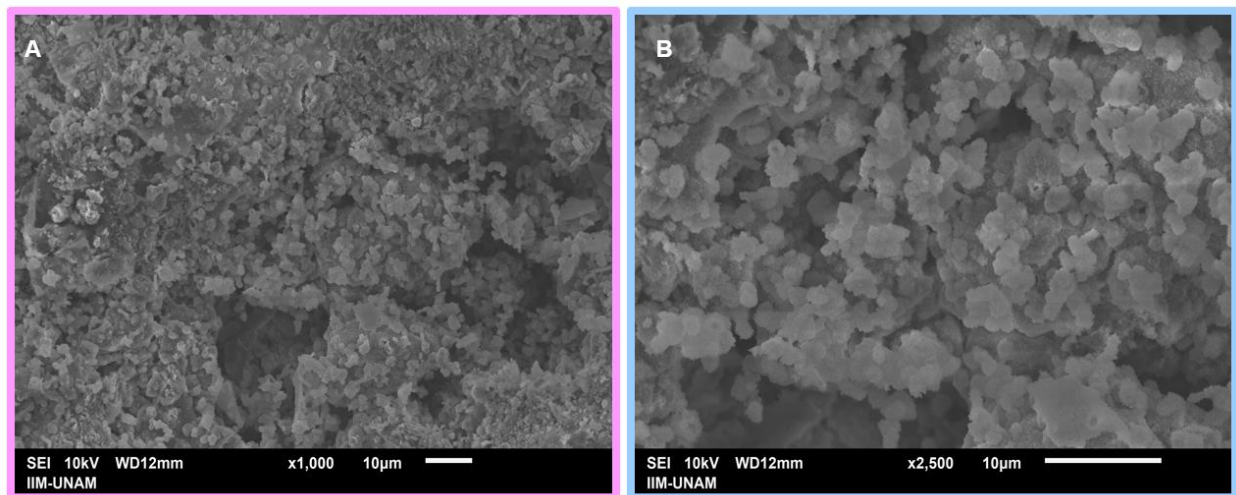


Figura 34 Superficie del G3- 0.3% NT después de la prueba de bioactividad a 1,000X y 2,500X

Las imágenes de la superficie del G3-0.3% NT, A) y B) muestran aglomerados homogéneos con un diámetro uniforme de alrededor 2.5 µm.

(Fuente propia)

10. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la viabilidad celular y bioactividad de un cemento MTA al agregar nanotubos de carbono en concentraciones de 0.1% y 0.3%. El MTA, es un material con diversas aplicaciones clínicas, sin embargo, no está exento de sus desventajas como la fragilidad, escasa resistencia al agrietamiento. Con la finalidad de mejorar las deficiencias del MTA, se ha descubierto tras diversos estudios y experimentos, que las propiedades mecánicas y subsecuentemente la durabilidad han mejorado significativamente al agregar nanotubos de carbono; debido a sus propiedades físicas, surgiendo como nanorellenos que atribuyen propiedades mecánicas y térmicas. De acuerdo a investigaciones, el tamaño y relleno de los nanotubos de carbono promueven el proceso de hidratación del cemento MTA, a partir del relleno de agujeros, favoreciendo las propiedades mecánicas y la durabilidad de la matriz del cemento.

Los resultados de viabilidad celular del cemento MTA con nanotubos de carbono en concentraciones de 0.1% y 0.3% mostraron que, a las 24h los 3 grupos de investigación no presentaron diferencias estadísticas (ANOVA $p > 0.05$). Los valores disminuyeron significativamente entre todos los grupos (ANOVA $p < 0.05$, *post hoc* Tukey $p < 0.05$) después de 48 h, pero todos cercanos al 100% del basal. Los valores disminuyeron significativamente en los 3 grupos (ANOVA $p < 0.05$, *post hoc* Tukey $p < 0.05$) a las 72h. Concluyendo que no se considera citotóxico debido a que los valores son mayores al 100%. En investigaciones como las de Nabavizadeh y cols.⁸³ en donde se evaluó la citotoxicidad de un cemento MTA y de un nuevo cemento a base de nanopartículas de silicato de calcio Nano Fast Cement (NFC) en seis concentraciones diferentes, se utilizaron fibroblastos gingivales L-929, en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y 10% de suero fetal bovino (FBS), en una atmósfera de 5% CO₂/ 95% de aire a 37°C; las cepas de células primarias derivadas de tejidos humanos vitales fueron esenciales para reproducir el medio *in vitro*, se sembraron 10⁴ células de la cuarta colección en 96 pocillos. Se realizó un estudio colorimétrico de metiltiazoltetrazolio (MTT) a las 24, 48 y 72h, los valores de absorbancia se midieron con un lector de placas ELISA con longitud de onda de 540 nm, en los análisis estadísticos, empleó *post hoc* Tukey, LSD y prueba T independiente con el programa SPSS, versión 16.0; en la viabilidad

celular con diferentes concentraciones e intervalos de tiempo ($p= 0.649$), se observó que a las 74h los valores de viabilidad disminuyeron, sin embargo, no se presentó una diferencia significativa entre el primer y segundo ensayo de MTT ($p = 0.987$). Además, la citotoxicidad aumentó significativamente a concentraciones superiores a $6.25 \mu\text{g/mL}$. Finalmente, concluyó que el tiempo, la concentración y la composición del cemento son factores que predisponen la citotoxicidad del cemento; Wang y cols.⁸⁴ evaluó a las 24 y 72h a partir de un ensayo de MTT la proliferación de células HCEM con estimulación de nanotubos de carbono, así mismo, a los 7 y 10 días con tinción con rojo de alizarina S se evaluaron los niveles de deposición de calcio. Mientras que la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa, en distintos intervalos de tiempo siendo 3, 7 y 10 días midió la expresión génica relacionada con la mineralización y a los 14 días se analizó el cultivo con nanotubos de carbono a partir de MEB, en donde se concluyó que los nanotubos de carbono se proponen como un componente innovador bioactivo para materiales de regeneración del tejido periodontal apical, por medio de la regulación de la mineralización de los cementoblastos al favorecer la mineralización de las células HCEM; Oliveira y cols.⁸⁵ en su investigación empleando células madre del modelo humano de dientes temporales, se evaluó la viabilidad celular, el estrés celular oxidativo y la integridad del ADN a partir de los efectos de los nanotubos de carbono multipared carboxilado (MWCNT - COOH) cuyos resultados demostraron que no se presentó toxicidad en las células madre, es decir, mantuvieron su viabilidad después de la exposición a MWCNT - COOH), además la actividad de la superóxido dismutasa no ocasionó efectos genotóxicos; Dayi y cols.⁸⁶ en su estudio in vitro, realizó una mezcla homogénea con MTA Angelus agregando 0.1% wt y 0.3% wt, mismos que se compararon con MTA Angelus puro, en donde el efecto citotóxico de las muestras se determinó a las 24 y 72h mediante la prueba MTT, kits de estado oxidante total (TOS) y la capacidad antioxidante total (TAC) utilizando fibroblastos gingivales, cuyos datos se analizaron estadísticamente con ANOVA unidireccional y *post hoc* Tukey, los resultados mostraron que la capacidad antioxidante total presentó diferencias estadísticas entre los grupos de material y el grupo control a las 24 y 72h y entre los grupos con óxido de grafeno y el grupo control en el MTT a las 72 h y la capacidad antioxidante total y el estado oxidante total a las 24 y 72h ($p < 0.05$). Finalmente, se concluye que al agregar óxido de grafeno al MTA disminuye

considerablemente su capacidad antioxidante de acuerdo a la dosis y el tiempo, además incrementa la toxicidad y la cantidad de oxidante, no obstante, en diversas concentraciones puede favorecer el éxito del recubrimiento pulpar.

En el análisis de DRX, no se encontró ningún indicio de formación de hidroxiapatita, sin embargo, se observa la presencia de Carbonato de calcio (Calcita) un precursor de apatitas, sus picos se compararon con la base de datos del "Power Diffraction File" PDF 05-0586. En investigaciones como las de Sorrentino y cols.⁸⁷ donde se analizó la localización y caracterización de la fase cristalina y la concentración de Ca en las deposiciones ricas en Ca en la fase temprana de la biomineralización en células madre mesenquimales óseas (bMSC) humanas mediante tomografía de rayos X suaves y criogénicas (cryoSXT) y microscopía crio-XANES (cryoXANES), cuyos resultados mostraron que la calcita cristalina se encuentra en depósitos ricos en Ca en bMSC a los 4 días después de la inducción osteoblástica (bMSC-4D), mientras que a los 10 días después de la inducción osteoblástica, los cristales de hidroxiapatita y sin CaCO₃ se detectaron depósitos en células madre mesenquimales basales (CMMB). Esto indica que la calcita es uno de los precursores del proceso de biomineralización, que finaliza con la formación de hidroxiapatita en las células madre mesenquimales basales; Jefferson y cols.⁸⁸ en su investigación a partir de caña azúcar refinada para obtener carbonato de calcio a partir del método de calcinación, posteriormente el carbonato de calcio obtenido y el ácido ortofosfórico, fueron utilizados como precursores de calcio y fósforo para sintetizar hidroxiapatita por medio del método de precipitación húmeda, en la investigación morfológica mostró diversas partículas de carbonato de calcio, la imagen de MEB mostró una alta aglomeración de partículas de carbonato de calcio y las nanopartículas de hidroxiapatita sintetizadas, el análisis de DRX y WAXS confirmó la fase de carbonato de calcio que coexiste con hidróxido de calcio y óxido de calcio, con una sola fase de hidroxiapatita; Irfa'i y cols.⁸⁹ estudió que las fuentes de calcio a partir de la materia prima de carbonato de calcio precipitado en polvo mediante etapas de procesamiento de polvo por calcinación- disolución-precipitación pueden ser utilizadas para la elaboración de materiales biomédicos, además la calcita carbonatada se ha establecido como un precursor en polvo para la producción de hidroxiapatita carbonatada; Y. Azis y cols.⁹⁰ en su investigación, el carbonato de calcio precipitado

obtenido a partir de la modificación del método de carbonatación utilizando arrecifes de coral, en donde los resultados del análisis de DRX se obtuvieron cristales de carbonato de calcio en forma de calcita, los cuales son similares al estándar de calcita (ICD 01-078-4614) con el sistema cristalino romboédrico, así mismo en el análisis MEB-EDX las partículas de carbonato de calcio precipitado mostraron una pureza del 99%, es decir, ofreció excelentes propiedades para ser utilizado como precursor de hidroxiapatita; Thi y cols.⁹¹ en su estudio a partir de la transformación de fase de calcita en solución de Na_2HPO_4 de 1mol/L se sintetizó hidroxiapatita carbonatada (CHAp), en donde los resultados mostraron que la estructura de CHAp estaba constituida por nanocristales con forma de aguja, de entre 48 y 63 nm de longitud y entre 8 y 10 nm de ancho; Ghouse y cols.⁹² sintetizó hidroxiapatita a partir del precursor de calcio en carbonato de calcio puro (CaCO_3) extraído de cáscaras de huevo mediante calcinación, posteriormente el dihidrato de fosfato de hidrógeno y calcio (DCPD) se agregaron a través de una ruta mecanoquímica simple durante 2 horas, la mezcla de polvo se sometió a un tratamiento térmico a 800°C para obtener hidroxiapatita, el análisis DRX confirmó la formación de hidroxiapatita en el polvo sintetizado con un tamaño promedio de cristalito de 26.35 +- 0.1 nm con tamaño de partícula aglomerada de 520 nm, el EDX validó la composición elemental de hidroxiapatita con una relación Ca/P de 1,76, por lo tanto, la calcita se ha utilizado con éxito como un precursor de calcio para la producción de hidroxiapatita.

En este estudio, a los 21 días después de la elaboración de las muestras. Se evaluó la bioactividad en tres grupos experimentales siendo MTA experimental, MTA con 0.1% de NTC's, MTA con 0.3% de NTC's, a partir del análisis de DRX se observó la presencia de calcita el cual ha sido reportado como un precursor de hidroxiapatita, de igual manera para poder visualizar hidroxiapatita en nuestra investigación se necesita un periodo de tiempo más largo, ya que la cantidad de apatita formada es insuficiente para poder detectarla por DRX, debido a que la principal limitante de la prueba es que la cantidad de apatita no debe ser menor al 3%. Sin embargo, en las figuras se muestran superficies con características similares a otros artículos donde han sido identificadas apatita. Estos datos son consistentes con lo reportado por Ashokan y cols.⁹³ que observó que, para mejorar la presencia de hidroxiapatita sintetizada a partir de calcita, existen diversos parámetros tales como la temperatura de reacción, el tiempo de reacción y la velocidad

de agitación, sustentados por los análisis FTIR y TG. El aumento del tiempo de reacción mejoró la formación de la fase de hidroxiapatita y la relación Ca/P en donde se acercó al valor ideal de hidroxiapatita. Las microesferas de hidroxiapatita obtenidas a partir del carbonato de calcio (calcita) prometen ser un material ideal para aplicaciones biomédicas debido a su morfología uniforme, distribución de tamaño estrecho, alta pureza y mejor área superficial. Naubnome y cols.et⁹⁴ en su estudio demostró la formación de un polvo cristalino monofásico de hidroxiapatita de calcio (Ca-HA) mediante una solución acuosa con múltiples fuentes de fósforo (calcita), en donde, en todos los patrones de DRX obtenidos de las diferentes fuentes de fósforo concuerdan con el modelo de estructura cristalina.

11. CONCLUSIONES

1. A las 72h se observó una significativa reducción en la viabilidad en los 3 grupos de investigación.
2. El agregar nanotubos no se considera citotóxico en ningún intervalo de tiempo, debido a que los valores a las 24, 48 y 72h son mayores al 70%.
3. En la prueba de bioactividad, en ningún grupo se encontró indicio de formación de hidroxiapatita, sin embargo, se observó Calcita que es un precursor de apatitas, por lo que se sugiere aumentar el tiempo de prueba.

12. BIBLIOGRAFÍAS

1. Flores-Ledesma A, Tejeda-Cruz A, Moyaho-Bernal MA, Wintergerst A, Moreno-Vargas YA, Rodríguez-Chávez JA, et al. Physical properties, marginal adaptation and bioactivity of an experimental mineral trioxide aggregate-like cement modified with bioactive materials. *J Oral Sci.* 2023;65(2):141–7.
2. Harold Zebadúa-Castellanos C, Marín-Miranda M, Guerrero Ibarra J, Flores-Ledesma A, García-Briseño K, Bucio-Galindo L, et al. Evaluación de pH, fraguado y resistencia a la compresión de dos cementos MTA comerciales y un MTA de reciente desarrollo [Internet]. Vol. 26, Núm. 1 Enero-Marzo. 2022. Available from: www.medigraphic.com/facultadodontologiaunam
3. Flores-Ledesma A, Barceló Santana F, Bucio L, Arenas-Alatorre JA, Faraji M, Wintergerst AM. Bioactive materials improve some physical properties of a MTA-like cement. *Materials Science and Engineering C.* 2017 Feb 1;71:150–5.
4. Padrón-Alvarado K, García-Mendoza LA, Ramírez-Ortega JP, Rodríguez-Chavéz JA, Moyaho-Bernal MDLA, Arreguín-Cano JA, et al. Cell viability and physicochemical effects of different concentrations of bismuth trioxide in a mineral trioxide aggregate cement. *J Oral Sci.* 2023;65(1):10–4.
5. Berzins DW. Chemical Properties of MTA. In: *Mineral Trioxide Aggregate.* Wiley; 2014. p. 17–35.
6. Camilleri J. Mineral trioxide aggregate: present and future developments. *Endod Topics.* 2015 May 27;32(1):31–46.
7. Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J.* 2005;38(11):834–42.
8. Llanos-Carazas M. Evolution of bioceramic cements in endodontics. *Conocimiento para el Desarrollo.* 2019 Jun 29;10(1):151–62.
9. Howard R, Jeffrey MT. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Academy of Dental Materials.* 2008;24(2):149–64.
10. Camilleri J, Montesin F, Brady K, Sweeney R, Curtis R. The constitution of Mineral Trioxide Aggregate. *Academy of Dental Materials.* 2004;21(4):297–303.
11. Asgary S, Parirokh M, Eghbal M, Brink F. Chemical Differences Between White and Gray Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.* 2005 Feb;31(2):101–3.

12. Carita Tavares KIM, Santos-Junior AO, Pinto JC, Torres FFE, Duarte MAH, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Influence of Bioceramic Clinker particle size, radiopacifier, and liquids on their physicochemical properties. *Braz Dent J.* 2025;36.
13. INTERNATIONAL STANDARD ISO 6876 Dental root canal sealing materials. 2001.
14. Pushpalatha C, Dhareshwar V, Sowmya S V., Augustine D, Vinothkumar TS, Renugalakshmi A, et al. Modified Mineral Trioxide Aggregate—A Versatile Dental Material: An Insight on Applications and Newer Advancements. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10.
15. Yoldaş SE, Bani M, Atabek D, Bodur H. Comparison of the Potential Discoloration Effect of Bioaggregate, Biodentine, and White Mineral Trioxide Aggregate on Bovine Teeth: In Vitro Research. *J Endod.* 2016 Dec 1;42(12):1815–8.
16. Vallés M, Roig M, Duran-Sindreu F, Martínez S, Mercadé M. Color Stability of Teeth Restored with Biodentine: A 6-month In Vitro Study. *J Endod.* 2015;41(7):1157–60.
17. Timmerman A, Parashos P. Bleaching of a Discolored Tooth with Retrieval of Remnants after Successful Regenerative Endodontics. *J Endod.* 2018 Oct 24;44(1):93–7.
18. Komabayashi T, Spångberg L. Particle size and shape analysis of MTA finer fractions using Portland cement. *J Endod.* 2008 Apr 15;34(6):709–11.
19. Dammaschke T, Gerth H, Züchner H, Züchner H. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dent Mater.* 2005 Aug;21(8):731–8.
20. Plascencia H, Solís R, Díaz M, Cholico P, Vázquez J. Apexificación mediante creación de barrera apical con MTA: serie de 5 casos. Vol. 2, Caso Clínico *Rev Tamé.* 2014.
21. Sinha AA, Dakshita J. An update on the concepts and application of mineral trioxide aggregate-part I: physicochemical properties and mechanism of action. *Lond Engl.* 2011;5(4):255–62.
22. Clauder T, Shin SJ. Repair of perforations with MTA: clinical applications and mechanisms of action. *Endod Topics.* 2009 Nov 8;15:32–55.
23. Espinoza F, Lizana A, Muñoz P. Biocerámicos en odontología, una revisión de literatura. *Canal Abierto.* 2020;41:14–21.
24. Sarkar N, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical Basis of the Biologic Properties of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.* 2005 Feb;31(2):97–100.

25. Chiang YC, Chang HH, Wong CC, Wang YP, Wang YL, Huang WH, et al. Nanocrystalline calcium sulfate/hydroxyapatite biphasic compound as a TGF- β 1/VEGF reservoir for vital pulp therapy. *Dent Mater.* 2016 Oct;32(10):1197–208.
26. Torabinejad M, Hong C, McDonald F, Pittford T. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995 Jul;21(7):349–53.
27. Natale LC, Rodrigues MC, Xavier TA, Simões A, de Souza DN, Braga RR. Ion release and mechanical properties of calcium silicate and calcium hydroxide materials used for pulp capping. *Int Endod J.* 2015 Jan;48(1):89–94.
28. Tu MG, Lee AKX, Lin YH, Huang TH, Ho CC, Shie MY. Caffeic Acid-coated Nanolayer on Mineral Trioxide Aggregate Potentiates the Host Immune Responses, Angiogenesis, and Odontogenesis. *J Endod.* 2020 Oct;46(10):1455–64.
29. Huang TH, Shie MY, Kao CT, Ding SJ. The Effect of Setting Accelerator on Properties of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.* 2008 May;34(5):590–3.
30. Camilleri J, Formosa L, Damidot D. The setting characteristics of MTA Plus in different environmental conditions. *Int Endod J.* 2013 Sep 26;46(9):831–40.
31. Fridland M, Rosado R. Mineral Trioxide Aggregate (MTA) Solubility and Porosity with Different Water-to-Powder Ratios. *J Endod.* 2003 Dec;29(12):814–7.
32. Camilleri J. Mineral Trioxide Aggregate in Dentistry. Camilleri J, editor. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
33. Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *Int Endod J.* 2014 May 28;47(5):437–48.
34. Vitti R, Prati C, Silva E, Sinhoreti M, Zanchi C, de Souza e Silva M, et al. Physical Properties of MTA Fillapex Sealer. *J Endod.* 2013 Jul;39(7):915–8.
35. Ha W, Nicholson T, Kahler B, Walsh L. Mineral Trioxide Aggregate—A Review of Properties and Testing Methodologies. *Materials.* 2017 Nov 2;10(11):1261.
36. Vergalito A, Pardini O, Amalvy J, Cañete M, Resa A, Gráfico D. Estudio de la solubilidad in vitro de un sellador de uso en endodoncia (MTA). *Rev Soc Odontol La Plata.* 2019;(57):15–9.
37. Flores A, Gutiérrez K, Bucio L. Estimación de la cantidad de trióxido de bismuto como agente radiopacificador en dos cementos minerales trióxido agregado mediante una prueba de radiopacidad. *Revista Odontológica Mexicana.* 2020 Apr 21;23(3):139–48.

38. Xavier C, Weismann R, de Oliveira M, Demarco F, Pozza D. Root-end filling materials: apical microleakage and marginal adaptation. *J Endod.* 2005 Jul;31(7):539–42.
39. Vajja S, Naik BD, Vummidisetti S V, Yarlagadda V. Influence of Different Thickness of Mineral Trioxide Aggregate, Resin Modified Glass Ionomer Cement and Intermediate Restorative Material on Sealing Ability of Root End Fillings: An in vitro Study. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH.* 2018 Jan;12(1):10–3.
40. Mokhtari F, Modaresi J, Bagheri A. Effect of blood contamination on marginal adaptation of cold ceramic and MTA angelus: a scanning electron microscopic study. *BMC Oral Health.* 2023 Dec 1;23(1):1–6.
41. Jovanović L, Bajkin B. Análisis mediante microscopía electrónica de barrido de la adaptación marginal del agregado de trióxido mineral, cemento de silicato tricálcico y amalgama dental como materiales de obturación del extremo radicular. *Microsc Res Tech.* 2021;84(9):2068–74.
42. Gilbert D, Friedrich O. *Cell Viability Assays.* Gilbert DF, Friedrich O, editors. Vol. 1601. New York, NY: Springer New York; 2017.
43. Aysun A, Yağmur K, Yusuf B. *Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays.* *Curr Pharm Biotechnol.* 2016 Nov 11;17(14):1213–21.
44. Riss T, Niles M, Rich B, Natashia M, Vidugiriene J. *Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells.* Markossian S GABH et al, editor. 2019.
45. Zarria-Romero J, Osorio A, Pino J, Shiga B, Vivas-Ruiz D. Efecto de las nanopartículas industriales TiO₂, SiO₂ y ZnO sobre la viabilidad celular y expresión génica en médula osea roja de *Mus musculus*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2017 Sep 11;34(3):436.
46. van Tonder A, Joubert A, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes.* 2015 Dec 20;8(1):47.
47. Martinez-Hernandez M, Manzo-Garcia D, Ramirez-Ortega JP, Arreguin-Cano JA, Chavez-Cortez EG, Arenas-Alatorre JA, et al. Antimicrobial activity, viability, and physicochemical properties of an MTA-type cement with different concentrations of bismuth trioxide. *Materials Science- Poland.* 2023 Aug 1;41(2):339–53.
48. Birant S, Gokalp M, Duran Y, Koruyucu M, Akkoc T, Seymen F. Cytotoxicity of NeoMTA Plus, ProRoot MTA and Biodentine on human dental pulp stem cells. *J Dent Sci.* 2021 Jul;16(3):971–9.
49. Schmalz G, Hickel R, Price RB, Platt JA. Bioactivity of Dental Restorative Materials: FDI Policy Statement. *Int Dent J.* 2023 Feb;73(1):21–7.

50. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006 May;27(15):2907–15.
51. Baino F, Yamaguchi S. The Use of Simulated Body Fluid (SBF) for Assessing Materials Bioactivity in the Context of Tissue Engineering: Review and Challenges. *Biomimetics*. 2020 Oct 29;5(4):57.
52. International Organization for Standardization. Implants for surgery-In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials. ISO 23317. 2014.
53. Scimeca M, Bischetti S, Lamsira HK, Bonfiglio R, Bonanno E. Energy dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry*. 2018;62(1):89–99.
54. European Commission. Types and uses of nanomaterials, including, safety aspects [Internet]. 2012. Available from: http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/files/reach/nanomaterials_en.pdf.
55. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). Seguridad y salud en el trabajo con nanomateriales [Internet]. 2015. Available from: <http://publicacionesoficiales.boe.eshttp://www.insht.es/catalogopublicaciones/>
56. Ramírez C, Cabañas J, Flores A. Desarrollo de compuestos poliméricos reforzados con nanotubos de carbono y nanofibras de carbono para su posible aplicación en celdas de combustible poliméricas. 2018.
57. López L, López M, González E. Aplicaciones en medicina de los nanomateriales de carbono [Tesis licenciatura] Universidad de Cantabria; 2017. [cited 2024 Aug 23]. Available from: <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/11676/Lopez-Zalduendo%20Zapater%20Loreto.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
58. Andrade Guel ML, López López LI, Sáenz Galindo A. Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas* [Internet]. 19AD [cited 2024 Aug 23];43(3):9–18. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
59. Figueroa E, Robles M, Martínez J, Hernández D. Efecto de la concentración de nanotubos de carbono en las propiedades fotoelectroluminiscentes de composites de hidroxiapatita [Tesis doctoral]. Puebla, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2024. [cited 2024 Aug 23]. Available from: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/77655f84-e096-4c2d-9113-80a6df9416b7>
60. Marcondes C, Medeiros. M, Marques Filho J, Helene P. Nanotubos de carbono en concreto de cemento Portland. Influencia de la dispersión en las propiedades mecánicas y en la absorción de agua. *Revista ALCONPAT*. 2005;5(2):96–113.

61. Li H, Wang G, Wu Y, Jiang N, Niu K. Functionalization of Carbon Nanotubes in Polystyrene and Properties of Their Composites: A Review. Vol. 16, *Polymers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
62. Niu X, Chen Y, Li Z, Guo T, Ren M, Chen Y. Study on the Properties of Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs)/Polypropylene Fiber (PP Fiber) Cement-Based Materials. *Polymers (Basel)*. 2024 Jan 1;16(1).
63. Saleh TA, Gupta VK. Synthesis, Classification, and Properties of Nanomaterials. In: *Nanomaterial and Polymer Membranes*. Elsevier; 2016. p. 83–133.
64. Thirumalai J. Introductory Chapter: The Testament of Hydroxyapatite: New Prospects in Regenerative Medicinal Treatments. In: *Hydroxyapatite - Advances in Composite Nanomaterials, Biomedical Applications and Its Technological Facets*. InTech; 2018.
65. Luthfiyah S, Soegijono B, Susetyo FB, Notonegoro HA. Comparing Properties of Bovine Bone Derived Hydroxyapatite and Synthetic Hydroxyapatite. *Journal of Applied Science and Engineering*. 2022;25(6):1045–51.
66. Callister WD, David Rethwisch JG. *MATERIALS SCIENCE and ENGINEERING*.
67. Cruz-Gandarilla F, Cabanas-Moreno JG, Ortega M. Aplicaciones de la Difracción de Rayos X a Materiales Policristalinos [Internet]. 2005. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/273458745>
68. Bishnoi A, Kumar S, Joshi N. Wide-Angle X-ray Diffraction (WXRd). In: *Microscopy Methods in Nanomaterials Characterization*. Elsevier; 2017. p. 313–37.
69. Epp J. X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization. In: *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*. Elsevier; 2016. p. 81–124.
70. Ermrich M, Opper D. X-RAY POWDER DIFFRACTION $n\lambda = 2d \sin \theta$ The Analytical X-ray Company [Internet]. Available from: www.panalytical.de
71. Adaskaveg JE. *Introduction to the Scanning Electron Microscope*. 1997.
72. Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, Joy DC, Lyman CE, Lifshin E, et al. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. Boston, MA: Springer US; 2003.
73. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod*. 1995 Jun;21(6):295–9.
74. Melo V, Calixto J, Ladeira L, Silva AR. Macro- and Micro- Characterization of Mortars Produced with Carbon Nanotubes . *Materials Journal*. 2011;108(3):327–32.

75. Flores Ledesma A, Barceló Santana FH, Bucio Galindo L, Arenas Alatorre JÁ, Ruvalcaba Sil JL. Análisis químico elemental y de fases por medio de PIXE, DSC, TGA y DRX en MTA Angelus® y un cemento Portland blanco. *Revista Odontológica Mexicana*. 2016 Jul;20(3):187–92.
76. An J, McInnis M, Chung W, Nam BH. Feasibility of using graphene oxide nanoflake (GONF) as additive of cement composite. *Applied Sciences (Switzerland)*. 2018 Mar 12;8(3).
77. Liu Y, Liu XM, Bi J, Yu S, Yang N, Song B, et al. Cell migration and osteo/odontogenesis stimulation of iRoot FS as a potential apical barrier material in apexification. *Int Endod J*. 2020 Apr 7;53(4):467–77.
78. Cerro-Prada E, Pacheco-Torres R, Varela F. Effect of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Strength and Electrical Properties of Cement Mortar. *Materials*. 2020 Dec 26;14(1):79.
79. Ramezani M, Kim YH, Sun Z. Mechanical properties of carbon-nanotube-reinforced cementitious materials: Database and statistical analysis. *Magazine of Concrete Research*. 2020 Oct 1;72(20):1047–71.
80. Lozano-Guillén A, López-García S, Rodríguez-Lozano FJ, Sanz JL, Lozano A, Llena C, et al. Comparative cytocompatibility of the new calcium silicate-based cement NeoPutty versus NeoMTA Plus and MTA on human dental pulp cells: an in vitro study. *Clin Oral Investig*. 2022 Dec 1;26(12):7219–28.
81. International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices. ISO 10993-1. 2009.
82. Flores A, Tejada A, Bucio L, Wintergerst AM, Rodríguez J, Moreno Y, et al. Hydration products and bioactivity of an experimental MTA-like cement modified with wollastonite and bioactive glass. *ELSEVIER* . 2020;1–9.
83. Nabavizadeh MR, Moazzami F, Gholami A, Mehrabi V, Ghahramani Y. Cytotoxic Effect of Nano Fast Cement and ProRoot Mineral Trioxide Aggregate on L-929 Fibroblast Cells: an in vitro Study. *Journal of Dentistry (Iran)*. 2022;23(1):13–9.
84. Wang TH, Watanabe K, Muromachi K, Hamada N, Tani-Ishii N. Carbon Nanotubes Induce Mineralization of Human Cementoblasts. *J Endod*. 2024 Aug;50(8):1117–23.
85. Oliveira ER, Fayer L, Zanette RSS, Ladeira LO, de Oliveira LFC, Maranduba CMC, et al. Cytocompatibility of carboxylated multi-wall carbon nanotubes in stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Nanotechnology*. 2022 Feb 5;33(6):065101.

86. Dayi B, Küçükyıldız EN, Taghizadehghalehjoughi A. Evaluation of Cytotoxic Effect of Graphene Oxide Added to Mineral Trioxide Aggregate. *J Adv Oral Res.* 2023 May 1;14(1):21–8.
87. Sorrentino A, Malucelli E, Rossi F, Cappadone C, Farruggia G, Moscheni C, et al. Calcite as a precursor of hydroxyapatite in the early biomineralization of differentiating human bone-marrow mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci.* 2021 May 1;22(9).
88. Jefferson M, Torgbo S, Sukyai P, Watthanasakphuban N, Kamonsutthipaijit N. Filter cake-derived calcium carbonate polymorphs from sugar refinery for hydroxyapatite production as a sustainable material for biomedical application. *Ceram Int.* 2023 Jul;49(14):23417–25.
89. Irfa'i MA, Schmahl WW, Pusparizkita YM, Muryanto S, Prihanto A, Ismail R, et al. Hydrothermally synthesized-nanoscale carbonated hydroxyapatite with calcium carbonates derived from green mussel shell wastes. *J Mol Struct.* 2024 Jun;1306:137837.
90. Y. Azis, Jamarun N, Alfarisi CD, Mutamima A, Komalasari, Nurfatihayati, et al. PRECIPITATED CALCIUM CARBONATE (PCC) FROM CORAL REEF AS RAW MATERIAL FOR SYNTHESIS OF HYDROXYAPATITE NANOPARTICLES. *Rasayan Journal of Chemistry.* 2022;15(01):96–101.
91. Thi B Le, Khai HQ, Long BD, Ramesh S. Fabrication of nanoparticle carbonated hydroxyapatite by phase transformation of calcium carbonate prepared by sol-gel hydrothermal method. In 2023. p. 050020.
92. Ghouse RM, Natasha AN, Shahedan NF, Ramesh S, Bang LT. The Properties of Hydroxyapatite Derived from Carbonate Eggshell Waste Through Ball Milling and Heat Treatment Method. *International Journal of Integrated Engineering.* 2024;16(8):112–20.
93. Ashokan A, Kumar TSS, Jayaraman G. Process optimization for the rapid conversion of calcite into hydroxyapatite microspheres for chromatographic applications. *Sci Rep.* 2022 Dec 1;12(1).
94. Naubnome V, Prihanto A, Schmahl WW, Pusparizkita YM, Ismail R, Jamari J, et al. Chemical precipitation of nanocrystalline hydroxyapatite with calcium carbonate derived from green mussel shell wastes and several phosphorus sources. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering.* 2025 Jun;11:101154.