

---

Trabajo Fin de Grado

Estabilidad del color de un polímero de grafeno  
después de su inmersión en distintas bebidas

Clara Díaz Borgen

---



Aquest treball està subjecte a la llicència [Reconeixement-  
NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-  
ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Este trabajo está sujeto a la licencia [Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0  
Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

This end of degree project is licensed under the [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0  
International \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

## Trabajo de Fin de Grado

# ESTABILIDAD DEL COLOR DE UN POLÍMERO DE GRAFENO DESPUÉS DE SU INMERSIÓN EN DISTINTAS BEBIDAS

GRADO DE ODONTOLOGÍA

---

Autor	<b>Clara Díaz Borgen</b>
Director	Oriol Cantó Navés
Fecha de presentación	8 de mayo de 2020

---



*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,  
la electricidad y la energía atómica: la voluntad”.*

Albert Einstein



## Agradecimientos

---

En primer lugar quisiera agradecer al profesorado de la Universidad Internacional de Catalunya por sus enseñanzas, su dedicación y su tiempo en estos 5 años de formación académica.

Gracias a Graphenano Dental por la prestación del material, sin el cual no hubiera sido posible este estudio.

Gracias al laboratorio Technos, en especial a Josep Torrents y Aina Torrents por su cooperación en el preparado de las muestras de este trabajo y su constante amabilidad.

Quisiera dedicarle un especial agradecimiento al Dr. Cantó por el permanente apoyo y dedicación en este proyecto. Gracias Oriol por contagiarme tu entusiasmo y pasión por la odontología y por su permanente evolución.

Agradecer de todo corazón a la Dra. María Arregui, por su gran ayuda y soporte tanto a nivel académico como a nivel personal durante estos años en la UIC.

A mi entrenador Felipe Carvacho y a toda la comunidad AKU por hacerme más fuerte para seguir afrontando nuevos retos.

A mis amigos, por regalarme pedacitos de vida en cada carcajada que compartimos juntos, inclusive en aquellos momentos en que no fue fácil seguir adelante.

Y por último a mi familia, por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi carrera universitaria y a lo largo de mi vida; gracias por creer en mí incluso cuando ni yo misma lo hacía.

*Matías, gracias por recordarme con tus 8 añitos, que no hay que perder la ilusión al crecer. Eres increíble.*

*Mamá, gracias por ser mi referente, por transmitirme tu pasión por la profesión, por enseñarme que no existe dificultad que no se pueda superar con trabajo y esfuerzo, que no existen derrotas sino aprendizajes y por no dejar que me rinda en perseguir mis sueños y en seguir soñando cada día.*

Muchas gracias, sin vosotros no hubiera llegado hasta aquí.



# ÍNDICE

---



<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE VII</b>	
ÍNDICE DE TABLAS .....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>XI</b>
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
II.1. OBJETIVO PRINCIPAL .....	22
II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>III. HIPÓTESIS .....</b>	<b>23</b>
III.1. HIPÓTESIS NULA.....	24
III.1.2. Hipótesis nulas específicas.....	24
III.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA .....	24
III.2.1. Hipótesis alternativas específicas .....	24
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>33</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>33</b>
<b>X. ANEXOS .....</b>	<b>33</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. SOLUCIONES DE IMERSIÓN EMPLEADAS EN LA INVESTIGACIÓN .....	29
TABLA 2. MEDIA DE LOS VALORES DE LOS CAMBIOS DE COLOR $\Delta E_{00}$ Y SUS DESVIACIONES DE LAS MUESTRAS DE PMMA+GRAFENO Y PMMA DESPUÉS DE 24H Y 7 DÍAS DE INMERSIÓN EN CADA SOLUCIÓN CROMÓGENA .....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESCANEADO DEL MODELO DE YESO CON ESCÁNER MEDIT T-500 (3DBIOTECH – ESPAÑA).....	26
FIGURA 2. DISEÑO CON EXOCAD 6136 64 DE LA CORONA MAESTRA. VISTA PALATINA DE LA DEFINICIÓN DEL MARGEN .....	26
FIGURA 3. DISEÑO CON EXOCAD 6136 64 DE LA CORONA MAESTRA VISTA VESTIBULAR .....	26
FIGURA 4. DISCOS DE PMMA+GRAFENO Y PMMA A2.....	27
FIGURA 5. DISCO PMMA+GRAFENO A2 FRESADO: VISTA DE LA PARTE INTERIOR DE LAS CORONAS .....	27
FIGURA 6. DISCO PMMA+GRAFENO A2 FRESADO: VISTA INCISAL .....	27
FIGURA 7. DISCO PMMA A2 FRESADO: VISTA DE LA PARTE INTERIOR DE LAS CORONAS.....	27
FIGURA 8. DISCO PMMA A2 FRESADO: VISTA INCISAL.....	27
FIGURA 9. CORONA FRESADA Y PULDA DE PMMA+GRAFENO .....	28
FIGURA 10. CORONA FRESADA Y PULIDA DE PMMA.....	28
FIGURA 11. CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PMMA+GRAFENO .....	28
FIGURA 12. CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PMMA .....	28
FIGURA 13. TOMA DE COLOR CON EL ESPECTROFOTÓMETRO DE MUESTRA DE PMMA+GRAFENO.....	29



# I. INTRODUCCIÓN

---

A menudo la boca se describe como una “ventana del cuerpo”; no solo por la manifestación de problemas de salud sistémicos, sino también por el impacto sociológico que ésta supone. La cavidad oral puede ser utilizada por la sociedad para determinar el modo en el que una persona es percibida <sup>(1)</sup>. Existe el concepto de "lo que es hermoso es bueno", el cual se basa en que las personas atractivas obtienen beneficios sociales atribuibles a su apariencia debido a los estereotipos físicos <sup>(2)</sup>. La fuerte demanda en la sociedad de mejorar el atractivo facial está arraigada en la influencia que la belleza de una persona tiene en cómo es percibida. Varios estudios han demostrado la relación entre poseer un mayor nivel de atractivo y una evaluación del comportamiento más positivos por parte del entorno <sup>(3)</sup>.

La importancia del atractivo dental en el atractivo facial juega un papel significativo en la determinación de una primera impresión <sup>(3)</sup>. La estética en la odontología y sus resultados positivos, contribuyen de manera decisiva en el bienestar de los pacientes, y el encontrarse bien es un factor crucial para la salud. En la actualidad éstos no esperan únicamente que se les proporcionen unos dientes y un periodonto sanos y una función neuromuscular normal. El deseo de muchos pacientes se centra más bien en obtener unos dientes bonitos. En la odontología se ofrece el servicio de la belleza, la cual es necesaria para el bienestar general y la autoestima <sup>(4)</sup>.

A lo largo de la historia de la humanidad, en numerosas civilizaciones se han encontrado diferentes métodos para restituir la función y estética dental, desde piedras preciosas hasta el reemplazo con dientes de otras especies. Si bien ha habido un enorme progreso en todo el campo de los materiales dentales, los composites dentales han sido transformadores, produciendo restauraciones estéticas para todas las aplicaciones intraorales <sup>(5,6)</sup>. El objetivo sobre todo en los dientes anteriores, ha sido siempre crear restauraciones semejantes al diente. En la primera mitad del siglo XX el material de elección era el cemento de silicato. El desarrollo del composite fue el comienzo de una nueva época. Los composites dentales contienen tres componentes: una matriz o fase orgánica, un agente de unión o silano y partículas de relleno o fase inorgánica <sup>(4)</sup>.

Las propiedades físicas, mecánicas, estéticas y el comportamiento clínico de los composites dependen de la combinación de las distintas proporciones de dichos componentes <sup>(6)</sup>. Los primeros composites dentales se introdujeron en la década de 1950 como polimetilmetacrilato autocurado (PMMA) con partículas de cuarzo añadidas para el fortalecimiento. Para abordar los problemas clínicos de alta contracción y poca resistencia a la abrasión, el Dr. Rafael Bowen, a principios de la década de 1960, reemplazó el monometacrilato (MMA) por monómeros de dimeacrilato, principalmente bisfenol a metacrilato de glicida (Bis-GMA) (*Bowen 1963*). El Bis-GMA es extremadamente viscoso y requiere dilución con dimetacrilatos de menor peso molecular, como el dimetacrilato de trietilenglicol (TEGDMA), que mejora el curado general y sus propiedades. Estos composites requerían de mezcla de masa con un catalizador para su posterior autocuración. El resultante tenía un tiempo de trabajo limitado, problemas con las proporciones y la estabilidad del color y la porosidad era elevada dado el atrapamiento de aire durante la unión <sup>(6)</sup>.

La incorporación de un fotoiniciador ultravioleta (UV) produjo un sistema de una sola pasta que al exponerse a una luz UV se polimerizaba. Los problemas de salud por la exposición del personal a los rayos UV y la limitada profundidad del fotocurado estimularon la búsqueda de un sistema alternativo de polimerización. A finales de la década de 1970, se produce la introducción de la canforoquinona (CQ) con una amina aceleradora que dependiente de la formulación del composite, permite un sistema con mayor profundidad de fotocurado al exponerse a la luz azul visible de una fuente halógena de tungsteno de cuarzo <sup>(7)</sup>.

El gran tamaño de las partículas de relleno de estos composites (de 10 a 50nm), resultaba ser un problema clínico para la obtención y el mantenimiento de una superficie altamente pulida, creando un acabado "mate". De ese modo se desarrollaron composites de microrrelleno, en los cuales se empleaban partículas de relleno de sílice nanométricos (40 a 50 nm). Estos eran altamente pulibles y se mantenían lisos, pero sus propiedades mecánicas eran inferiores. En la década de 1980, llegan los composites híbridos, los cuales presentaban una combinación de rellenos más grandes para la resistencia, y partículas más pequeñas para los espacios entre partículas más grandes.

Estos composites eran compactos, pero en cuanto sus características de pulido no resultaron satisfactorias y presentaban limitada resistencia al desgaste. Con un menor espaciado entre partículas, el desgaste clínico disminuyó; esto condujo a la aparición de los composites microhíbridos en el 1990 y nano híbridos en el 2000, altamente exitosos y populares clínicamente <sup>(8,9)</sup>.

Cabe nombrar que el avance en el campo de los composites va acompañado del progreso de los dispositivos de fotocurado. El diodo emisor de luz (LED) sintonizado con el rango de longitud de onda de 450 a 470 nm requerido por las canforoquinonas, llegó a reemplazar a las lámparas halógenas. Las luces LED producían mucho menos calor, requerían menos energía y eran más susceptibles para las opciones alimentadas por batería. Con el tiempo, se emplearon fotoiniciadores más estéticos (menos amarillos) que absorbían más cerca del rango UV (alrededor de 400 nm) <sup>(5,7)</sup>.

Los avances en los biomateriales adhesivos han dado lugar a restauraciones con mayor retención, adaptación marginal, sellado y reducción de microfiltración <sup>(10)</sup>. Actualmente a raíz de sus excelentes propiedades estéticas, físicas y mecánicas, los composites constituyen el grupo de materiales restauradores más utilizados en la cavidad bucal <sup>(11,12)</sup>. Dadas las técnicas de restauración actuales, permiten al clínico realizar tratamientos más conservadores y preservar la estructura dental al mismo tiempo que mejora la longevidad y estética de la restauración dental <sup>(10)</sup>.

El éxito de las restauraciones de composite depende en gran medida de su estabilidad del color y del acabado y pulido de su superficie <sup>(13)</sup>. El color es uno de los parámetros de mayor peso cuando el paciente juzga la calidad de la restauración que le realiza el odontólogo, sobre todo en la región anterior. Alcanzar un perfecto mimetismo con los tejidos o los dientes circundantes, se convierte así en un objetivo clave para el profesional <sup>(11)</sup>. Sin embargo, el cambio de color de las restauraciones sigue siendo un problema importante para los dentistas. Una restauración estética con un color inaceptable es responsable de insatisfacción del paciente y la principal causa de reemplazo de restauraciones dentales anteriores <sup>(14)</sup>. Las restauraciones en la cavidad oral están expuestas a varios factores que los hacen vulnerables a estos cambios, como la temperatura, la humedad, la dieta y los hábitos tabáquicos <sup>(15)</sup>.

La decoloración del composite puede estar causada por factores intrínsecos y/o extrínsecos. Las decoloraciones intrínsecas son debidas a reacciones fisicoquímicas en las porciones profundas de la restauración, donde se incluyen el sistema iniciador y la duración de polimerización, la composición de la matriz de resina, la conversión de los monómeros de la matriz, el tamaño y dureza de las partículas y la oxidación de los enlaces dobles de carbono no reaccionados <sup>(12,14,15)</sup>. Por otro lado, las decoloraciones extrínsecas son producidas por la degradación y alteración de la superficie, produciéndose fenómenos de absorción de colorantes contenidos en bebidas y alimentos <sup>(12,15)</sup>.

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que el consumo de ciertas bebidas e ingredientes alimentarios comunes, como el café, el té, el vino tinto, los jugos de frutas, las bebidas de cola, la salsa de soja, la mostaza y el ketchup afecta a la estética y las propiedades físicas de los composites; por lo tanto afecta a la vida clínica de las restauraciones <sup>(11,12,16,17)</sup>. Sus efectos se relacionan con la frecuencia y la cantidad de su ingesta. Propiedades como resistencia al desgaste, durabilidad de la interfaz entre diente y restauración, y el grado de destrucción de los tejidos dentarios se ven afectados <sup>(11,18)</sup>.

Entre los hábitos alimenticios más comunes en la población occidental y latinoamericana se encuentra el consumo de café, té negro y vino tinto. Éstos contienen importantes antioxidantes fenólicos como los ácidos clorogénico y cafeico, tequinas, taninos y quercetinas que causan pigmentaciones extrínsecas tanto a piezas dentarias sin tratamiento como a las diferentes restauraciones <sup>(11)</sup>.

Dada la expansión del uso de compuestos de resina, se han buscado modos de mejorar sus características. Uno de los modos ha sido convertir el material directo en un compuesto procesado en laboratorio de modo indirecto <sup>(19)</sup>.

Dentro de los composites indirectos se encuentran los composites procesados de diseño asistido por ordenador/fabricación asistida por ordenador (CAD/CAM) <sup>(15)</sup>. Como resultante de un proceso de fabricación optimizado con un alto constante de presión y temperatura, los composites y composites híbridos CAD/CAM permiten realizar



restauraciones delgadas para opciones de tratamiento mínimamente invasivas con propiedades mecánicas mejoradas como: mayor resistencia al desgaste, menor contracción de polimerización, más homogeneidad, menos porosidad, menor grado de decoloración y mejor biocompatibilidad <sup>(19)</sup>. La primera restauración CAD/CAM se fabricó en 1985 con la unidad CEREC 1 (Sirona Dental Systems GmbH, Bensheim, Alemania) <sup>(20)</sup>. Desde entonces los avances en la tecnología y sus aplicaciones en la odontología han permitido el crecimiento y estandarización de la odontología digital, convirtiendo las restauraciones indirectas CAD/CAM en una técnica menos costosa, más fácil, rápida y con mayor precisión <sup>(15)</sup>.

Las redes de polímeros generalmente tienden a absorber agua, lo que puede conducir no sólo al debilitamiento mecánico, sino también a mayores tasas de decoloración con un resultado estéticamente comprometido a través de la acumulación de distintos colorantes alimentarios en la extensión más profunda. Los polímeros CAD/CAM representan diferentes composiciones y porcentajes variables de componentes de matriz o relleno dependiendo del tipo de material. El mercado dental ofrece por un lado, materiales CAD/CAM basados en polimetilmetacrilato (PMMA), ya sea PMMA puro o microrellenado y por otro lado, polímeros CAD/CAM, como compuestos nanohíbridos con grandes variaciones en sus composiciones de polímeros, incluyendo también polímeros de alto rendimiento, como redes cerámicas nanocerámicas e infiltradas con polímeros <sup>(19)</sup>.

El PMMA se ha utilizado clínicamente durante más de 70 años como biomaterial en los campos dental y médico para dispositivos removibles o fijos (por ejemplo, la resina de base de una prótesis completa, materiales restauradores provisionales, cemento óseo y prótesis faciales) debido a sus propiedades mecánicas, biológicas, fácil fabricación y costo económico. Sin embargo, su carencia de propiedad antimicrobiana sigue siendo un inconveniente importante, ya que puede causar infección cuando está en contacto con los tejidos o cuando se implanta. Uno de los enfoques más novedosos aparecidos recientemente para abordar este problema es la incorporación de nanoaditivos en forma de nanoesferas, nanoláminas, nanofibras o nanotubos <sup>(21)</sup>.

La adición de diferentes nano partículas (de sílice mesoporosa (MSN), de vidrio bioactivo, de oro, de titanio y otras nano partículas metálicas) a los materiales dentales ha sido estudiada con el fin de ampliar sus ventajas, incluyendo la alta estabilidad, la actividad terapéutica, las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad <sup>(21)</sup>.

A pesar de su presencia en el grafito a modo de estructura, no se creía posible la existencia del grafeno como entidad aislada, ya que se suponía que los cristales estrictamente bidimensionales eran termodinámicamente inestables <sup>(22,23)</sup>. No obstante, en el año 2004 los científicos ingleses Andre Geim y Konstantin Novoselov fueron capaces de aislar por primera vez láminas individuales de grafeno a partir de la exfoliación mecánica con cinta adhesiva del grafito, siéndoles otorgado el Premio Nobel de Física en el año 2010 <sup>(22,24,25)</sup>.

El grafeno, un material muy abundante en la naturaleza, es otra de las formas en las que se puede encontrar el carbono (C) <sup>(25-27)</sup>. Conocido como el material bidimensional del futuro, ha suscitado gran interés en diversos campos de la investigación debido a sus excelentes propiedades (como alta resistencia mecánica, fácil funcionalización, biocompatibilidad, transparencia, y la alta conductividad eléctrica y térmica con su elevada capacidad de enfriamiento) las cuales dan paso a la creación de materiales avanzados con características únicas (impermeabilidad, capacidad de refuerzo, actividad antimicrobiana, capacidad de proliferación y diferenciación celular y la portabilidad de fármacos) <sup>(28-31)</sup>.

El grafeno es una lámina monoatómica plana de 0,43 nanómetros de grosor que puede ser considerado como el constituyente básico de los materiales de carbono gráficos, es decir, basados en la hibridación  $sp^2$ , que consiste en la combinación de un orbital "s" con dos orbitales "p" formando así tres orbitales híbridos " $sp^2$ " <sup>(22,23,32-34)</sup>. Cuando se produce esta hibridación, cada átomo de carbono se une a otros tres mediante 3 enlaces  $\sigma$  y 1 enlace  $\pi$  los cuales son sumamente importantes en la estabilidad estructural de este material. El enlace  $\pi$  evita que el átomo de C tenga una rotación libre en el espacio y se mantenga sin alteración en el mismo plano; y los enlaces  $\sigma$  componen la inalterabilidad y la intangibilidad de la tetra valencia del átomo de carbono <sup>(22,33-35)</sup>.

Además, la presencia de estos enlaces crea una red hexagonal plana de átomos de carbono con una distancia de unión entre los átomos vecinos de 1,34 Å, confiriéndole así mayor densidad electrónica que se traduce en una mayor conductividad eléctrica <sup>(25,36,37)</sup>. Asimismo, esta disposición hexagonal es la que dota al grafeno de una gran capacidad de resistencia (200 veces más duro que el acero estructural al mismo espesor) y la adaptabilidad al medio en el que se encuentre sin fracturarse ni fisurarse cuando se ve sometido a cambios de temperatura, siendo tan ligero pero más flexible que la fibra de carbono <sup>(29,32,35)</sup>.

La síntesis del grafeno puede realizarse mediante 3 técnicas: la exfoliación mecánica, síntesis por deposición química de vapor y síntesis por vía química. Ésta última es la más utilizada, también llamada método de Hummer, en el que el grafito, como precursor, se somete a reacciones de oxidación y se obtiene óxido de grafeno, el que posteriormente es expuesto a reacciones reductoras y se obtienen como resultantes las láminas de grafeno <sup>(22,26,34)</sup>.

La ciencia de los biomateriales y la investigación en ingeniería han hecho importantes progresos en los últimos años, debido a sus contribuciones en los ámbitos relacionados con la salud. Varios dominios, como la medicina restauradora y la odontología protésica, se benefician de la investigación en expansión debido a la necesidad constante de materiales no tóxicos biocompatibles con buenas propiedades mecánicas y alta resistencia al desgaste <sup>(31)</sup>.

Las resinas autopolimerizables con base PMMA son los materiales más utilizados en el laboratorio dental. Se utilizan como materiales termoestables, ya que tras su curado, no se pueden transformar ni moldear. Sin embargo, presentan una baja resistencia al impacto, la cual supone un problema clínico frecuente. Recientemente, se ha demostrado que los nanomateriales basados en carbono (NBC - acrónimo de CBN en inglés) son una solución interesante en el refuerzo de compuestos de polímeros con diferentes propósitos y aplicaciones <sup>(29)</sup>. Se pueden lograr mejoras significativas en la fatiga y la tenacidad a la fractura de los nanocompuestos basados en polímeros (por ejemplo, epoxi, acrílico, poliuretano, etc.) mediante la incorporación de nano partículas a base de carbono <sup>(38)</sup>.

La adición de partículas de grafeno determina fuertes interacciones químicas en las matrices de las resinas. Su dispersión homogénea genera una distribución uniforme de la tensión, lo que conduce a un importante aumento de la resistencia mecánica. Las propiedades mecánicas de los polímeros combinados con el grafeno están determinadas por su interacción con la matriz polimérica <sup>(29,31)</sup>.

Se ha postulado que una buena dispersión de estas nano partículas de grafeno dentro de la matriz polimérica produce una desviación y detención de las grietas durante su propagación, aumentando la resistencia a la fractura del composite hasta un 20% <sup>(32,38)</sup>. Por otro lado, la poca dispersión e interacción entre la matriz y el grafeno, se considera una de las limitaciones más importantes que debilitan sus potenciales características <sup>(39)</sup>. Se han analizado diversos métodos físicos y químicos para mejorar la dispersión durante la preparación de estos compuestos. La funcionalización de los nanomateriales basados en carbono (NBC) ha sido una de las opciones más exploradas; la introducción de moléculas químicas funcionales en la superficie del grafeno puede ayudar a unir la nano partícula y el polímero <sup>(32)</sup>.

En el caso de la incorporación del grafeno en el PMMA, se ha probado que la silanización de la partícula de grafeno es una técnica exitosa para aumentar su dispersión y estabilidad en el PMMA a largo plazo. La presencia de moléculas de silano en la superficie del grafeno retiene el material dentro de la suspensión y reduce la probabilidad de una formación agregada. Además se forman enlaces covalentes entre la matriz y el grafeno durante la polimerización, creando así una mayor adhesión entre el grafeno y el PMMA <sup>(29)</sup>.

Recientemente se ha estudiado que la agregación de grafeno al PMMA aumenta la hidrofiliidad de la superficie, causando mejoras en la capacidad antiadherente contra las bacterias <sup>(21)</sup>. La introducción de superficies hidrofílicas permite generar una capa de hidratación en la superficie que crea un revestimiento de agua fuertemente unido el cual es una barrera física o energética para evitar la adhesión microbiana <sup>(21)</sup>.

Diversos estudios a lo largo del tiempo han demostrado que el PMMA CAD/CAM sufre menos cambios de coloración cuando es expuesto a diferentes soluciones cromógenas (como el vino tinto, el café, el té negro y bebida de cola) durante un periodo de tiempo que el PMMA termo y autopolimizable <sup>(40)</sup>. Por otro lado se desconoce el efecto que las nano partículas de grafeno causan en el PMMA CAD/CAM por lo que a estabilidad de color respecta.

Por otro lado, no se han realizado estudios acerca de la estabilidad de este material frente a la absorción de sustancias cromógenas (como el vino tinto, el café, el té negro y bebida de cola) lo que a color se refiere.

El objetivo de este estudio es evaluar los efectos en el color del PMMA con nano partículas de grafeno producido por bebidas cromógenas (vino tinto, café, té negro y una bebida de cola) posteriormente a su tratamiento de pulido correspondiente mediante el uso de un espectrofotómetro.

## II. OBJETIVOS

---

### II.1. Objetivo principal

El objetivo de este estudio es evaluar los efectos en el color del PMMA con nano partículas de grafeno producido por bebidas cromógenas (vino tinto, café, té negro y una bebida de cola) posteriormente a su tratamiento de pulido correspondiente mediante el uso de un espectrofotómetro.

### II.2. Objetivos específicos

1. Evaluar los efectos que produce el vino tinto en el color del PMMA con nano partículas de grafeno posteriormente a su tratamiento de pulido mediante el uso del espectrofotómetro.
2. Evaluar los efectos que produce el café en el color del PMMA con nano partículas de grafeno posteriormente a su tratamiento de pulido mediante el uso del espectrofotómetro.
3. Evaluar los efectos que produce el té negro en el color del PMMA con nano partículas de grafeno posteriormente a su tratamiento de pulido mediante el uso del espectrofotómetro.
4. Evaluar los efectos que produce la bebida de cola en el color del PMMA con nano partículas de grafeno posteriormente a su tratamiento de pulido mediante el uso del espectrofotómetro.
5. Comparar los cambios de coloración del PMMA con nano partículas de grafeno y los del PMMA producidos por las sustancias cromógenas.

## III. HIPÓTESIS

---



### III.1. Hipótesis nula

$H_0$ : Las bebidas cromógenas causan cambios de color en el PMMA con nano partículas de grafeno

#### III.1.2. Hipótesis nulas específicas

$H_0 A$ : El vino tinto causa cambios de color en PMMA con nano partículas de grafeno.

$H_0 B$ : El café causa cambios de color en PMMA con nano partículas de grafeno.

$H_0 C$ : El té negro causa cambios de color en PMMA con nano partículas de grafeno.

$H_0 D$ : La bebida de cola causa cambios de color en PMMA con nano partículas de grafeno.

### III.2. Hipótesis alternativa

$H_1$ : Las bebidas cromógenas no causan cambios de color en el PMMA con nano partículas de grafeno.

#### III.2.1. Hipótesis alternativas específicas

$H_1 A$ : El vino tinto no causa cambios de color en PMMA con nano partículas de grafeno.

$H_1 B$ : El café no causa cambios de color en PMMA con nano partículas de grafeno.

$H_1 C$ : El té negro no causa cambios de color en PMMA con nano partículas de grafeno.

$H_1 D$ : La bebida de cola no causa cambios de color en PMMA con nano partículas de grafeno.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Para la resolución de la hipótesis, se diseñó un estudio *in vitro* basado en la inmersión de 30 coronas de PMMA con nano partículas de grafeno y 30 coronas de PMMA como grupo control (n=60) en vino tinto, café, té negro y bebida de cola y agua destilada.

La fabricación de muestras y las mediciones en el estudio fueron realizadas por un solo examinador. Para la elaboración de las muestras, en primer lugar se escaneó con el escáner MEDIT T-500 (3DBiotech – España) un modelo estándar de yeso de la casa VITA (VITA Zahnfabrik, Alemania) con el incisivo central superior izquierdo tallado (*Figura 1*) mediante el uso de fresas Komet 6847KR 016, 8847KR 016 y 8379 023 (Komet Dental - Brasseler, Alemania). Posteriormente, mediante el uso del software Exocad 6136 64, se diseñó 1 corona modelo de grosor de 2mm (*Figura 2 y 3*), la cual se replicaría posteriormente en 60 ejemplares color A2 a partir del fresado de discos.

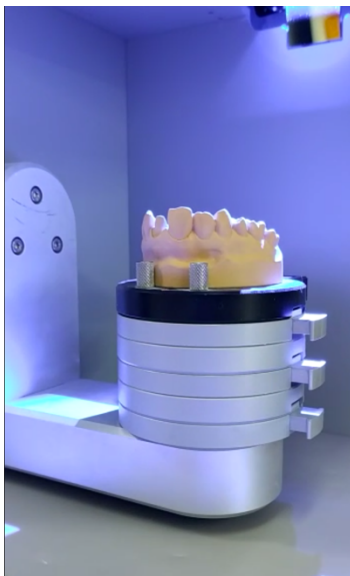


Figura 1. Escaneo del modelo de yeso con escáner MEDIT T-500 (3DBiotech – España)

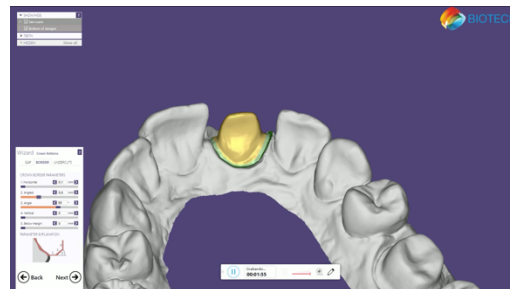


Figura 2. Diseño con Exocad 6136 64 de la corona maestra. Vista palatina de la definición del margen

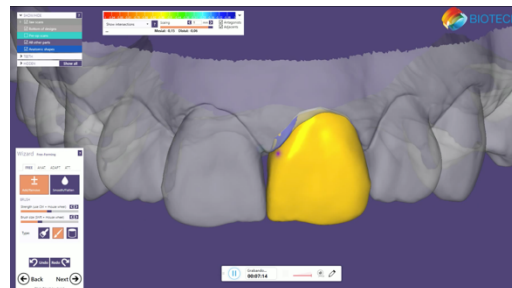


Figura 3. Diseño con Exocad 6136 64 de la corona maestra. Vista vestibular

A partir de 1 disco de 98,2x16mm de PMMA con nano partículas de grafeno (Graphenano nanotechnologies, España) y otro disco de 98,2x16mm de PMMA (Schmidt Dental Solutions, España) (*Figura 4*) se fabricaron un total de 60 coronas CAD/CAM (30 en cada disco) (*Figura 5, 6, 7 y 8*) con las mismas dimensiones mediante fresas Horico (Horico – Berlín, Alemania) 0,60mm, 1mm, 2mm y 2,5mm de fresadora VHF Oraganical Desktop 7 (VHF - Ammerbuch, Alemania) de 5 ejes con dispositivo de sujeción neumática a 60.000 rpm con software RK Quattro Mill v.7.14, en constante refrigeración

por agua. Posteriormente se llevó a cabo el pulido manual de las restauraciones (*Figura 9 y 10*) con pasta Micerium (Micerium S.p.A., Italia) mediante discos con pelo de cabra y felpa.



*Figura 4. Discos de PMMA+Grafeno y PMMA A2*



*Figura 5. Discos de PMMA+Grafeno A2 fresado: Vista de la parte interior de las coronas*



*Figura 6. Discos de PMMA+Grafeno A2 fresado: Vista incisal*



*Figura 7. Discos de PMMA A2 fresado: Vista de la parte interior de las coronas*



*Figura 8. Discos de PMMA A2 fresado: Vista incisal*

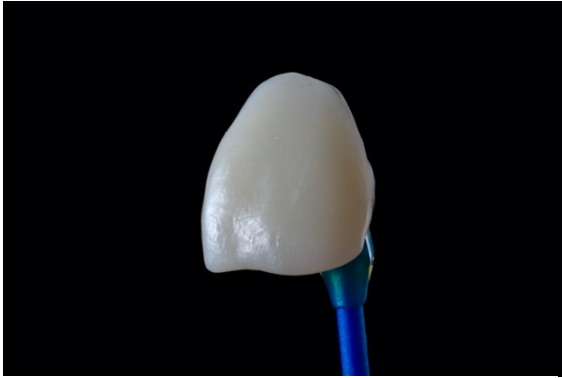


Figura 9. Corona fresada y pulida de PMMA+Grafeno

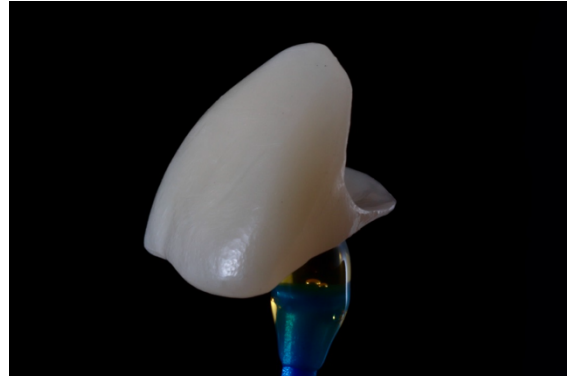


Figura 10. Corona fresada y pulida de PMMA

Todos los especímenes se almacenaron individualmente en cámara de clima constante HPP110 - 108 litros (Mettmert, Alemania) a una temperatura de 37°C durante 24h para permitir la rehidratación como está descrito en diversos artículos<sup>(15,41,42)</sup>. Posteriormente, se dividieron en 2 grupos: PMMA y PMMA+grafeno, los cuales se subdividieron aleatoriamente en 5 grupos ( $n=6$ ) según la solución de inmersión y numerados del 1 al 6 (Figura 11 y 12). Las soluciones de inmersión fueron vino tinto, café, té negro, bebida de cola y agua destilada como grupo control (Tabla 1). El café fue preparado mediante 200 mililitros de agua caliente y 2 gramos de café soluble. La solución de té negro fue preparada mediante la inmersión de un sobre de té en 200 mililitros de agua caliente durante 5 minutos.

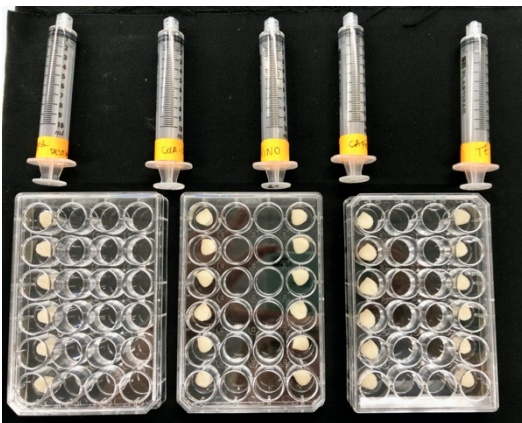


Figura 11. Clasificación de las muestras de PMMA+Grafeno

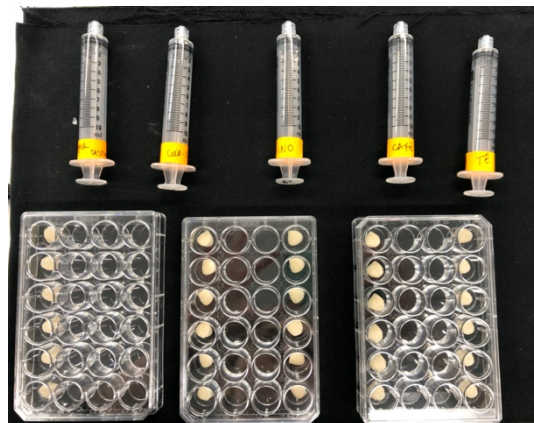


Figura 12. Clasificación de las muestras de PMMA

BEBIDA	ABREVIATURA	FABRICANTE
VINO TINTO	VT	Caprici (Priorat, Catalunya)
CAFÉ	CF	Nescafé (Nestlé, Suiza)
TÉ NEGRO	TN	Lipton (Unilever/PepsiCo, Gran Bretaña/USA)
BEBIDA DE COLA	BC	The Coca-Cola Company (Atlanta, USA)
AGUA DESTILADA	AD	Bosque Verde (SPB, Cheste, España)

Tabla 1. Soluciones de inmersión empleadas en la investigación

Las mediciones de color se tomaron con un fondo negro mediante el empleo del espectrofotómetro de reflectancia Spectroshade™ Micro (MHT, Suiza) (Figura 13). Antes de cada medición, el espectrofotómetro fue calibrado según los parámetros recomendados por el fabricante, empleando calibres estándar. El color inicial de las muestras se registró previa a su inmersión en las bebidas cromógenas (T0). Las siguientes mediciones de las muestras fueron llevadas a cabo posteriormente a ser aclaradas durante 5 segundos en 3 recipientes de agua destilada por solución de inmersión y secadas con una gasa. Los intervalos de tiempo de evaluación fueron de 24hs (T1) y 1 semana (T2). Las suspensiones se mantuvieron en 37°C y se renovaron cada 72 horas para evitar la contaminación bacteriana y la variación del pH<sup>(43)</sup>.



Figura 13. Toma de color con el espectrofotómetro Spectroshade™ Micro de muestra de PMMA+Grafeno

Para determinar los cambios de color de los diferentes grupos, se recolectaron las coordenadas del sistema CIELab con el programa informático SpectroShade Data Base. Los valores de  $\Delta E_{00}$  de cada grupo de inmersión en T0, T1, T2, para fueron calculados mediante la presente ecuación de CIEDE2000<sup>(44)</sup>:

$$\Delta E_{00} = \sqrt{\left(\frac{\Delta L}{K_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C}{K_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H}{K_H S_H}\right)^2 + R_T \left(\frac{\Delta C}{K_C S_C}\right) \left(\frac{\Delta H}{K_H S_H}\right)}$$

Para la evaluación de los cambios de color, se tuvo en cuenta el umbral de valores de la aceptabilidad clínica para composites y resinas establecida en los que  $\Delta E_{00} \leq 2,30$ <sup>(45)</sup>. Los datos se analizaron utilizando los programas estadísticos R y StatGraphics Centurion XV. Con R se determinó si la muestra de estudio seguía o no la normalidad, como los datos salieron no paramétricos, se realizó una transformación logarítmica de la variable CIEDE2000 para obtener normalidad de los datos. Posteriormente, con el programa StatGraphics se realizó un análisis estadístico ANOVA Multifactorial de dos factores y un análisis *post-hoc* test de Fisher para determinar la homogeneidad dentro de los grupos, siempre trabajando con los valores obtenidos con la transformación logarítmica, con un intervalo de confianza del 95% y se consideró que los resultados eran estadísticamente significativos con un  $p < 0,05$ . Este sistema fue elegido para medir el color de las muestras, ya que es el indicado para la determinación de precisas diferencias de color y ha sido utilizado en estudios anteriores<sup>(15,19,43,44,46,47)</sup>.

## V. RESULTADOS

---



La media y las desviaciones estándar de los valores de lo cambio de color  $\Delta E_{00}$  de las muestras de PMMA+grafeno y PMMA después de 24h y 7 días de inmersión en cada solución se muestran en la *Tabla 2*. Se evaluaron las variables “grupo”, “sustancia” y “tiempo”.

Los cambios de coloración de las muestras inmersas en las diferentes soluciones durante 24h fueron clínicamente aceptables en todos los casos ( $\Delta E_{00} \leq 2,30$ ). Sin embargo, pasados los 7 días, las muestras de PMMA inmersas en vino tinto y las de PMMA+grafeno sumergidas en vino tinto y café mostraron tinciones clínicamente inaceptables. El resto de especímenes mostraron cambios tolerables ( $\Delta E_{00} \leq 2,30$ ).

De acuerdo con el análisis ANOVA, las 60 muestras de PMMA y PMMA+grafeno observan diferencias estadísticamente significativas ( $p_v < 0,05$ ) en su comportamiento individual frente la estabilidad del color (*Gráfico 1*); sin embargo en su comparación, los resultados no se mostraron estadísticamente significativos.

$\Delta E_{00}$			
Sust. pigmentante	Material	T1	T2
Agua destilada	PMMA	1,16±0,55	0,78±0,38
	Grafeno	1,57±0,50	2,01±0,46
Vino Tinto	PMMA	1,67±0,50	4,15±1,20
	Grafeno	2,06±0,84	11,01±2,89
Café	PMMA	0,88±0,76	1,59±0,65
	Grafeno	1,19±0,83	2,67±1,35
Bebida de cola	PMMA	0,75±0,48	1,02±0,46
	Grafeno	1,17±0,74	1,47±0,91
Té	PMMA	1,12±0,75	0,87±0,42
	Grafeno	1,38±0,32	2,15±0,82

*Tabla 2. Media de los valores de los cambios de color  $\Delta E_{00}$  y sus desviaciones de las muestras de PMMA+grafeno y PMMA después de 24h y 7 días de inmersión en cada solución cromógena*

El efecto de tinción aumenta progresivamente en los dos grupos de estudio cuando son inmersos durante 24 horas y 7 días en vino tinto y café de manera estadísticamente significativa ( $p_v < 0,01$ ). El grupo con mayor cambio de color fue el PMMA+grafeno sumergido en vino tinto a los 7 días de inmersión (*Gráfico 2*).

Respecto la sumersión en agua destilada, se observan diferencias significativas en cuanto al cambio de color entre los grupos de estudio ( $p < 0,05$ ), pero no en relación al tiempo de exposición. Por otro lado, las muestras sumergidas en té negro y bebida de cola no denotan cambios significativos entre grupos y tiempo de estudio ( $p > 0,05$ ) (Gráfico 3). En relación con el potencial de tinción, se observa que el vino tinto tiene una mayor capacidad que el resto en provocar cambios en el color tanto del PMMA como PMMA+grafeno; seguido por el café, té negro, bebida de cola y agua destilada.

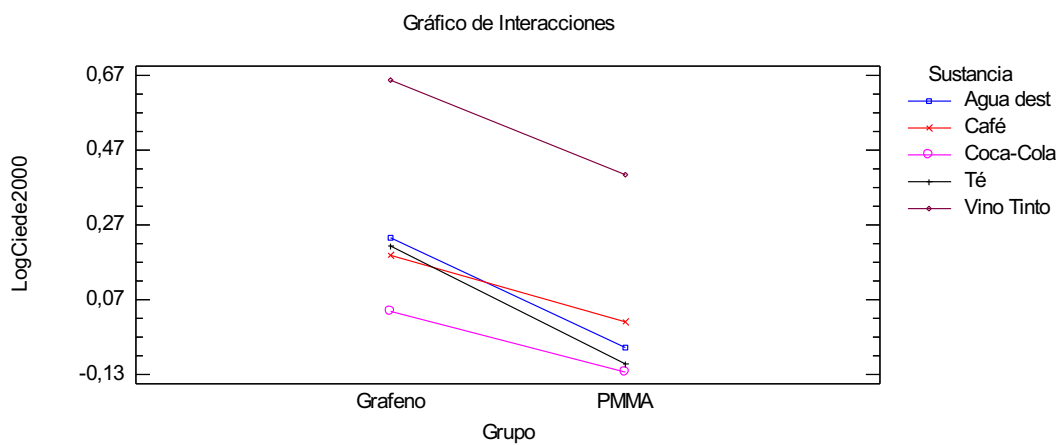


Gráfico 1. Comportamiento del PMMA+Grafeno y PMMA a las 24h y a los 7 días en los distintos medios de estudio

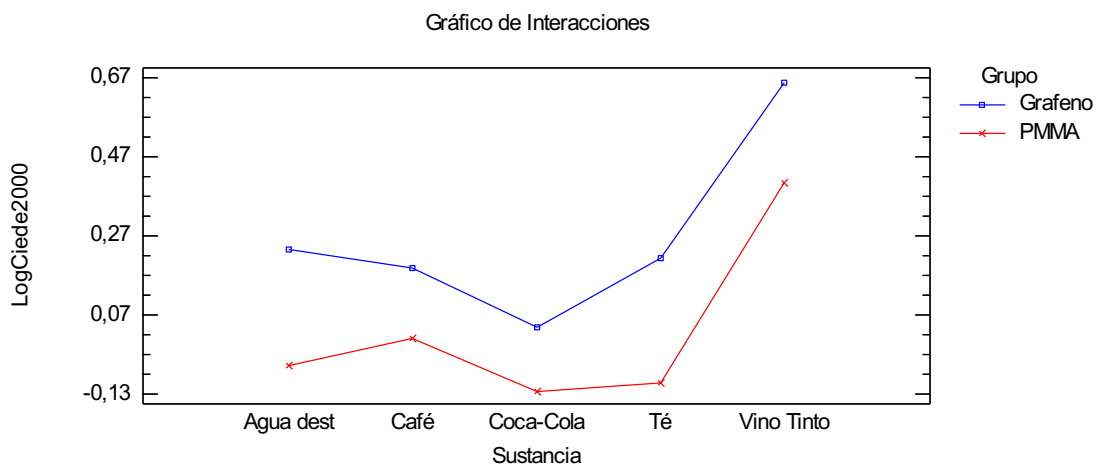


Gráfico 2. Comportamiento del PMMA+Grafeno y PMMA en los distintos medios de inmersión

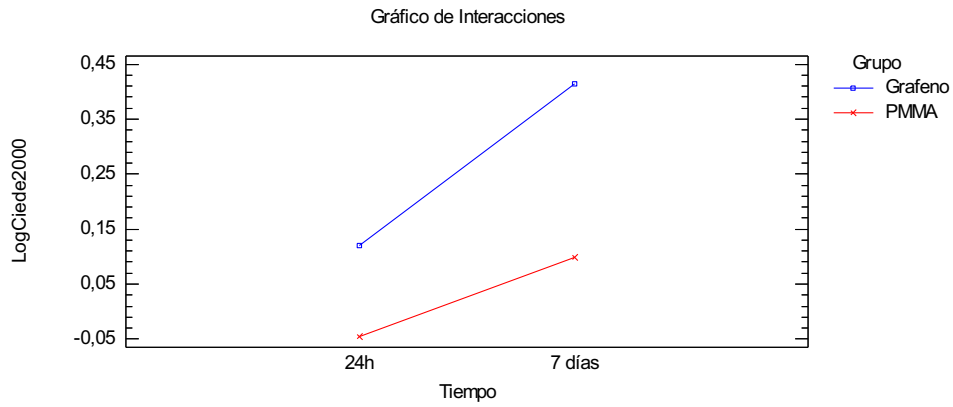


Gráfico 3. Cambios del PMMA+Grafeno y PMMA a las 24h y a los 7 días

Como resultado general, se observa que los materiales sufren cambios estadísticamente significativos de manera individual; pero en su interacción con sustancia y tiempo, sus diferencias no son estadísticamente significativas.

## VI. DISCUSIÓN

---

La creciente demanda estética por parte de los pacientes ha impulsado a los odontólogos la búsqueda de materiales restauradores ya no solo con propiedades mecánicas y funcionales adecuadas, sino también con excelentes características estéticas. Sin embargo, para que estos materiales sean clínicamente aceptables deben propiciar una perdurabilidad de todas sus propiedades en el tiempo a pesar del dinamismo que la cavidad oral presenta, en los cuales se encuentra el consumo de bebidas cromáticas. Luego la capacidad de tinción puede ser considerada como criterio en la selección de un material en un área con compromiso estético <sup>(3,4,14)</sup>.

En este estudio se evaluaron los cambios de color del PMMA CAD/CAM con nano partículas de grafeno después de su inmersión en vino tinto, café, té negro, bebida de cola y agua destilada durante 24 horas y 1 semana.

Para la elaboración de las muestras se realizó el diseño y fresado de coronas dentales de 2 mm de grosor (de un incisivo central superior izquierdo) en lugar de pequeños discos como en otros estudios <sup>(11,12,41,44,48-51)</sup>, con el fin de obtener una mayor similitud a la situación clínica de la restauración. Se fresaron 60 coronas como número de muestra como media de los diferentes estudios encontrados que valoraban la tinción de materiales como el PMMA <sup>(13,14,17,52-56)</sup>.

La selección de las soluciones de inmersión fue en base a su alta presencia en la literatura científica a lo largo del tiempo por su potencial de tinción y su frecuencia en la dieta <sup>(14,15,17,44,48-50,57-59)</sup>. El grupo sumergido en agua destilada se utilizó como control.

Con el fin de obtener valores cuantitativos precisos del cambio de color, en este estudio se hizo uso del espectrofotómetro de reflectancia. Cada compuesto químico absorbe o emite energía lumínica de diferente longitud de onda, la cual puede estar en el espectro de luz visible o en otra parte del espectro electromagnético. Tanto el fotómetro (también llamado colorímetro) como el espectrofotómetro captan el espectro de luz visible, pero el espectrofotómetro puede además trabajar en regiones ultravioleta e infrarroja, con lo que sus mediciones son más precisas <sup>(60-62)</sup>.

Los valores que se obtienen mediante el uso del espectrofotómetro pueden variar según la ausencia o presencia de fondo y su respectivo color (blanco, negro o gris). En la presente investigación se realizó uso de fondo negro ya que en el 2012 Ardu et. al <sup>(63)</sup> estudiaron la influencia de éste, observando que los valores  $L^*a^*b^*$  en los tres fondos eran estadísticamente diferentes de las medidas realizadas sin ningún fondo. Así pues, concluyeron que para realizar un estudio *in vitro* era preferible el uso de fondo negro debido a su capacidad y tendencia a imitar mejor la situación *in vivo*.

Posteriormente al registro del color inicial se procedió a la inmersión de las 60 muestras en las bebidas cromógenas. Las siguientes evaluaciones de color se realizaron a las 24 horas y pasados 7 días. Durante dicho período de tiempo, las muestras permanecieron a 37°C dada su semejanza a la temperatura del medio oral; así como lo justifican y efectúan en sus respectivos estudios otros autores <sup>(11,13,15,50,52,61,64,65)</sup>.

Tal y como han hecho diversas publicaciones en la literatura <sup>(11,15,42,44,51,59,66,67)</sup>, se tomó como referencia el artículo de Ertas et. al en el que establece que 24 horas de inmersión simula aproximadamente 1 mes de consumo real <sup>(48)</sup>. Por consiguiente, los resultados obtenidos *in vitro* en el presente estudio se pueden equiparar a una exposición en el medio oral de 1 y 7 meses.

A partir de las imágenes recolectadas con el espectrofotómetro, se analizaron los datos  $L$ ,  $a^*$  y  $b^*$  a partir del programa informático SpectroShade Data Base. Éstos fueron recopilados en un documento Excel en el cual se incorporó la fórmula del CIEDE 2000, ya que se trata de la ecuación más reciente y de mayor rendimiento propuesta por el CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) que corrige defectos observados de la anterior fórmula de CIELab <sup>(15,44,46,68-70)</sup>.

En 2008 el grafeno se introdujo por primera vez en las ciencias biomédicas por su capacidad de diferenciación de células madre en el linaje de tejido deseado, por inhibir el crecimiento bacteriano y sin producir una respuesta inflamatoria del huésped <sup>(71)</sup>. La biocompatibilidad y su estudio en la biomedicina del grafeno, ha suscitado interés por la aplicación de éste en diversas ramas de la odontología <sup>(22,72)</sup>.

Las investigaciones sobre el grafeno en materiales dentales han adquirido dos caminos: preparar nuevos materiales dentales y modificar los materiales dentales comunes mediante la transferencia de nano partículas de grafeno a diferentes sustratos<sup>(72)</sup>.

Al considerar el papel del grafeno en la odontología restauradora, es importante tener en cuenta las propiedades de los materiales más utilizados: resinas, cementos y adhesivos. Estos materiales poliméricos son propensos a la formación de biopelículas y crecimiento bacterianos que conlleva al fracaso de las restauraciones dentales. Como estrategia para combatir la susceptibilidad al crecimiento bacteriano en las restauraciones, se han incorporado a estos materiales las nano partículas de grafeno ya que posee gran eficacia frente al crecimiento de *S. mutans*<sup>(22,28,30)</sup>.

Existen 3 mecanismos por los que el grafeno posee propiedades antibacterianas: 1) Producción de daño físico mediante la perforación de la membrana celular microbiana inducida por la hoja de grafeno; 2) Efecto químico basado en estrés oxidativo mediado por la acumulación de oxígeno intracelular que lleva a la inactivación proteica, desintegración de la membrana y eventual muerte celular; 3) Transferencia de electrones desde la membrana bacteriana, produciéndole estrés oxidativo con la consecuente interrupción del electrón de transporte en la cadena respiratoria, que conduce a la destrucción de la integridad microbiana y a la muerte celular<sup>(34,72,73)</sup>.

En la bibliografía se contempla la incorporación de nano partículas de grafeno en los materiales poliméricos. Respecto a los adhesivos dentales, se conoce que supone una inhibición de la cohesión de *S. mutans* sin existir interferencia en las propiedades de adhesión en sí mismas<sup>(21,32,71,72)</sup>. Por otro lado, su inclusión en los cementos dentales propicia no solo la inhibición bacteriana sino que también aporta un aumento de micro dureza y disminución del coeficiente de fricción<sup>(22,38,71)</sup>.

Por añadidura, integrar a las resinas compuestas nano partículas de grafeno, comporta un aumento del módulo de elasticidad, una mejora del grado de conversión y una mayor cristalinidad polimérica; obteniendo de tal modo mejores propiedades<sup>(72,73)</sup>.

Así como se ha expuesto en este trabajo anteriormente, las resinas acrílicas tienen un alto protagonismo en la prostodoncia dadas sus múltiples aplicaciones clínicas.

El PMMA ha sido utilizado desde el 1937 en el mundo de la odontología dado su bajo módulo de elasticidad, menos desgaste del antagonista, buenos resultados estéticos, reparación sencilla, coste económico bajo y un proceso de fabricación relativamente rápido. Con el tiempo se han desarrollado diferentes de estrategias para acrecentar sus cualidades<sup>(74,75)</sup>.

Del mismo modo que la prefabricación CAD/CAM del PMMA ha estandarizado la temperatura y presión en la polimerización, disminuido el factor de contracción y mejorado sus propiedades mecánicas y estéticas<sup>(76)</sup>; con la incorporación de nano partículas de grafeno se pretende mejorar las propiedades de este material en todas sus facetas.

Si bien se conoce que la agregación de nano partículas de grafeno propicia al PMMA de mayor resistencia, flexibilidad y capacidad antibacteriana, no se reportan en la literatura investigaciones sobre su respuesta al efecto de bebidas cromógenas. En este estudio se ha llevado a cabo la medición del color de 30 coronas CAD/CAM de PMMA+grafeno y 30 de PMMA posterior a su inmersión en vino tinto, café, té negro y bebida de cola mediante el uso del espectrofotómetro.

De acuerdo con los resultados presentes en este estudio, se acepta la hipótesis nula. Después de 24h y 7 días de inmersión, equivalentes a 1 mes y 7 meses en el medio oral respectivamente<sup>(48)</sup>, se mostraron cambios significativos en los cambios de coloración del PMMA y PMMA+grafeno. Por el contrario cuando se evaluaron entre sí, no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Las variaciones de  $\Delta E_{00}$  de ambos materiales fueron  $\leq 2,30$ , traduciéndose en alteraciones invisibles para el ojo humano y por tanto clínicamente aceptables.

En conformidad con otros estudios<sup>(11,15,44,48,49,51,59,77)</sup>, los análisis realizados en el presente trabajo sugieren que el vino tinto produce mayor cambio de coloración, en comparación con las otras soluciones. Por otro lado, se observa que el PMMA+grafeno muestra mayor tinción, a pesar de no ser un valor significativo frente los cambios del PMMA. Los cambios producidos por el vino tinto son atribuibles a la presencia de alcohol, ácidos y taninos en su composición. El alcohol y los ácidos debilitan la matriz



polimérica y permiten la absorción de los taninos (polímeros complejos presentes en uvas y madera) y colorantes al PMMA dando como resultado la tinción. Cabe destacar que no todas las uvas contienen la misma cantidad de taninos y que el vino tinto seleccionado para la realización de este estudio, por su alto consumo en nuestra región, presenta una combinación de 5 tipos de uvas de las cuales 4 tienen alto contenido en taninos (Merlot, Cabernet Sauvignon, Syrah y Cariñena). Del planteamiento anterior se deduce que la exposición del PMMA+grafeno en otro tipo de vino tinto con una combinación de uva distinta, podría mostrar nuevos cambios de color llegando a ser incluso inferiores a los presentados en este trabajo.

Seguido del vino tinto, las coronas con mayor cambio de coloración fueron las de PMMA+grafeno sumergidas en café después de 1 semana. En la literatura se relaciona este suceso con la presencia en el café de moléculas cromógenas amarillas que por su baja polaridad tienen una gran afinidad a la matriz polimérica del PMMA. En contraposición, las muestras sumergidas en té negro y bebida de cola no mostraron cambios clínicos indeseables a pesar de la presencia en sus composiciones de ácido tánico, pigmentos y ácido fosfórico en el respectivo orden. Sin embargo, se sugiere la realización de estudios con mayores tiempos de exposición al café y a la bebida de cola ya que podrían mostrar resultados disímiles en los cambios del color reportados en este trabajo. En la literatura científica se reportan estudios en los que se relaciona un mayor tiempo de exposición a bebida de cola con un aclaramiento de las muestras, ya que por más que las bebidas de cola presentan alto contenido ácido, sus colorantes tienden a tener una polaridad alta y por tanto menor afinidad con la matriz del PMMA <sup>(59,78)</sup>. Por otro lado, algunos artículos insinúan que la agregación de azúcar y leche al café podrían aumentar las variaciones del color de un modo significativo <sup>(54,79)</sup>.

Un hallazgo interesante referente a los valores de  $\Delta E_{00}$  del PMMA+grafeno es que resultaron en todos los casos superiores a los del PMMA, inclusive en aquellas muestras sumergidas en agua destilada. Este suceso podría fundamentarse en que las láminas de grafeno a pesar de ser transparentes e insensibles para la vista, cuando se agrupan por capas se dotan de un color grisáceo que con el acúmulo de éstas puede acaecer en color negro.

Por ello, a pesar de tener 2 coronas de un mismo color (A2) y diseño sometidas a un mismo protocolo de fabricación y de pulido, haciendo uso del mismo espectrofotómetro y por 1 solo examinador, los valores de los dos materiales son diferentes siendo el PMMA+grafeno más oscuro en todas las ocasiones.

Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se llevó a cabo un protocolo de pulido habitual con pasta Micerium (Micerium S.p.A., Italia) mediante discos con pelo de cabra y felpa. No obstante, otras modalidades de acabado y pulido de las restauraciones de PMMA+grafeno como el maquillado de la superficie, la técnica de *cutt back* y la técnica de inyección deberían ser estudiadas.

Una de las limitaciones del estudio resultó el tiempo de inmersión de las muestras, ya que iba a ser de 4 semanas, pero lamentablemente por la pandemia de enfermedad por COVID-19 se vio forzada a detenerse. Mayores tiempos de exposición a soluciones cromógenas deberían considerarse para futuros estudios. Por otro lado, es importante enfatizar la imposibilidad de establecer una correlación exacta entre estudios *in vitro* e *in vivo*, ya que por más que se controle temperatura y presión, el medio oral no puede reproducirse con exactitud en el laboratorio <sup>(12,41,44,65)</sup>.

A pesar de conocer la inalterabilidad del grafeno gracias a la presencia de sus enlaces  $\sigma$ , debería contemplarse la posibilidad de estudio de la resistencia de este material una vez ha sufrido un cambio de coloración, ya que se desconoce como reacciona a nivel de estructura química la incorporación de los pigmentos.

## VII. CONCLUSIONES

---

El requerimiento estético de las restauraciones dentales por parte de los pacientes y la tendencia de la odontología de desarrollar el material con propiedades y funciones ideales, ha impulsado la realización de este trabajo. En este estudio se evaluaron los efectos que la inclusión de nano partículas de grafeno en el PMMA sobre la estabilidad del color posterior a su inmersión en bebidas cromógenas típicas.

Las variaciones de color del común de las muestras resultaron imperceptibles para el ojo humano, es decir, variaciones clínicamente aceptables ( $\Delta E_{00} \leq 2,30$ ). Los especímenes de PMMA con nano partículas de grafeno sometidos a vino tinto mostraron mayores alteraciones en el color, seguidas por las de café, té negro, bebida de cola y agua destilada. Dados los resultados, se aceptó la hipótesis nula. Pese a que se observaron alteraciones significativas en la tinción de PMMA y PMMA con nano partículas grafeno, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las modificaciones de ambos.

A pesar de las limitaciones de este estudio, se concluye que el PMMA con nano partículas de grafeno presenta una correcta estabilidad del color y parece tener unas propiedades estéticas adecuadas para ser utilizado en la práctica clínica odontológica. Estos primeros resultados positivos, incentivan la continuación de futuras investigaciones sobre el efecto de la incorporación de nano partículas de grafeno en el PMMA.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Holden ACL. Cosmetic dentistry: A socioethical evaluation. *Bioethics*. 2018 Nov 1;32(9):602–10.
2. Henson ST, Lindauer SJ, Gardner WG, Shroff B, Tufekci E, Best AM. Influence of dental esthetics on social perceptions of adolescents judged by peers. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2011 Sep;140(3):389–95.
3. Papio MA, Fields HW, Beck FM, Firestone AR, Rosenstiel SF. The effect of dental and background facial attractiveness on facial attractiveness and perceived integrity and social and intellectual qualities. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2019;156(4):464-474.e1.
4. Schmideder J (Author), Allen EP (Collaborator), Attin T (Collaborator), Bill JS (Collaborator). *Atlas de la Odontología Estética*. MASSON, S. Verlag de Stuttgart GT, editor. 1999.
5. Bayne SC, Ferracane JL, Marshall GW, Marshall SJ, van Noort R. The Evolution of Dental Materials over the Past Century: Silver and Gold to Tooth Color and Beyond. *J Dent Res*. 2019;98(3):257–65.
6. Hervás-García A, Martínez-Lozano MA, Cabanes-Vila J, Barjau-Escribano A, Fos-Galve P. Composite resins. A review of the materials and clinical indications. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(2):215–20.
7. Rueggeberg FA. State-of-the-art: Dental photocuring - A review. *Dent Mater*. 2011;27(1):39–52.
8. Rosalin Hongsathavij1 , Yosvimol Kuphasuk1 KR. Effectiveness of platelet-rich fibrin in the management of pain and delayed wound healing. *Eur J Dent*. 2017;11(4):192–5.
9. Ferracane JL. Resin composite - State of the art. *Dent Mater*. 2011;27(1):29–38.
10. D'Souza D, Kumar M. Esthetics and Biocompatibility of Composite Dental Laminates. *Med J Armed Forces India*. 2010;66(3):239–43.
11. Romero H. Efecto de diferentes bebidas en la estabilidad de color de las resinas compuestas para restauraciones directas. *Rev Ateneo Argent Odontol*. 2017;56(1):31–43.

12. Ren YF, Feng L, Serban D, Malmstrom HS. Effects of common beverage colorants on color stability of dental composite resins: The utility of a thermocycling stain challenge model in vitro. *J Dent.* 2012 Jul;40(SUPPL. 1):48–56.
13. Raeisosadat F, Tabriz MA, Hashemi Zonooz S, Nakhostin A, Raoufinejad F, Javid B, et al. Staining Microhybrid Composite Resins With Tea and Coffee. *Avicenna J Dent Res.* 2015;9:7.
14. Mundim FM, Garcia L da FR, Pires-de-Souza F de CP. Effect of staining solutions and repolishing on color stability of direct composites. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(3):249–54.
15. Arocha MA, Basilio J, Llopis J, Di Bella E, Roig M, Ardu S, et al. Colour stainability of indirect CAD-CAM processed composites vs conventionally laboratory processed composites after immersion in staining solutions. *J Dent.* 2014;42(7):831–8.
16. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater.* 2006;22(3):211–22.
17. Arregui M, Giner L, Ferrari M, Vallés M, Mercadé M. Six-month color change and water sorption of 9 new-generation flowable composites in 6 staining solutions. *Braz Oral Res.* 2016;30(1):e123.
18. Tan BL, Yap AUJ, Ma HNT, Chew J, Tan WJ. Effect of beverages on color and translucency of new tooth-colored restoratives. *Oper Dent.* 2015 Mar 1;40(2):E56–65.
19. Liebermann A, Vehling D, Eichberger M, Stawarczyk B. Impact of storage media and temperature on color stability of tooth-colored CAD/CAM materials for final restorations. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2019 Oct 1;17(4).
20. Mörmann WH. The evolution of the CEREC system. *J Am Dent Assoc.* 2006;137(9 SUPPL.):7–13.
21. Lee JH, Jo JK, Kim DA, Patel KD, Kim HW, Lee HH. Nano-graphene oxide incorporated into PMMA resin to prevent microbial adhesion. *Dent Mater.* 2018 Apr 1;34(4):e63–72.

22. Tahriri M, Del Monico M, Moghanian A, Tavakkoli Yaraki M, Torres R, Yadegari A, et al. Graphene and its derivatives: Opportunities and challenges in dentistry. Vol. 102, Materials Science and Engineering C. Elsevier Ltd; 2019. p. 171–85.
23. Chung DDL. Review: Graphite. *J Mater Sci.* 2002;37(8):1475–89.
24. Alvial-Palavicino C, Konrad K. The rise of graphene expectations: Anticipatory practices in emergent nanotechnologies. *Futures.* 2019;109(November):192–202.
25. Blandez J. Grafeno Y Materiales Derivados Como Catalizadores Pseudohomogéneos En Reacciones Orgánicas. Universitat Politècnica de València; 2017.
26. Albero J, Mateo D, García H. Graphene-based materials as efficient photocatalysts for water splitting. *Molecules.* 2019;24(5):21.
27. Pierson HO. Handbook of Carbon, Graphite, Diamonds and Fullerenes [Internet]. Handbook of Carbon, Graphite, Diamonds and Fullerenes. 1993. 43–69 p.
28. Yang K, Feng L, Hong H, Cai W, Liu Z. Preparation and functionalization of graphene nanocomposites for biomedical applications. *Nat Protoc.* 2013;8(12):2392–403.
29. Paz E, Ballesteros Y, Forriol F, Dunne NJ, del Real JC. Graphene and graphene oxide functionalisation with silanes for advanced dispersion and reinforcement of PMMA-based bone cements. *Mater Sci Eng C.* 2019;104(July):109946.
30. Toth PS, Ramasse QM, Velický M, Dryfe RAW. Functionalization of graphene at the organic/water interface. *Chem Sci.* 2015;6(2):1316–23.
31. Bacali C, Badea M, Moldovan M, Sarosi C, Nastase V, Baldea I, et al. The Influence of Graphene in Improvement of Physico-Mechanical Properties in PMMA Denture Base Resins. *Materials (Basel).* 2019 Jul 23;12(14):13.
32. Lin ZW, Yang F, Lee S. Effect of graphene on the absorption of methanol and crack healing in poly(methyl methacrylate)-based composites. *Soft Matter.* 2018;14(36):7526–33.



33. Geim AK, Novoselov KS. The rise of graphene. *Nature Materials*. 2007;14.
34. Solís Fernández P. Modificación superficial de materials de carbono: grafito y grafeno. Universidad de Oviedo; 2011.
35. Chen J, Dai F, Zhang L, Xu J, Liu W, Zeng S, et al. Molecular Insights into the Dispersion Stability of Graphene Oxide in Mixed Solvents: Theoretical Simulations and Experimental Verification. *J Colloid Interface Sci*. 2020;28.
36. Novoselov KS, Geim AK, Morozov S V., Jiang D, Zhang Y, Dubonos S V., et al. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *J Clin Endocrinol Metab*. 1950;10(10):1361–2.
37. Fukuda M, Islam MS, Shudo Y, Yagyu J, Lindoy LF, Hayami S. Ion conduction switching between H + and OH - induced by pH in graphene oxide. *Chem Commun*. 2020;5.
38. Paz E, Ballesteros Y, Abenojar J, del Real JC, Dunne NJ. Graphene Oxide and Graphene Reinforced PMMA Bone Cements: Evaluation of Thermal Properties and Biocompatibility. *Materials (Basel)*. 2019 Sep 26;12(19):3146.
39. Madauß L, Schumacher J, Ghosh M, Ochedowski O, Meyer J, Lebius H, et al. Fabrication of nanoporous graphene/polymer composite membranes. *Nanoscale*. 2017;9(29):10487–93.
40. Dayan C, Guven MC, Gencel B, Bural C. A color stability comparison of conventional and CAD/CAM polymethyl methacrylate denture base materials. *Acta Stomatol Croat*. 2019;53(2):158–67.
41. Ardu S, Duc O, Di Bella E, Krejci I. Color stability of recent composite resins. *Odontology*. 2017;105(1):29–35.
42. Lee YK, Yu B, Lim HN, Lim JI. Difference in the color stability of direct and indirect resin composites. *J Appl Oral Sci*. 2011;19(2):154–60.
43. Figuerôa RMS, de Albuquerque KB, Borges CPF, Sánchez-Ayala A, Bombarda NHC, Arrais CAG, et al. The effect of stainable drinks followed by simulated brushing on the roughness and stainability of acrylic resins polymerized with different cycles. *J Prosthet Dent*. 2019;1–8.

44. Barutçugil Ç, Bilgili D, Barutçugil K, DüNDAR A, Büyükkaplan UŞ, Yılmaz B. Discoloration and translucency changes of CAD-CAM materials after exposure to beverages. *J Prosthet Dent.* 2019;1–7.
45. Paravina RD, Kimura M, Powers JM. Evaluation of polymerization-dependent changes in color and translucency of resin composites using two formulae. *Odontology.* 2005;93(1):46–51.
46. Gómez-Polo C, Muñoz MP, Lorenzo Luengo MC, Vicente P, Galindo P, Martín Casado AM. Comparison of the CIELab and CIEDE2000 color difference formulas. *J Prosthet Dent.* 2016;115(1):65–70.
47. Agarwalla SV, Malhotra R, Rosa V. Translucency, hardness and strength parameters of PMMA resin containing graphene-like material for CAD/CAM restorations. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2019 Dec;100:1–6.
48. Ertaş E, Güler AU, Yücel AÇ, Köprülü H, Güler E. Color stability of resin composites after immersion in different drinks. *Dent Mater J.* 2006;25(2):371–6.
49. Tan BL, Yap AUJ, Ma HNT, Chew J, Tan WJ. Effect of beverages on color and translucency of new tooth-colored restoratives. *Oper Dent.* 2015;40(2):E56–65.
50. Almohareb T, Alkatheeri MS, Vohra F, Alrahlah A. Influence of experimental staining on the color stability of indirect computer-aided design/ computer-aided manufacturing dental provisional materials. *Eur J Dent.* 2018 Apr 1;12(2):269–74.
51. Ardu S, Duc O, Di Bella E, Krejci I. Color stability of recent composite resins. *Odontology.* 2017 Jan 1;105(1):29–35.
52. Szalewski L, Szalewska M, Kleinrok P, Skalicka-Woźniak K, Bożyk A. The impact of energy drinks on the composite resin. *Eur J Med Technol.* 2016;1(10):31–6.
53. Afzali BM, Ghasemi A, Mirani A, Zahra A, Baghban AA, Kharazifard MJ, et al. Effect of Ingested Liquids on Color Change of Composite Resins. Vol. 12, *Journal of Dentistry.* 2015.
54. Kumari RV, Nagaraj H, Siddaraju K, Poluri RK. Evaluation of the Effect of Surface Polishing, Oral Beverages and Food Colorants on Color Stability and Surface Roughness of Nanocomposite Resins. *J Int oral Heal JIOH.* 2015;7(7):63–70.

55. Ilday N, Bayindir YZ, Erdem V. Effect of three different acidic beverages on surface characteristics of composite resin restorative materials. *Mater Res Innov.* 2010 Nov 1;14(5):385–91.
56. Arocha MA, Basilio J, Llopis J, Di Bella E, Roig M, Ardu S, et al. Colour stainability of indirect CAD-CAM processed composites vs conventionally laboratory processed composites after immersion in staining solutions. *J Dent.* 2014;42(7):831–8.
57. Seyidaliyeva A, Rues S, Evagorou Z, Hassel AJ, Rammelsberg P, Zenthöfer A. Color stability of polymer-infiltrated-ceramics compared with lithium disilicate ceramics and composite. *J Esthet Restor Dent.* 2019 Aug 14;1–8.
58. Chan KC, Fuller JL, Hormati AA. The ability of foods to stain two composite resins (PII:0022-3913(80)90328-5). *J Prosthet Dent.* 1980;44(3):317.
59. Queck SHQ, Yap AUJ, Rosa V, Tan KBC, Theoh KH. Effect of staining beverages on color and translucency of CAD/CAM composites. *J Esthet Dent.* 2017;1–9.
60. Westland S, Luo W, Brunton P, Westland S, Luo W, Ellwood R, et al. Colour Assessment in Dentistry. *Ann BMVA.* 2007;4:1–10.
61. Palla ES, Kontonasaki E, Kantiranis N, Papadopoulou L, Zorba T, Paraskevopoulos KM, et al. Color stability of lithium disilicate ceramics after aging and immersion in common beverages. *J Prosthet Dent.* 2018;119(4):632–42.
62. Arocha MA, Mayoral JR, Lefever D, Mercade M, Basilio J, Roig M. Color stability of siloranes versus methacrylate-based composites after immersion in staining solutions. *Clin Oral Investig.* 2013;17(6):1481–7.
63. Ardu S, Braut V, Di Bella E, Lefever D. Influence of background on natural tooth colour coordinates: An in vivo evaluation. *Odontology.* 2014;102(2):267–71.
64. Kanat-Ertürk B. Color Stability of CAD/CAM Ceramics Prepared with Different Surface Finishing Procedures. *J Prosthodont.* 2019;1–7.
65. Samra APB, Pereira SK, Delgado LC, Borges CP. Color stability evaluation of aesthetic restorative materials. *Braz Oral Res.* 2008;22(3):205–10.

66. Bezgin T, Özer L, Tulga Öz F, Özkan P. Effect of toothbrushing on color changes of esthetic restorative materials. *J Esthet Restor Dent*. 2015;27(S1):S65–73.
67. Malek Afzali B, Ghasemi A, Mirani A, Abdolazimi Z, Akbarzade Baghban A, Kharazifard MJ. Effect of Ingested Liquids on Color Change of Composite Resins. *J Dent (Tehran)*. 2015;12(8):577–84.
68. Joiner A, Luo W. Tooth colour and whiteness: A review. *J Dent*. 2017 Dec 1;67:S3–10.
69. Subaşı MG, Alp G, Johnston WM, Yilmaz B. Effects of fabrication and shading technique on the color and translucency of new-generation translucent zirconia after coffee thermocycling. *J Prosthet Dent*. 2018 Oct 1;120(4):603–8.
70. Arif R, Yilmaz B, Johnston WM. In vitro color stainability and relative translucency of CAD-CAM restorative materials used for laminate veneers and complete crowns. *J Prosthet Dent*. 2019;1–7.
71. Guazzo R, Gardin C, Bellin G, Sbricoli L, Ferroni L, Ludovichetti FS, et al. Graphene-based nanomaterials for tissue engineering in the dental field. *Nanomaterials*. 2018;8(5):1–31.
72. Ge Z, Yang L, Xiao F, Wu Y, Yu T, Chen J, et al. Graphene Family Nanomaterials: Properties and Potential Applications in Dentistry. *Int J Biomater*. 2018;2018:12.
73. Xie H, Cao T, Rodríguez-Lozano FJ, Luong-Van EK, Rosa V. Graphene for the development of the next-generation of biocomposites for dental and medical applications. *Dental Materials*. 2017.
74. Azevedo L, Antonaya-Martin JL, Molinero-Mourelle P, del Río-Highsmith J. Improving PMMA resin using graphene oxide for a definitive prosthodontic rehabilitation - A clinical report. *J Clin Exp Dent*. 2019;11(7):70–4.
75. Alamgir M, Tiwari SK, Mallick A, Nayak GC. Graphene oxide and TiO<sub>2</sub> based PMMA nanocomposites for dental applications: A comprehensive study of the mechanical properties. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*. 2018;377(1):9.

76. Wiegand A, Stucki L, Hoffmann R, Attin T, Stawarczyk B. Repairability of CAD/CAM high-density PMMA- and composite-based polymers. *Clin Oral Investig.* 2015;19(8):2007–13.
77. Borges MG, Soares CJ, Maia TS, Bicalho AA, Barbosa TP, Costa HL, et al. Effect of acidic drinks on shade matching, surface topography, and mechanical properties of conventional and bulk-fill composite resins. *J Prosthet Dent.* 2019 May 1;121(5):8.
78. Patel SB, Gordan V V., Barrett AA, Shen C. The effect of surface finishing and storage solutions on the color stability of resin-based composites. *J Am Dent Assoc.* 2004;135(5):587–94.
79. Guler AU, Yilmaz F, Kulunk T, Guler E, Kurt S. Effects of different drinks on stainability of resin composite provisional restorative materials. *J Prosthet Dent.* 2005;94(2):118–24.

## IX. PERSPECTIVAS FUTURAS

---

Con el propósito de dotar a la literatura científica de futuras investigaciones de peso respecto la estabilidad del color del PMMA con nano partículas de grafeno, desde este trabajo se exponen diversas alternativas de estudio.

En primer lugar, se sugieren mayores tiempos de inmersión del material en las soluciones estudiadas con el fin de obtener resultados a medio-largo plazo sobre la estabilidad de color.

Así mismo, se plantea la alternativa de analizar otras modalidades de acabado y pulido del PMMA con nano partículas de grafeno, como por ejemplo el maquillado de la superficie, la técnica de *cutt back* o la técnica de inyección para futuras investigaciones.

Por último, se propone el análisis de la exposición del PMMA con nano partículas de grafeno en otras soluciones como otros tipos de vino tinto, vino rosado, vino blanco, zumo de naranja y yerba mate.

## X. ANEXOS

---



CARTA DE APROBACIÓN



**FACULTAT DE ODONTOLOGÍA**  
**Trabajo Final de Grado**

**Nº ID TFG: TFG-87/2019-A30**

Sr/a. DÍAZ BORGÉN, Clara

Desde la Coordinación de Trabajos de Final de Grado se le comunica que se ha aceptado que realice el trabajo que lleva por título "LA ESTABILIDAD DEL COLOR DE UN POLIMERO DE GRAFENO DESPUÉS DE SU INMERSIÓN EN DISTINTAS BEBIDAS.", una vez superados sus estudios lo pueda defender ante un tribunal previa aprobación de su tutor y de la coordinación de TFG.

La persona encargada de tutorizarle durante este período de tiempo será el Dr/Dra. ORIOL CANTO

Adicionalmente, se le informa que la normativa de la UIC establece que hace falta obtener una evaluación favorable del Comité de Ética en la Recerca (CER) o del Comité de Ética de Estudios Clínicos (CEIC), antes de iniciar la investigación. Deberá aportar este informe cuando lo obtenga.

Le saluda cordialmente

Dr. Oscar Salomó  
Coordinador Trabajo Final de Grado Odontología

**Sant Cugat del Vallés a 29 de Noviembre 2019**

CER

Universitat Internacional  
de Catalunya

Comitè d'Ètica  
de Recerca

UIC  
barcelona

**APROVACIÓ PROJECTE PEL CER/ APROBACIÓN PROYECTO POR EL CER**

Codi de l'estudi / *Código del estudio*: TFG-2019/2020-A30  
Versió del protocol / *Versión del protocolo*: 1.0  
Data de la versió / *Fecha de la versión*: 20/01/20

Sant Cugat del Vallès, 11 de març de 2020

**Alumno: Clara Díaz**  
Tutor: Dr. Oriol Cantó

**Títol de l'estudi / *Título del estudio*: La estabilidad del color de un polímero de grafeno después de su inmersión en distintas bebidas**

Benvolgut/da,

Valorat el projecte presentat, el CER de la Universitat Internacional de Catalunya, considera que, el contingut de la investigació, no implica cap inconvenient relacionat amb la dignitat humana, tracte ètic per als animals ni atempta contra el medi ambient, ni té implicacions econòmiques ni conflicte d'interessos, no s'han valorat els aspectes metodològics sense implicacions ètiques del projecte de recerca, degut a que tal anàlisi correspon a d'altres instàncies

Per aquests motius, el Comitè d'Ètica de Recerca, **RESOLT FAVORABLEMENT**, emetre aquest **CERTIFICAT D'APROVACIÓ**, per que pugui ser presentat a les instàncies que així ho requereixin.

Em permeto recordar-li que, si en el procés d'execució es produís algun canvi significatiu en els seus plantejaments, hauria de ser sotmès novament a la revisió i aprovació del CER.

Atentament,

*Apreciado/a,*

*Valorado el proyecto presentado, el CER de la Universidad Internacional de Catalunya, considera que, el contenido de la investigación, no implica ningún inconveniente relacionado con la dignidad humana, trato ético para los animales, ni atenta contra el medio ambiente, ni tiene implicaciones económicas ni conflicto de intereses, pero no se han valorado aspectos metodológicos sin implicaciones éticas del proyecto de investigación, debido a que tal análisis corresponde a otras instancias.*

*Por estos motivos, el Comité d'Ètica de Recerca, RESUELVE FAVORABLEMENTE, emitir este CERTIFICADO DE APROBACIÓN, para que pueda ser presentado a las instancias que así lo requieran.*

*Me permito recordarle que, si el proceso de ejecución se produjera algún cambio significativo en sus planteamientos, debería ser sometido nuevamente a la revisión y aprobación del CER.*

*Atentamente,*

**Dr. Josep Maria Guardiola**  
**President CER-UIC**

## COMPLICACIONES

Debido a la declaración del estado de Alarma por la crisis sanitaria el día 13 de marzo de 2020, no se han podido incluir las fotos post inmersión de las muestras, ya que lamentablemente se encuentran en el laboratorio de investigación de la Universidad Internacional de Catalunya.

