

3
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

CUANTIFICACION DE FLUOR, MAGNESIO, ZINC Y PLOMO
"IN VIVO", EN ESMALTE DENTAL HUMANO DE DIENTES
PERMANENTES, MEDIANTE UNA TECNICA DE BIOPSIA POR
ATAQUE ACIDO

TESIS CON
TALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N I
ARREOLA RODRIGUEZ MARIA MANUELA
TORRES GUERRERO ELIGIO GERMAN



MEXICO, D. F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION..... | 1 |
| I. FUNDAMENTACION DEL TEMA..... | 3 |
| II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 6 |
| III. OBJETIVOS..... | 8 |
| IV. HIPOTESIS..... | 9 |
| V. MATERIAL Y EQUIPO..... | 10 |
| A. MATERIAL..... | 10 |
| B. EQUIPO..... | 12 |
| VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL..... | 13 |
| A. DIAGRAMA DE FLUJO..... | 13 |
| B. TRATAMIENTO PREVIO DEL MATERIAL..... | 15 |
| C. TECNICA DE BIOPSIA DE ESMALTE DENTAL HUMANO..... | 15 |
| D. PREPARACION DE LAS MUESTRAS..... | 17 |
| E. ANALISIS QUIMICO..... | 18 |
| 1. Determinación de Calcio..... | 18 |
| 2. Determinación de Flúor..... | 19 |
| 3. Determinación de Magnesio y Zinc..... | 20 |
| 4. Determinación de Plomo..... | 20 |
| F. CALCULO DE LA PROFUNDIDAD DE LA BIOPSIA..... | 21 |
| VII. RESULTADOS..... | 23 |
| TABLA DE FRECUENCIAS EN PPM..... | 27 |

| | |
|--|----|
| TABLA DE PROMEDIOS EN PORCENTAJES..... | 28 |
| GRAFICA 1..... | 29 |
| GRAFICA 2..... | 30 |
| GRAFICA 3..... | 31 |
| GRAFICA 4..... | 32 |
| VIII. DISCUSION DE RESULTADOS..... | 33 |
| IX. CONCLUSIONES..... | 37 |
| X. RECOMENDACIONES..... | 38 |
| XI. REFERENCIAS..... | 40 |

INTRODUCCION

El presente trabajo surge de la necesidad de valorar la efectividad y seguridad de la aplicación *in vivo*, de una técnica de biopsia por ataque ácido desarrollada *in vitro*.

La técnica desarrollada se aplicó en dientes permanentes, en una población de niños de 6 a 15 años de edad, bajo condiciones *in vivo*, a partir de lo cual se obtuvieron muestras de esmalte que fueron analizadas por absorción atómica y potenciometría.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que la técnica valorada es altamente segura ya que la máxima profundidad obtenida fue de 6.5428 μm y el grosor del esmalte en el tercio medio, zona de donde proviene la muestra, varía de 2 a 2.5 mm.

Sin embargo, el nivel de efectividad de la técnica no es confiable, debido principalmente a que no presenta las condiciones necesarias para realizar adecuadamente el análisis químico de las muestras.

Debido a esta situación, la cuantificación de los elementos trazas determinados en este estudio : Magnesio (Mg), Zinc (Zn), Plomo (Pb) y Flúor (F) no corresponde al descrito en la literatura.

No obstante, los patrones de distribución obtenidos, están de acuerdo a trabajos previos, lo cual nos permite llevar a cabo una serie de recomendaciones para optimizar el procedimiento de la técnica de biopsia bajo condiciones *in vivo*.

I. FUNDAMENTACION DEL TEMA

Se han desarrollado diversas técnicas para el análisis de esmalte a partir de los estudios realizados por varios autores (1, 2, 3, 4, 5 y 6), que se caracterizan por ser técnicas de tipo mecánico. Estas, no permiten obtener muestras de esmalte libre de dentina, y no es fácil recolectar el material en forma cuantitativa, gran parte de éste se pierde en forma de polvo fino.

Ante este problema, en 1964 Mühlemann y cols (7), desarrollaron una técnica por ataque ácido *in vitro*, la cual consiste en introducir la corona anatómica del diente en una solución desmineralizante de ácido perclórico (HClO_4) 2 N y teniendo como única variable el tiempo de exposición. A través de ésta, se obtienen muestras consecutivas de esmalte libre de dentina, en las que es posible realizar determinaciones cuantitativas de los constituyentes inorgánicos de la totalidad de la corona.

Esta técnica se ha modificado a través de los

años, de tal forma que es posible la toma de biopsias de esmalte, lo que permite conocer con mayor precisión la distribución del contenido mineral en áreas específicas, así como la ejecución de la técnica *in vivo*.

Su perfeccionamiento se ha realizado a partir de 1970, controlando el tiempo y la dimensión del Área expuesta al ácido (8, 9, 10, 11).

El objetivo principal del desarrollo de éstas técnicas ha sido conocer los efectos profilácticos del flúor sobre esmalte. Sin embargo, también han tenido otras finalidades relacionadas con la estructura química del esmalte, propiamente dicho.

Las biopsias obtenidas por medio de la técnica por ataque ácido se han llevado a cabo en América Latina solo de manera restringida, a través de un estudio *in vitro*, realizado en 1984 (12), en el que se hizo una comparación del depósito de flúor en esmalte de dientes deciduos, en niños de 9 a 14 años de edad originarios de la Cd. de México, antes y después de la aplicación de tres agentes fluorurados.

Del análisis crítico de este trabajo, en el que fueron detectadas una serie de fallas en el rubro de material y método, surgió la necesidad del establecimiento de una técnica de biopsia por ataque ácido que fuera confiable, segura, eficaz, de bajo costo y que estuviera en consonancia con la tecnología disponible en México.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Bajo esta perspectiva, se realizó un estudio en la Unidad Universitaria de Investigación en Cariología por De la Cruz y cols. en 1990 (13); lo que cristalizó en la satisfacción de la necesidad antes planteada.

Confirmando, además, un alto grado de seguridad, ya que la máxima profundidad alcanzada fué de 5.0027 μm , y el grosor del esmalte en el tercio medio del diente varia de 2 a 2.5 mm, asegurando así que no dañará la estructura dentaria. Sin embargo, ésta técnica no se ha llevado a cabo *in vivo*, así como tampoco sobre dientes permanentes, por lo que resulta pertinente llevar a cabo una investigación al respecto.

Basados en la información antes descrita, nuestro problema se plantea en términos de llevar a cabo una corroboración *in vivo*, de la técnica establecida por De la Cruz y cols. en 1990 en dientes permanentes, para conseguir con esto, un nivel máximo

de seguridad y con ello dar el aval científico a la técnica antes mencionada bajo condiciones *in vivo*.

III. OBJETIVOS

A. Aplicar la técnica desarrollada por De la Cruz y colaboradores en dientes permanentes *in vivo*.

B. Cuantificar Flúor, Plomo, Magnesio y Zinc como elementos trazas, a partir de la técnica de biopsia por ataque ácido en esmalte dental humano.

IV. HIPOTESIS

La técnica de biopsia de esmalte dental humano establecida *in vitro* por De la Cruz y cols. en 1990, es posible de ser realizada *in vivo* con máxima seguridad y efectividad para la cuantificación de Magnesio, Zinc, Plomo y Flúor como elementos trazas dentro de los siguientes rangos:

Profundidad de 1.06 a 5.5 μm .

Concentraciones de:

Magnesio de 10 a 335 ppm

Zinc de 10 a 105 ppm

Plomo de 0 a 762 ppm

Flúor de 10 a 450 ppm

V. MATERIAL Y EQUIPO

A. MATERIAL

1. Instrumental de vidrio

Matraces volumétricos de 10, 25, 50, 100,

200, 250, 500 y 1000 ml PYREX

Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5 y
10 ml PYREX

Buretas de 10 y 25 ml PYREX

Probetas de 100 y 500 ml PYREX

Vasos de precipitado de 50, 100, 250, 500
y 1000 ml PYREX

Pipetas graduadas de 0.2, 1, 2, 5 y 10 ml
PYREX

Matraz erlenmeyer de 500 ml PYREX

2. Instrumental diverso

Vasos de precipitado de plástico de 100 y
250 ml INSA

Micropipeta de 5 μ l BRAND

Puntas para micropipeta BRAND

Frascos de polietileno de 50, 100, 120,

250, 500 y 1000 ml

Puntas de papel CARMO-DENT

Perforadora IVORY

Vernier SCALA

Cinta de teflón

Cepillos profilácticos

Cinta adhesiva impermeable

Pinzas para algodón

Pinzas para bureta

3. Reactivos

Fluoruro de sodio TECNICA QUIMICA S.A.

Cloruro de sodio TECNICA QUIMICA S.A.

Oxido de lantano TECNICA QUIMICA S.A.

Nitrato de plomo TECNICA QUIMICA S.A.

Hidróxido de sodio J.T. BAKER

Glicerol J.T. BAKER

Acido acético J. T. BAKER

Acido perclórico J. T. BAKER

Acido clorhídrico J.T. BAKER

Estándar de calcio MERCK

Estándar de magnesio MERCK

Estándar de zinc MERCK

B. EQUIPO

Balanza analítica SARTORIUS 2842

Cronómetro GLADDOX

Espectrofotómetro de absorción atómica PYE

UNICAN SP 192

Motor de baja velocidad FOREDOM

Potenciómetro BECKMAN Modelo 3500

Electrodo específico para fluor ORION

Electrodo de referencia CORNING

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El estudio se realizó en una población de 81 escolares de la faja etaria de 7 a 15 años, residentes de ciudad Nezahualcoyotl, que presentaron cualquiera de los incisivos permanentes, a los cuales se les tomó una biopsia de esmalte sobre el lado mesial de la cara vestibular.

A. DIAGRAMA DE FLUJO.

En el siguiente diagrama de flujo, se muestra el desarrollo experimental del presente trabajo en forma global.

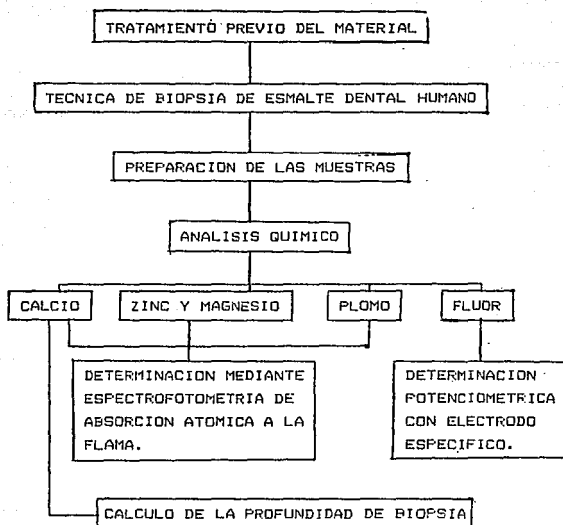


DIAGRAMA DE FLUJO DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL

B. TRATAMIENTO PREVIO DEL MATERIAL

1. Lavado del material

- a. Lavar con agua y jabón.**
- b. Enjuagar con agua deionizada.**
- c. Sumergir durante 24 horas en ácido clorhídrico 1 M.**
- d. Enjuagar 3 veces con agua deionizada.**
- e. Secar completamente.**

2. Preparación de la cinta aislante

- a. Cortar rectángulos de 6 por 8 mm.**
- b. Hacer a cada rectángulo una perforación central de 2 mm de diámetro.**

3. Preparación de las pinzas

- a. Lavar con agua y jabón.**
- b. Enjuagar con agua deionizada.**
- c. Esterilizar a 250°C por 2 horas.**
- d. Aislar las puntas con teflón.**

C. TECNICA DE BIOPSIA DE ESMALTE DENTAL HUMANO

1. Limpiar la superficie del esmalte con

pasta profiláctica para eliminar las sustancias adheridas a ésta; puliendo lentamente con un cepillo y copa de hule.

2. Aislar el diente con rollos de algodón y secar con aire comprimido.

3. Colocar una cinta aislante de 6 por 8 mm con una perforación previa de 2 mm de diámetro sobre esmalte sano a nivel del tercio medio del ecuador del diente.

4. Aplicar 5 µl de una solución 1.4 N de ácido clorhídrico (HCl) en glicerol al 70 % sobre el esmalte expuesto a través de la perforación por espacio de 45 seg.

5. Aspirar la solución, transcurrido el tiempo establecido, y transferirla a un frasco previamente identificado, el cual contiene 500 µl de agua deionizada.

6. Secar la superficie expuesta con una punta de papel y transferirla al frasco muestra.

7. Aplicar 5 μ l de glicerol al 70 % sobre la superficie expuesta.

8. Aspirar la solución mencionada y depositarla en el frasco muestra.

9. Secar la superficie expuesta con una punta de papel y transferirla al frasco muestra.

10. Lavar cada punta de las micropipetas con 5 μ l de agua deionizada para eliminar el remanente de la solución utilizada, depositándose en el frasco muestra.

11. Retirar la cinta adhesiva y lavar la zona expuesta del diente con agua.

12. Secar y aplicar fluoruro.

D. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

1. Adicionar 500 μ l de agua deionizada al frasco muestra, obteniendo un total de 1.02 ml.

2. Tomar una alícuota de 500 μ l, transferirla a un frasco de polietileno adicionando 500 μ l de una solución de ácido perclórico 0.8 N y 4 ml de una solución buffer (pH 5.5), tomar una alícuota de 2 ml para la determinación de flúor y el volumen restante para la determinación de calcio.

3. Tomar el volumen remanente del frasco muestra y llevarlo a 6 ml; de los cuales se toma una alícuota de 2 ml para determinar plomo y los 4 ml restantes para la determinación de magnesio y zinc.

E. ANALISIS QUIMICO

1. Determinación de Calcio.

a. Preparación de la curva de calibración.

Preparar soluciones de 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 y 2 ppm de calcio a partir de una solución concentrada de 1000 ppm. Elaborando en forma paralela un blanco, que contenga al igual que las soluciones

de calcio 10 % de lantano en una concentración de 0.4 %. Estas soluciones son leídas en un espectrofotómetro de absorción atómica.

b. Preparación de muestras.

Determinar el calcio a partir de las muestras de 3 ml después de adicionar 1 ml de solución de lantano 0.4 %.

2. Determinación de Flúor.

a. Preparación de la curva de calibración.

Preparar soluciones cuya concentración sea 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 M, a partir de una solución patrón 1 M de fluoruro de sodio. De éstas soluciones tomar alícuotas de 50 ml y adicionar una cantidad equivalente de solución amortiguadora TISAB (pH 5.5), mezclar y proceder a leer potenciométricamente por medio de un electrodo específico para fluoruro.

b. *Preparación de muestras.*

A las muestras de 2 ml adicionar 8 ml de agua deionizada y 10 ml de TISAB .

3. *Determinación de Magnesio y Zinc.*

a. *Preparación de la curva de calibración.*

Elaborar soluciones cuyas concentraciones sean 0.01, 0.025, 0.05, 0.075 y 1 ppm de zinc y magnesio respectivamente a partir de las soluciones concentradas de 1000 ppm. Preparar en forma paralela un blanco, que contenga al igual que las soluciones 10 ml de solución de lantano 0.4 % por cada 100 ml. Leer en un espectrofotometro de absorción atómica.

b. *Preparación de muestras.*

A los 4 ml de la muestra adicionarle 1 ml de lantano 0.4 % .

4. *Determinación de Plomo.*

a. Preparación de la curva de calibración.

Elaborar soluciones de concentración 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 ppm de plomo a partir de una solución de 1000 ppm, preparando en forma paralela un blanco. Leer en espectrofotómetro de absorción atómica.

b. Preparación de muestras.

De la solución de 6 ml obtenida de la biopsia de esmalte se toma una alícuota de 2 ml para la determinación de plomo.

F. CALCULO DE LA PROFUNDIDAD DE BIOPSIA

El esmalte extraído en cada biopsia se calcula a partir de la concentración de calcio, asumiendo que su contenido por unidad dental es de 37.4 % (14, 15 y 16) y dado que la profundidad de las biopsias está relacionado con la cantidad de esmalte extraído, es factible su cálculo mediante la siguiente fórmula:

$$\mu m = we/6 A$$

donde:

w_e = peso de esmalte extraído

δ = densidad del esmalte

A = área de esmalte expuesta

VII. RESULTADOS

La hipótesis planteada en el presente trabajo comprendió dos aspectos: comprobar la seguridad y la efectividad de la aplicación de la técnica desarrollada *in vitro*, bajo condiciones *in vivo*.

En relación al primer aspecto, se considera que no existe la posibilidad de producir iatrogenias debido a que la máxima profundidad alcanzada fue de $6.5428 \mu\text{m}$ y el grosor del esmalte es, a nivel del tercio medio, de 2 a 2.5 mm, lo que indica que es una técnica altamente segura.

Sin embargo, en lo que respecta a la efectividad de la técnica, en la parte analítica, la hipótesis se rechaza parcialmente, dado que los resultados obtenidos en relación a las concentraciones de los elementos trazas salen del rango establecido llegando incluso a las 60000 ppm, que representa un valor 15 veces mayor al descrito en la literatura (17). Esto parece estar relacionado con la preparación de las muestras para su análisis

cuantitativo.

No obstante, los patrones de distribución, como puede apreciarse en las gráficas correspondientes, concuerda con trabajos previos al presente.

En términos generales, los resultados de éste trabajo son presentados en promedios, tanto en lo que se refiere a Profundidades como en lo referente a Concentración de los elementos cuantificados. Para esto último los resultados se presentan en porcentajes y partes por millón (ppm).

Así bien, en la cuantificación efectuada de Magnesio, Zinc y Plomo, la concentración fue de 1838.43 a 38200.35 ppm, de 4707.76 ppm a 63900.27 ppm y de 4226.74 a 31811.10 ppm respectivamente (Tabla I). Lo que significa que alcanzan un 3.82, 6.39 y 3.18 % en promedio del esmalte total (Tabla II), lo cual no corresponde a la concentración de los elementos trazas en el mencionado tejido.

De esta manera, tenemos en la Tabla I los datos relativos a Magnesio, en la cual podemos observar que

la concentración mínima fue de 1838.43 ppm en una profundidad de 5.9338 μm y la máxima fue de 38200.35 ppm en 1.0612 μm . Estas concentraciones corresponden a 0.18 y 3.82% respectivamente (Tabla II). La distribución de Magnesio con respecto a la profundidad se muestra en la Gráfica 1.

En cuanto al Zinc se observa una concentración mínima de 4707.76 ppm con una profundidad de 5.9338 μm y una máxima de 63900.27 ppm a una profundidad de 1.0612 μm , mostrados en la Tabla I. Dichas concentraciones corresponde a 0.47 y 6.39 % respectivamente (Tabla II). La distribución del Zinc con referencia a la profundidad se observa en la Gráfica 2.

El Plomo presenta una concentración mínima de 4226.74 ppm con una profundidad de 5.3247 μm y una máxima de 31811.10 ppm a una profundidad de 1.0612 μm , mostrados en la Tabla I. Estas concentraciones equivalen a un 0.42 y 3.18 % (Tabla II). En la Gráfica 3 se observa la distribución del Plomo en relación a la profundidad del esmalte.

La distribución de los datos, para los tres elementos, se muestra en la Gráfica 4.

No se reportan resultados de Flúor debido a que el límite de detección del electródo no permite cuantificar concentraciones menores de $10^{-6}M$. Las lecturas efectuadas no cayeron dentro de la curva de calibración, lo que indica que las concentraciones de las muestras eran inferiores a las mínimas detectables.

TABLA GLOBAL DE PROMEDIOS

| PROFUNDIDAD (cm) | [Mg] (ppm) | [Zn] (ppm) | [Pb] (ppm) |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1.0612 | 38200.35 | 63900.27 | 31811.10 |
| 1.6703 | 13337.16 | 26274.39 | 20211.38 |
| 2.2794 | 10528.65 | 29750.94 | 23925.04 |
| 2.8884 | 5187.16 | 22004.88 | 15583.59 |
| 3.4975 | 3383.68 | 15908.47 | 11684.43 |
| 4.1066 | 4284.86 | 14685.46 | 15957.96 |
| 4.7156 | 2561.47 | 12687.21 | 8053.86 |
| 5.3247 | 5071.31 | 14233.50 | 4226.74 |
| 5.9338 | 1838.44 | 4707.76 | 11378.66 |
| 6.5428 | 6699.24 | 12802.54 | 10319.43 |
| Media | 3.8020 | 9119.23 | 21695.74 |
| D. Est. | 1.7494 | 10273.62 | 15666.16 |

Tabla 1. Muestra los resultados obtenidos en ppm para Mg, Zn y Pb.

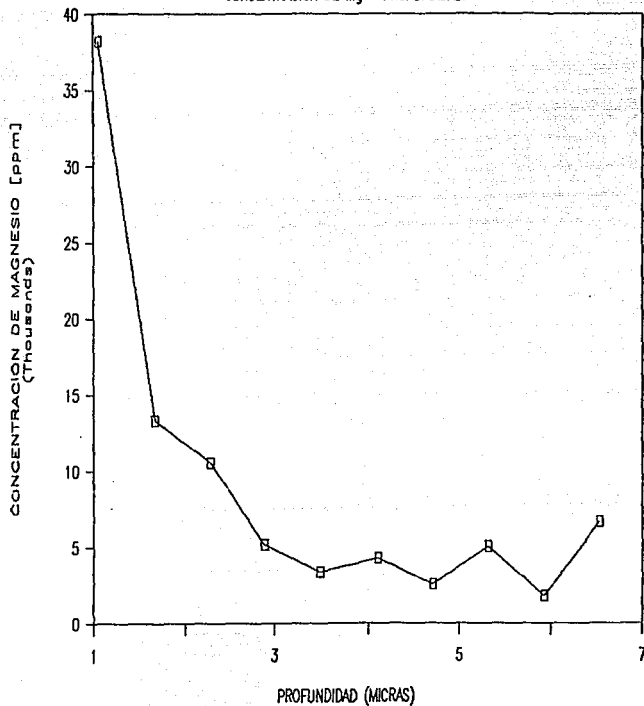
TABLA DE PROMEDIOS EN PORCENTAJES

| PROFUNDIDAD | [Mg] | [Zn] | [Pb] |
|-------------|--------|--------|--------|
| (μm) | (%) | (%) | (%) |
| 1.0612 | 3.82 | 6.39 | 3.18 |
| 1.6703 | 1.33 | 2.63 | 2.02 |
| 2.2794 | 1.05 | 2.97 | 2.39 |
| 2.8884 | 0.52 | 2.20 | 1.56 |
| 3.4975 | 0.34 | 1.59 | 1.17 |
| 4.1066 | 0.43 | 1.47 | 1.59 |
| 4.7156 | 0.26 | 1.27 | 0.80 |
| 5.3247 | 0.51 | 1.42 | 0.42 |
| 5.9338 | 0.18 | 1.47 | 1.14 |
| 6.5428 | 0.67 | 1.28 | 1.03 |
| Media | 3.8020 | 0.911 | 2.17 |
| D. Est. | 1.7494 | 1.082 | 1.65 |
| | | | 0.82 |

Tabla 2. Resultados de Mg, Zn y Pb en porcentajes.

GRAFICA 1.

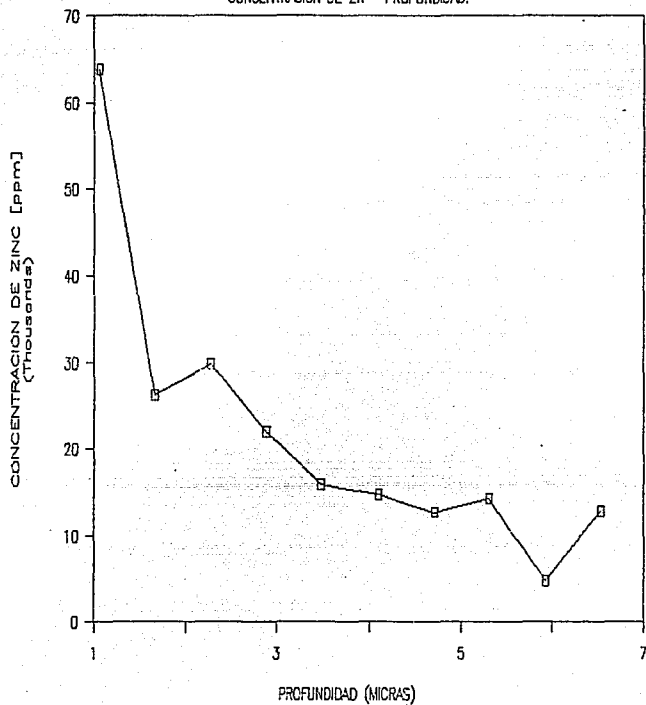
CONCENTRACION DE Mg - PROFUNDIDAD.



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

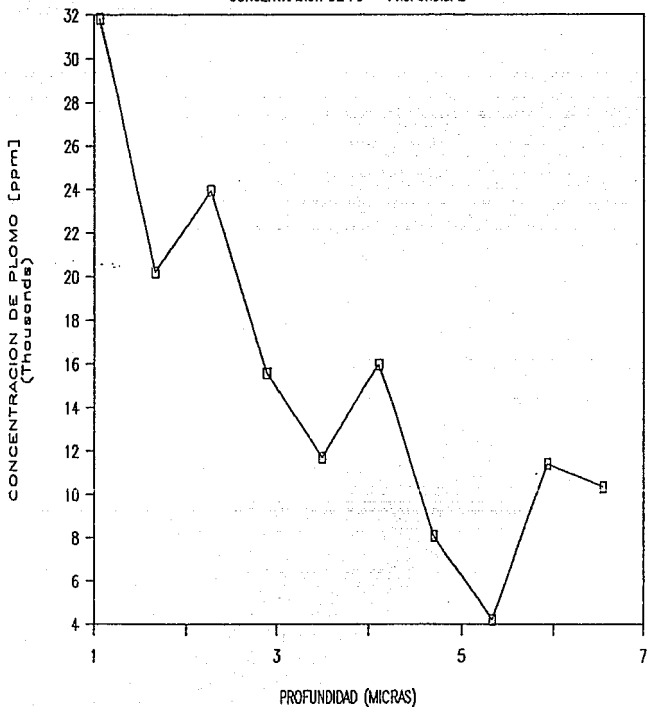
GRAFICA 2

CONCENTRACION DE Zn - PROFUNDIDAD.



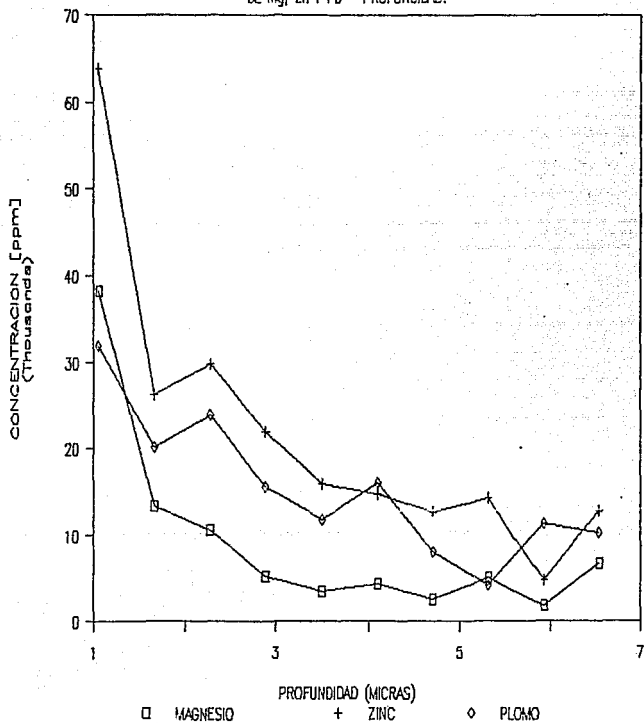
GRAFICA 3.

CONCENTRACION DE Pb - PROFUNDIDAD



GRAFICA 4. CONCENTRACION

DE Mg, Zn Y Pb - PROFUNDIDAD.



VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la presente investigación confirmaron parcialmente la hipótesis planteada.

La técnica evaluada da la oportunidad de obtener biopsias rasas de esmalte, como se observa en las tablas correspondientes. Sin embargo, el tamaño de las muestras es insuficiente para realizar una cuantificación química efectiva de elementos trazas, cuya concentración en esmalte puede ir de 0.01 ppm hasta 5000 ppm dependiendo de la zona geográfica de donde provienen las muestras (18).

Para las muestras analizadas en el presente trabajo se plantearon rangos de concentración de 0 a 762 ppm de acuerdo al estudio que previamente se había realizado *in vitro*. No obstante, los resultados obtenidos no solo exceden estos rangos, sino que incluso las 60000 ppm por lo que se considera que la técnica no es adecuada para la cuantificación de elementos trazas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, en relación a patrones de distribución de elementos trazas y profundidad de biopsia de esmalte, corresponden a los descritos en la literatura en trabajos realizados con técnicas similares a la valorada en esta investigación (13, 17, 19, 20 y 21).

De esta manera, los valores relativos a Mg presentan un patrón de distribución con tendencia al decremento en las capas más profundas del esmalte a nivel superficial, que corresponde al patrón reportado por Driessens y col. (1985) y al descrito en el trabajo de De la Cruz y col. (1991).

Así mismo, el patrón obtenido para Zn presenta una distribución semejante al reportado por Brudevold y col. 1973, Lappalainen y col. 1981, Antilla y col. 1986, De la Cruz y col. 1991, en donde indican que el Zinc tiende a concentrarse en la superficie del esmalte y disminuir en las capas profundas del mismo.

El patrón de distribución observado para el Plomo, indica que existe una mayor concentración de este metal en la parte externa del esmalte,

disminuyendo en el interior del mismo, lo que corresponde al patrón reportado por Antilla y col. 1986 y De la Cruz y col. 1991.

Los resultados de las concentraciones para el Flúor no son reportados dado que al realizar la cuantificación de las muestras, éstas no cayeron dentro de la curva de calibración, indicando con esto, que las concentraciones son menores a las mínimas detectables por el electrodo específico, ya que éstas van de 1 M hasta 10^{-4} M (22, 23 y 24).

Se recomiendan concentraciones superiores a 10^{-5} M para cuantificar Flúor (25).

Los resultados obtenidos respecto a la concentración de elementos trazas, parecen estar relacionados principalmente a:

1. El área de exposición al ataque ácido es de 3.8013 mm^2 , obteniendo una cantidad de esmalte que varía de 11 a $73 \mu\text{g}$ con una media de $42 \mu\text{g}$, que puede ser ideal para la cuantificación de uno o dos elementos como máximo.

2. Las diluciones realizadas a las muestras iniciales aumentan el error, dado que el factor de dilución se ve incrementado para todos los casos.

Como la cuantificación se realizó para cinco elementos, se llevaron a cabo las diluciones indicadas en la técnica, teniendo como consecuencia que apartir de 20 μ l se obtienen 3l ml, disminuyendo en gran medida la concentración de cada metal en la dilución final.

3. El espectrofotómetro de absorción atómica a la flama, no permite efectuar determinaciones de muestras muy diluidas, ya que las absorbancias obtenidas son inferiores a 0.1.

IX. CONCLUSIONES

La técnica empleada *in vivo* resultó útil para observar la distribución de Magnesio, Zinc y Plomo desde la superficie hacia el interior del esmalte, además es altamente segura, dado que con la máxima profundidad alcanzada no se producen iatrogenias. Sin embargo, es inefectiva para la cuantificación de elementos traza por lo que requiere de modificaciones para poder ser utilizada en estudios posteriores y obtener con ello resultados confiables

Es importante recalcar que en América Latina las técnicas de biopsias por ataque ácido son relativamente nuevas, y de hecho solo se han efectuado estudios *in vitro*, por lo que el presente trabajo es el primero que se realiza *in vivo*, encontrándose errores inherentes al método y al mismo tiempo propuestas para la solución de la problemática detectada.

X. RECOMENDACIONES

Con el fin de obtener resultados confiables se propone lo siguiente:

1. El diámetro del área expuesta al ataque ácido podría ser de 4.5 mm, teniendo con esto una superficie expuesta de 15.9 mm² asegurando así, que la concentración de los elementos traza sea representativa.

2. El volumen empleado para la toma de la biopsia podría ser de 10 µl para abarcar el área mencionada en el punto anterior, lo cual permite una correcta disolución del esmalte en el área expuesta.

3. Las diluciones podrían ser las mínimas necesarias para tener con esto concentraciones adecuadas para la cuantificación de elementos traza por absorción atómica y la determinación potenciométrica del flúor.

4. Se propone el empleo de un Espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito. Este equipo permite la cuantificación de elementos traza en el orden de las ppb, con un límite de detección de 100 a 1000 veces mayor que el de flama (17), además que permite emplear volúmenes pequeños de las muestras, ya que le bastan 25 μ l para la determinación.

5. Así también, se sugiere el empleo de un electrodo específico para Flúor con electrodo de referencia integrado, ya que esto permite la determinación de muestras con volúmenes pequeños (de 0.5 a 1 ml).

6. Es importante el correcto lavado del material, con el fin de eliminar toda interferencia y contaminación en la determinación de los elementos traza.

XI. REFERENCIAS

1. Brudevold F., Gardner D. and Smith F.; The Distribution of Fluoride in Human Enamel. J Dent Res. 35; 420-429; (1956).
2. Jenkins G. and Speirs R.; Distribution of Fluorine in Human Enamel. J Physiol. 121; 21; (1953).
3. Isaac S., Brudevold F., Smith F. and Gardner D.; The Relation of Fluoride in the Drinking Water to the Distribution of Fluoride in Enamel. J Dent Res. 37; 209; (1958).
4. Speirs R.; The Nature of Surface Enamel. Brit Dent J. 18; 79; (1959).
5. Hartles R. and Slack G.; Dental Caries in Relation to Nutrition Structural Effects. Proc Nutr Soc. 18; 79; (1959).
6. Gedalia I., Rosenzweig K. and Sadeh A.; Fluorine Content of Superficial Enamel Layer and its

- Correlation with the Fluorine Content of Saliva, Tooth Age and DMFT Count. J Dent Res. 40; 865; (1961).
7. Mühlemann H. R., Shalt A., König K. G.; A Chemical Method for the Removal of Enamel Surface Layers and its Suitability for Fluoride Analysis. Helv Odont Acta. October; 147-153; (1964).
8. Hatz P. et al.; A New Method of Enamel Biopsy for Fluoride Determination. Helv Odont Act. 14; 26-29; (1970).
9. Vander Merwe et al.; An Evaluation of an *in vivo* Enamel Acid Biopsy Technique for Fluoride Determination. Journal Dental Association. 29; 81-87; (1974).
10. Charlton G. et al.; Association Between Dental Plaque and Fluoride in Surface Enamel. Archs Oral Biol. 19; 139-143; (1974).
11. Munksgaard E. and Bruun C.; Determination of Fluoride in Superficial Enamel Biopsies from Human

- Teeth by Means of Gas Chromatography. Archs Oral Biol. 18; 735-744; (1973).
12. De la Cruz C.; Avaliação Comparativa dos Efeitos da Aplicação Tópica de tres Agentes Fluorados. Estudio *in vitro*. Tesis; Porto Alegre; (1984).
13. De la Cruz C. D., Juárez S. N., Castillo G. L. y Pérez V. F.; Desarrollo de una Técnica de Biopsia por Ataque Acido. Estudio *in vitro*. Tesis; (1990); En prensa.
14. Soremark R. and Samsahi K.; Gamma-Ray Spectrometric Analysis of Elements in Normal Human Enamel. Archs Oral Biol. 6; 275-283; (1961).
15. Dijkman A. and Arends J.; Thickness of Enamel Layer Removed by HClO₄ Etching. Caries Research. 16; 147-155; (1982).
16. Dijman A. et al.; Influence of HClO₄ Strength and Etching Time on Rate of Etching and Surface Roughness of Human Enamel. Caries Research. 17; 14-22; (1983).

17. Brudevold F. et al.; Determination of Trace Elements in Surface Enamel of Human Teeth by a New Biopsy Procedure. Archs Oral Biol. 20; 667-673; (1975).
18. Jenkins G.; Fisiologia y Bioquimica Bucal. Primera Edicion. Editorial Limusa; México (1983).
19. Driessens F. et al.; Posteruptive Maturation of Tooth Enamel Studied with the Electron Microprobe. Caries Research. 19; 390-395; (1985).
20. Lappalainen R., Knuuttila M. and Salminen R.; The Concentrations of Zn and Mg in Human Enamel and Dentine Related to Age and Their Concentration in the Soil. Archs Oral Biol. 26; 1-6; (1981).
21. Anttila A.; Proton-Induced X-Ray Emission Analysis of Zn, Sr and Pb in Human Deciduous Tooth Enamel and its Relationship to Dental Caries Scores. Archs Oral Biol. 31; 723-726; (1986).
22. Harris D.; Quantitative Chemical Analysis. Second Edition; W.H. Freeman and Company; U.S.A.;

360-362; (1987).

23. Hargis L.; Analytical Chemistry. First Edition; Prentice-Hall, Inc.; U.S.A.; 335-336; (1988).
24. Christian G., O'Reilly J.; Instrumental Analysis. Second Edition; Allyn and Bacon, Inc.; U.S.A.; 32-35; (1986).
25. Vogel G., Chow L. and Brown W.; A Microanalytical Procedure for the Determination of Calcium, Phosphate and Fluoride in Enamel Biopsy Samples. Caries Research. 17; 23-31; (1983).
26. Losee F., et al.; Natural Elements of the Periodic Table in Human Dental Enamel. Caries Research. 8; 123-134; (1974).
27. Weatherell J. et al.; Variations in the Chemical Composition of Human Enamel. Journal Dental Research Supplement. 53/2; 180-192; (1974).
28. Brudevold F. et al.; An Enamel Biopsy Method for Determination of Fluoride in Human Teeth. Arch Oral Biol. 13; 877-885; (1968).

ANEXO

A. GENERALIDADES DE ESMALTE DENTAL HUMANO

1. DEFINICION

El esmalte es el tejido calcificado más duro del cuerpo humano, su función es la de una resistente cubierta protectora de la corona anatómica de los dientes, permitiéndoles soportar la aplicación de fuerzas mecánicas de gran magnitud, lo que los hace adecuados para la masticación.

2. PROPIEDADES FISICAS

a. Descripción. Capa brillante, semiopaca, de espesor variable, es duro y quebradizo; carece de color propio, éste depende de la dentina que produce la apariencia blanco-amarillenta de los dientes permanentes y blanco-azulada de los temporales.

b. Densidad. El esmalte dental humano tiene una densidad de 2.95 g/ml (Dijman, 1982).

c. Permeabilidad. Es extremadamente escasa; se considera al esmalte como una membrana semipermeable que permite el flujo lento de agua, iones y sustancias de pequeño peso molecular a través de los poros que existen entre los cristales del esmalte desde el medio bucal al interior.

d. Solubilidad. El esmalte es soluble en medio ácido, pero ciertos iones modifican su índice de solubilidad.

Las propiedades físicas antes descritas dependen de las propiedades químicas que a continuación se describen.

3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

El esmalte es el tejido más altamente mineralizado del cuerpo humano. Su contenido inorgánico varía de 95-96 % en dientes permanentes y de 92-93 % en dientes deciduos mientras que el contenido orgánico se encuentra en un rango de 0.2 al 2 % presentándose valores más altos en dientes

deciduos, el porcentaje remanente es agua.

a. Contenido inorgánico. Consta básicamente de un fosfato de calcio cristalino conocido como hidroxiapatita, que también se encuentra en dentina y cemento. Varios iones pueden ser incorporados dentro del esmalte o absorberse en los cristales de hidroxiapatita si se hallan presentes durante su formación.

b. Contenido orgánico. La naturaleza del contenido orgánico del esmalte dental no se conoce completamente. Durante su desarrollo, la matriz del esmalte se parece a la epidermis queratinizada; contiene una relación de aminoácidos y un complejo de proteínas-polisacáridos; también se han encontrado lípidos con trazas de iones de azúcares citrato y lactato, así mismo se han identificado triglicéridos y colesterol.

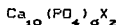
c. Agua. Se ha calculado que aproximadamente 25 % del agua se encuentra absorbida en los cristales de la apatita y el agua restante se

encuentra combinada con el componente mineral, seguramente en forma de una cubierta hidratada rodeando a la hidroxiapatita. La presencia de esta capa de hidratación facilita la difusión de iones y moléculas a través del esmalte promoviendo el intercambio iónico. El agua es indispensable en la interacción del esmalte con su ambiente químico.

B. ESTRUCTURA CRISTALINA DE LA FRACCION INDRGANICA
DEL ESMALTE DENTAL HUMANO

1. NATURALEZA QUIMICA DE LOS CRISTALES

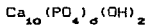
Los primeros análisis químicos indicaron que la materia mineral del esmalte dental humano era una sal, fosfato de calcio. Investigaciones por difracción de rayos X confirmaron que la fase mineral corresponde a una clase de compuestos conocidos como apatitas, cuya fórmula general es:



Específicamente, la apatita presente en el esmalte es la hidroxiapatita (HA), donde X equivale a OH.

La microscopía electrónica ha mostrado que la hidroxiapatita está compuesta por cristales muy pequeños que son la verdadera unidad estructural de la apatita, la unidad de espacio más pequeña del cristal de hidroxiapatita es denominada célula unitaria, la cual consta de 18 iones: diez iones

de calcio, seis iones de fosfato y dos iones de hidroxilo, tiene forma paralelepípeda y se representa estequiométricamente como:



La hidroxiapatita pertenece al sistema hexagonal de cristales, y la acumulación de sus unidades repetitivas en la dirección de sus tres ejes forma un cristal completo. Se caracteriza por la preservación de su estructura cristalina aun bajo la influencia de la sustitución de alguno de sus componentes químicos. Así, el magnesio (Mg), plomo (Pb) y zinc (Zn) pueden sustituir al calcio en su posición; el flúor (F) puede sustituir al hidroxilo, sin que se pierda la configuración estructural de la hidroxiapatita. Sin embargo, la presencia de estos iones en el medio en que se forma la apatita pueden influir en su cristalinidad, y por tanto en la solubilidad del esmalte, ya que algunos de éstos, tienden a inhibir el crecimiento de los cristales y conducir a la formación de cristales de baja cristalinidad, favoreciendo de esta manera la solubilidad de la

hidroxiapatita y con ello la solubilidad del esmalte dental; otros, como el flúor, producen el efecto inverso, es decir, mejoran la cristalinidad de la hidroxiapatita reduciendo la solubilidad de ésta y por ende la solubilidad del esmalte.

Por otra parte, el ion hidronio puede penetrar en la estructura de la hidroxiapatita y con ello promover la disolución del esmalte dental, como consecuencia de la reacción entre el ion (H^+) y el material inorgánico del esmalte (HA). Al llevarse a cabo esta reacción en el enrejado de la hidroxiapatita cambian las propiedades de cristalinidad y solubilidad del esmalte. Sin embargo, la disolución del esmalte se ve afectada por el ambiente que rodea la superficie de éste, por lo que los elementos traza de la superficie pueden influir en la velocidad de disolución del esmalte dental.

2. MECANISMOS DE SUSTITUCION IONICA EN LOS CRISTALES

La incorporación al esmalte de componentes

iónicos depende de la disponibilidad de iones y accesibilidad de los cristales. Esto implica la participación de los procesos siguientes:

a. Adsorción. Este proceso se presenta cuando entran al retículo iones demasiado grandes o con una carga inapropiada. La adsorción, en este caso, es una captación no específica sobre la superficie del cristal de hidroxiapatita que implica la presencia de una fuerza electrostática débil entre los iones.

b. Intercambio iónico. Los iones que se hallan formando los cristales de hidroxiapatita pueden sufrir intercambio iónico con otros iones que se encuentran presentes en el medio, por lo que casi una tercera parte de los iones de la apatita pueden intercambiarse. Se puede presentar un intercambio isoiónico, esto es, la sustitución de cationes y aniones similares en tamaño y carga a los iones del enrejado, sin alterar la red del cristal. también puede llevarse a efecto un intercambio heteroiónico, en donde la sustitución de un ion por otro que

no sea igual en tamaño y carga, producirá cambios en la composición y propiedades de los cristales de la hidroxiapatita.

C. ELEMENTOS TRAZA EN ESMALTE DENTAL HUMANO

1. GENERALIDADES

Los elementos traza, huella o elementos menores, son los términos que se aplican a las sustancias que se encuentran en cantidades muy pequeñas en los sistemas biológicos. Este grupo de elementos inorgánicos están presentes en los tejidos y líquidos corporales del hombre sólo en cantidades mínimas (microgramos o miligramos por gramo de tejido húmedo). Debe tenerse en cuenta que los elementos traza, tanto esenciales como no esenciales se encuentran en concentraciones óptimas, ya que un exceso de éstos puede ser tóxico y la insuficiencia conducir a metabolismos defectuosos.

A pesar de que los elementos traza se hallan en niveles sanguíneos y tisulares bajos, es importante prestarles atención ya que tienen gran trascendencia en algunos procesos biológicos.

La búsqueda de una explicación al papel que

desempeñan los elementos traza en los tejidos dentales a propiciado que se lleven a cabo un gran número de investigaciones. Losee y colaboradores, en un estudio para determinar la presencia y variación de muchos elementos traza y su influencia sobre el proceso carioso en el esmalte, encontraron que por lo menos 41 elementos del sistema periódico estaban incorporados al esmalte dental humano. Sus investigaciones revelaron que se encuentran presentes los siete elementos principales más abundantes en los organismos vivos (C, H, O, Na, N, P y Ca). En el análisis de los elementos restantes, realizados con esmalte entero obtenido de premolares, 35 elementos se encontraron en concentraciones mensurables, mientras que 31, si es que estaban presentes, tenían concentraciones por debajo de los límites detectables a través del procedimiento utilizado.

De acuerdo a los trabajos realizados por otros investigadores, entre ellos Brudevold y Soremark (1967), se sabe que el esmalte superficial difiere considerablemente en cuanto a contenido de elementos traza con respecto al esmalte más profundo.

2. FUNCION

A pesar de que han sido estudiados un gran número de elementos traza presentes en el desarrollo normal de los dientes, resulta difícil dar una definición precisa y definitiva acerca del papel que desempeñan la mayoría de estos elementos en los tejidos dentales. Algunos no parecen desempeñar un papel biológico y sólo están presentes como contaminantes del ambiente tales como plomo, otros parecen estar asociados con los procesos enzimáticos de las células entre los que pueden citarse Fe, Zn, Cu, I, Mg, Co y Mn, los cuales tienden a actuar como catalizadores en forma de metaloenzimas en las que el elemento traza es parte integral de la molécula de la enzima. también actúa en complejos metal-enzima en los que el ion metálico tiene una unión débil con la enzima, es decir, el ion metálico no es parte integrante de la molécula; así mismo actúan como constituyentes o activadores de hormonas, y algunos más probablemente son nutrientes esenciales, pero cuya acción metabólica aun no está clara (F, Sr, Br).

Los elementos traza pueden modificar la composición química y las propiedades físicas de los dientes especialmente la capas superficiales del esmalte. Ellos pueden alterar la cristalinidad y el tamaño de los cristales de la hidroxiapatita, influyendo así, en la solubilidad del esmalte. Estos elementos, también pueden, actuar como una barrera, impidiendo la difusión de los iones hidronio (H^+), reduciendo la velocidad de disolución a la vez que retardan la desmineralización del esmalte. Además, puede influir en la ecología microbiana de la placa, ya sea inhibiendo o promoviendo el crecimiento de bacterias productoras de caries.

3. DISTRIBUCION

Debido a la importancia --que tienen los elementos traza en las propiedades físicas y químicas de la estructura adamantina se han llevada a cabo varios estudios acerca de la distribución normal que presentan éstos en el esmalte dental humano. Los estudios reportan que este tejido posee una constitución y distribución

heterogénea de elementos químicos que va a depender de la profundidad de sus capas, y además, la concentración de estos elementos en el esmalte de un mismo diente no es uniforme de una superficie a otra (Brudevold, 1968; Losee, et al, 1974; Watherell, 1975).

La mayor parte de los elementos traza están presentes en todo el diente en concentraciones que van desde miles de partes por millón hasta menos de 0.01 ppm, aunque en ciertos lugares, como en la superficie externa del esmalte la concentración puede ser más alta.

Existen iones que tienden a acumularse en aquellas partes del diente que se encuentran expuestas durante mayor tiempo a los fluidos corporales, principalmente al esmalte superficial. Por otra parte, estos fluidos también pueden disolver ciertos iones que estén presentes en el esmalte, en tal caso, y debido a que las capas externas de este tejido son las que se encuentran vigorosamente bañadas por los fluidos corporales, serán las que contengan estos constituyentes en

menor cantidad.

De acuerdo a estudios realizados se ha encontrado que la concentración de algunos elementos traza es superior en la superficie del esmalte que en el interior (F, Pb, Zn, Fe, Mg); otros tienen menor concentración en la superficie que en el interior (Na) y otros presentan una distribución aproximadamente uniforme (Sr, Cu, K).

Las diferencias en la composición y distribución del esmalte se explica por el continuo intercambio físicoquímico entre la superficie adamantinada y el líquido bucal, así como los cambios que se presentan durante la disolución del esmalte, esto origina la discrepancia que existe en la concentración de los elementos traza a medida que se avanza de las capas externas a las internas del esmalte.

APENDICE

PREPARACION DE SOLUCIONES

1. Acido Clorhídrico 1 M

Adicionar 95 ml ácido clorhídrico concentrado a 500 ml de agua deionizada, vertir en un matraz volumétrico de 1000 ml y llevar a volumen con agua deionizada. Almacenar en recipientes de polietileno.

2. Glicerol al 70 %

Adicionar 60 ml de agua deionizada a 140 ml de glicerol, mezclar y almacenar en frascos de polietileno.

3. Acido clorhídrico en glicerol al 70 % (1.4 N)

Adicionar 13.2 ml de ácido clorhídrico en 50 ml de glicerol al 70 %, mezclar y vertir en un matraz volumétrico de 100 ml. Llevar a volumen con glicerol al 70 %. Almacenar en frascos de polietileno.

4. Acido perclórico 0.8 N

Adicionar a 26.5 ml de ácido perclórico a 100 ml de agua deionizada y vertir en un matraz volumétrico de 250 ml. Llevar a volumen con agua deionizada. Almacenar en frascos de polietileno.

5. Óxido de lantano 0.4 %

Pesar 4.7 gr de óxido de lantano grado absorción atómica, transferir a un matraz de 500 ml, adicionar 300 ml de agua deionizada seguido por 25 ml de ácido clorhídrico. Calentar el matraz y agitar la mezcla hasta disolución completa. Enfriar a temperatura ambiente y filtrar en un matraz volumétrico de 1000 ml, llevar al aforo con agua deionizada y transferir a un frasco de polietileno.

6. Hidróxido de sodio 5 M

Disolver 100 gr de hidróxido de sodio en 300 ml de agua deionizada, enfriar a temperatura ambiente y transferir a un matraz volumétrico de 500 ml, llevar a volumen con agua deionizada y almacenar en frascos de polietileno.

7. Buffer de TISAB pH 5.5

Colocar 500 ml de agua deionizada en un vaso de precipitados de 1000 ml, adicionar 57 ml de ácido acético y 58 gr de cloruro de sodio. Adicionar poco a poco, una solución de hidróxido de sodio 5 M hasta obtener un pH de 5.5, llevar al aforo con agua deionizada. Almacenar en frascos de polietileno a baja temperatura.

8. Solución patrón de calcio 1000 ppm

Utilizar una ampolleta con 1 gr de calcio, adicionar su contenido y lavar en un matraz volumétrico de 1000 ml, llevar a volumen con agua deionizada. Almacenar en frascos de polietileno a baja temperatura.

9. Solución patrón de magnesio 1000 ppm

Utilizar una ampolleta con 1 gr de magnesio, adicionar su contenido y lavar en un matraz volumétrico de 1000 ml, llevar a volumen con agua deionizada. Almacenar en frascos de polietileno a

baja temperatura.

10. Solución patrón de zinc 1000 ppm

Utilizar una ampollita con 1 gr de zinc, adicionar su contenido y lavar en un matraz volumétrico de 1000 ml, llevar a volumen con agua deionizada. Almacenar en frascos de polietileno a baja temperatura.

11. Solución patrón de plomo 1000 ppm

Disolver 1.598 gr de nitrato de plomo secado previamente en 100 ml agua deionizada, colocar en un matraz volumétrico de 1000 ml y llevar a volumen con agua deionizada. Almacenar en frascos de polietileno a baja temperatura.

12. Solución patrón de flúor 0.1 M

Pesar exactamente 0.4199 gr de fluoruro de sodio previamente seco, disolverlo en 50 ml de solución TISAB y aforar en un matraz volumétrico de 100 ml con agua deionizada. Almacenar en frascos de polietileno a baja temperatura.