

9
2ejem



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

CARACTERIZACION DEL ESMALTE DENTAL
HUMANO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE
TRANSMISION.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A I

CLAUDIA MINERVA ALCANTARA RODRIGUEZ



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

MARZO DE 1993



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

	Pag.
INTRODUCCION	1
CAPITULO I	
I.1 Antecedentes.	3
I.2 Objetivo.	6
I.3 Justificación.	6
I.4 Hipótesis.	6
CAPITULO II ESTRUCTURA DEL DIENTE	
II.1 Un poco de histología.	7
II.2 Formación de los tejidos duros.	13
II.3 El órgano dental humano.	17
II.4 Amelogenesis y estructura del esmalte.	21
CAPITULO III FOSFATOS DE CALCIO	
III.1 Fosfatos de calcio de importancia biológica.	27
III.2 Apatitas.	28
III.3 Apatitas que contienen carbonatos.	34
III.4 Materiales sólidos cristalinos.	34
III.5 Indices de Miller.	35
III.6 Estructura de la hidroxiapatita.	38
CAPITULO IV EL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE TRANSMISION	
IV.1 Conceptos generales.	44
IV.2 Partes del microscopio electrónico de transmisión.	46
IV.3 Diseño y funcionamiento del microscopio electrónico de transmisión.	51
IV.4 Difracción de electrones.	54
IV.4.1 Indexación de patrones de difracción.	56

CAPITULO V DESARROLLO EXPERIMENTAL	
V.1 Desarrollo experimental.	59
CAPITULO VI RESULTADOS	
VI.1 Microscopia electrónica convencional.	61
VI.2 Microscopia electrónica de alta resolución.	71
VI.3 Procesamiento digital de imágenes.	71
VI.4 Simulación de imágenes.	83
VI.5 Daño en los cristales del esmalte producido por el haz electrónico.	85
CAPITULO VII DISCUSION	
VII.1 La línea oscura.	93
VII.2 Posible substituciones en la estructura de la hidroxiapatita.	94
VII.3 Posibles modelos para la línea oscura.	99
CONCLUSIONES	105
REFERENCIAS	106

INTRODUCCION.

El esmalte dental humano es un tejido que se deriva del ectodermo, cubre la corona anatomica de los órganos dentales y es el tejido más mineralizado del cuerpo humano. Consta de un 96% de mineral, y un 4% de material orgánico y agua. Se le considera una barrera de protección frente a los procesos cariosos. Sin embargo no se ha encontrado hasta el momento la forma de evitar este proceso. Desde hace mucho tiempo se ha observado que la composición química del esmalte dental y la morfología macróscopica de la corona son factores importantes que pueden influir en el inicio, establecimiento y desarrollo de los procesos cariosos.

Actualmente la enfermedad por caries dental afecta a un 90% de la población Mexicana y las medidas preventivas no son suficientes para evitarla. Por lo tanto, todo estudio relacionado con caries dental o medios de prevención son de gran importancia. En el presente trabajo se caracterizan estructuralmente los cristales del esmalte dental humano, ya que si se conoce más sobre su estructura podremos contribuir en un futuro a determinar donde da inicio el proceso de desmineralización provocado por el proceso carioso. La caracterización de estos cristales es realizada por medio de las técnicas de microscopia electrónica, tanto de transmisión convencional y de alta resolución así como también difracción de electrones, campo claro y campo oscuro, difracción de rayos X y simulación de imagenes.

La presentación de este trabajo de tesis se dividió en siete capítulos. En el capítulo I se incluyen los antecedentes, el objetivo, la justificación y la hipótesis del trabajo. En el capítulo II se presenta la odontogenesis y estructura del órgano dental. El capítulo III se ha titulado "Fosfatos de calcio", en

esta parte hablaré de la clasificación de las apatitas, centrando mi atención en la hidroxiapatita. También se mencionan los índices de Miller ya que son básicos para el análisis de las estructuras cristalinas. El capítulo IV "El Microscopio Electrónico de Transmisión", describo las partes y funcionamiento del microscopio electrónico de transmisión, así como también de la difracción de electrones y la indexación de patrones de difracción. En el capítulo V se menciona el material utilizado y el método para la obtención de las muestras en estudio. En el capítulo VI se presentan los resultados obtenidos. Y en el capítulo VII, y último, se aborda la discusión de esta tesis. Para finalizar se presentan las conclusiones.

Es importante mencionar la relevancia de este trabajo en la área de los biomateriales así como en la área de la odontología, puesto que representa el primero en su género que se realiza en México en colaboración de la División de estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología y el Instituto de Física, ambos de la U.N.A.M.

CAPITULO I

ANTECEDENTES, OBJETIVO, JUSTIFICACION E HIPOTESIS

I.1. Antecedentes.

Tomando en cuenta que la enfermedad por caries dental en México afecta a un 90% de los habitantes (1) y por lo tanto es un gran problema de salud, todo estudio sobre caries cobra gran importancia. A la caries se le puede considerar como un proceso químico-biológico, que consiste en la desmineralización y destrucción de los tejidos dentarios (2). No es posible atribuir a una sola causa su presencia, desarrollo e inicio y se considera que para el establecimiento de este proceso se necesita la confluencia de muchos factores. Los principales de éstos son: dieta, microorganismos cariogénicos, susceptibilidad del órgano dentario, composición de la saliva y algunos factores inmunoológicos (3-7).

La superficie del esmalte dental representa una barrera de protección frente a los procesos cariosos, sin embargo no se ha encontrado hasta el momento la forma de reforzarla para evitar la penetración cariosa al esmalte. Desde hace mucho tiempo se ha observado que la composición química de este tejido y la morfología macroscópica de la corona son factores importantes que pueden influir en el inicio, establecimiento y desarrollo de los procesos cariosos (8).

Investigaciones realizadas por Le Geros (9) reportaron que el mineral del esmalte dentario humano está constituido por apatitas biológicas como son: fosfato de calcio amorfo; brushita o fosfato de calcio dihidratado (DCPD); monetita o fosfato de calcio anhidro (OCPA); fosfato tricálcico (B-TCP) e hidroxiapatita. Estos cristales pueden hacer combinaciones con algunos elementos variando sus propiedades de adsorción y disolución. La composición

química del esmalte puede alterar los procesos de desmineralización debido a las diferentes propiedades de disolución que tienen las apatitas biológicas (10).

Brown y col (11) concluyeron que la causa mas probable de la variabilidad en los productos de solubilidad del mineral del esmalte es la presencia de varios defectos estructurales e impurezas en los cristales adamantinos. Cutress (12) opina que estas alteraciones se pueden deber a las concentraciones de impurezas incluyendo los fluoruros, carbonatos y algunos elementos traza y que éstos pueden influir en el grado de susceptibilidad a la caries. Otros autores (13,9) concluyeron que las variaciones en la solubilidad de estas apatitas biológicas pueden atribuirse a varias causas: a la diferencia en el tamaño del cristal, a las diferencias en la composición y propiedades del cristal y a las substituciones por diferentes elementos o compuestos en las apatitas.

Los estudios en relación con la composición inorgánica del esmalte dentario humano maduro indican que las apatitas pueden variar su forma estequiométrica y pueden contener una gran variedad de especies químicas, pero la proporción primaria relativa está constituida por tres grupos principales: Ca^{2+} , PO_4^{3-} y OH^- (14,15). Diferentes autores (16,17) han realizado análisis y reportaron que en el esmalte están presentes algunos elementos considerados como trazas por las pequeñas concentraciones en que se encuentran. Los efectos de estos elementos sobre la tasa de disolución de las apatitas biológicas y sintéticas han sido considerados como cariogénicos y no cariogénicos (12,14,18). Muchos autores (12-15,18,19,20,21) reportaron que el fluoruro se encuentra en el esmalte como fluorapatita (producto de reacción de los iones fluoruro con el grupo hidroxilo de la hidroxiapatita en esta reacción se forma como producto intermedio el CaF_2). Se conoce que la solubilidad de la fluorapatita es menor que la de la hidroxiapatita y mucho menor que la del CaF_2 .

Los cristalitas de esmalte dentario humano al ser observados por medio de microscopio electrónico de transmisión muestran la

presencia de una línea oscura a lo largo de sus porciones centrales de aproximadamente 1nm de espesor (22-24). Ella aparece de densidad oscura cuando se encuentra la imagen fuera de foco y desaparece cuando la imagen está bien enfocada, se observa bordeada por dos bandas ligeramente menos oscuras en sobreenfoque. Esto se interpreta como un defecto planar que bisecta el grosor del cristalito. La geometría de este defecto plano es de tal magnitud que se puede extender completamente abarcando los dos extremos del cristal ó terminar en cualquier punto dentro del cristal. Algunos autores (22-25) opinan que este defecto planar es especialmente susceptible a la caries, por lo que la presencia de esta línea es de gran interés ya que parece que sufre disolución preferencial durante los estadios tempranos del proceso carioso(25).

La presencia de esta línea oscura en los cristalitos del esmalte también demuestra la gran anisotropía de éstos. Frazier (24), en estudios realizados con polvo de esmalte, demostró que ésta se observa en el 20% de los cristalitos. Nylen y col (23), observaron esta línea en cristalitos cortados en forma longitudinal y transversal y sugirieron que puede representar una unión doble y que su aparición depende de la orientación del cristal.

Se han propuesto varias teorías para explicar la presencia de la línea oscura (22-25), específicamente se dice que puede ser el remanente de la matriz orgánica calcificada, una dislocación en forma de cuerda de tornillo, una frontera de grano o un plano de defecto localizado de los iones carbonato coherente en la estructura de la hidroxiapatita. Muchos estudios se han realizado con el objetivo de conocer la estructura y las propiedades de esta línea oscura y el papel verdadero que ésta juega durante el proceso carioso, sin embargo, hasta la fecha muchas preguntas se encuentran sin respuesta.

I.2. Objetivo.

El principal objetivo, de este trabajo de investigación es la caracterización de los cristales del esmalte dentario humano por medio de técnicas de microscopía electrónica de transmisión, tanto convencional como de alta resolución, difracción de electrones y difracción de rayos X. Como se comentó anteriormente, los cristales del esmalte presentan una línea oscura en el centro y cuya estructura es hasta el momento desconocida. Por lo tanto, dentro del objetivo mencionado se encuentra la caracterización de la línea oscura.

I.3. Justificación.

Algunos investigadores encontraron que en los cristalitas del esmalte dentario existe una línea oscura (22-25), sus estudios sugieren que en este sitio puede comenzar el proceso de desmineralización por la caries dental. Asimismo, no se ha podido conocer que es, como está formada y cuando se forma. En vista de que existen muchas preguntas que necesitan respuesta adecuada, decidimos realizar este estudio con el fin de intentar dar respuestas a las interrogantes antes mencionadas. Además debemos mencionar la importancia de este trabajo en el campo, tanto de los biomateriales como de odontología, puesto que representa el primero de su género que se realiza en México siendo un resultado de la colaboración de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología y el Instituto de Física, ambos de la U.N.A.M.

I.4 Hipótesis.

La sustitución de algunos átomos de calcio por átomos de elementos de impurezas pueden crear una imagen al microscopio electrónico de una línea oscura en el centro y a lo largo de los cristalitas del esmalte. Esta sustitución no se realiza en forma arbitraria sino que debe ser tal que reproduzca los datos experimentales que se tienen.

CAPITULO II

ESTRUCTURA DEL DIENTE

En este capitulo mencionare algunos aspectos importantes de la odontogenesis, los cuales nos daran las bases necesarias para la comprensión del desarrollo de nuestro objeto en estudio: el esmalte dentario humano. Finalizaremos éste con la descripción de la estructura del organo dental. Las referencias generales utilizadas en este capitulo fueron 26,27 y 28.

II.1. Un poco de histología.

Dos capas germinativas participan en la formación de los organos dentales, la capa ectodermica y la capa de mesénquima. El esmalte dental proviene del ectodermo. La dentina, el cemento y la pulpa, provienen del mesénquima. La odontogenesis se inicia con la formación de una banda epitelial primaria que se forma a los treinta y siete dias de desarrollo embrionario y se separa posteriormente en una lamina vestibular y en una lamina dentaria. Dentro de la lamina dentaria se da una actividad proliferativa intensa y localizada la cual da origen a una serie de crecimientos epiteliales dentro del ectomesénquima en los sitios correspondientes a las posiciones de los futuros dientes deciduos. Desde este momento el desarrollo de los dientes se realiza en tres etapas :

- 1.- Estadio de BROTE.
- 2.- Estadio de CASQUETE.
- 3.- Estadio de CAMPANA.

El desarrollo es un proceso continuo y no es posible tener distinciones claras entre los estadios de transición.

El estadio de brote esta representado por el primer crecimiento epitelial que se hace dentro del ectomesénquima de los maxilares (Fig II.1.). Las células epiteliales muestran poco o

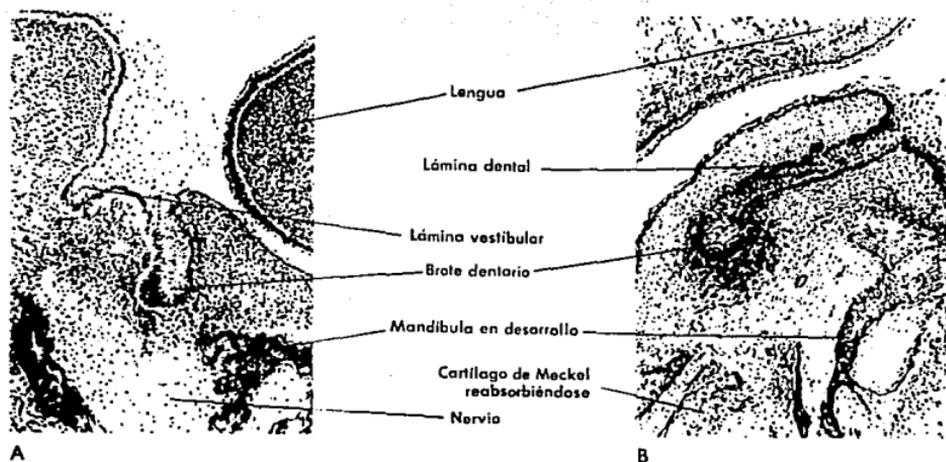


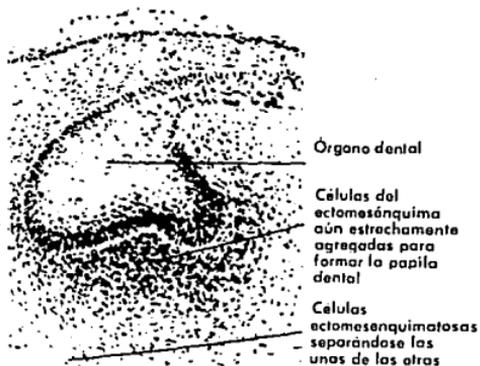
Fig II.1. Estadío de brote del desarrollo dentario visto en un corte frontal (A) y en corte sagital (B).

ningún cambio en cuanto a morfología o función. Las células del ectomesénquima se hallan por debajo del epitelio de revestimiento y alrededor del brote epitelial.

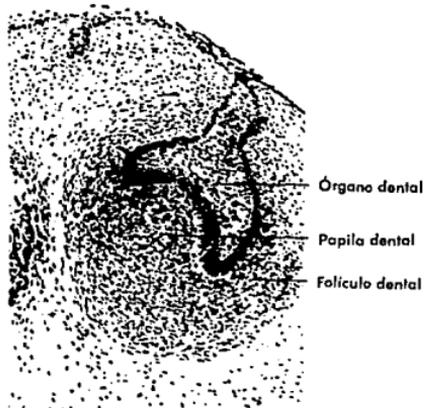
En el estadio de casquete, a medida que el brote epitelial sigue proliferando en el ectomesénquima, la densidad celular parece aumentar en la zona inmediatamente adyacente al crecimiento epitelial. Este proceso se llama clásicamente la "condensación" del ectomesénquima la cual resulta de un agrupamiento local de células incapaces de producir sustancia extracelular y de separarse las unas de las otras (Fig II.2.). En este período inicial del desarrollo dentario es ya posible identificar todos los elementos formativos del diente y sus tejidos de sosten. La condensación epitelial que superficialmente semeja un casquete colocado sobre una esfera de ectomesénquima condensado recibe el nombre de órgano del esmalte, el cual tiene como funciones las de formar el esmalte dental, la formación de la corona, la iniciación de la formación de la dentina y establecer la unión dentogingival. La masa esférica de células ectomesénquimatosas condensadas, llamada papila dental, forman la pulpa y la dentina. El ectomesénquima condensado que limita la papila dental y que encapsula el órgano dentario, el folículo dental, origina los tejidos de sosten del diente. Como el órgano dentario se ubica por encima de la papila dental a modo de casquete, este estadio del desarrollo del diente se conoce como estadio de casquete. El germen dentario está formado por: El órgano dental, la papila dental y el folículo dental.

El estadio de campana se origina por el crecimiento continuo del germen dentario, el cual se va pareciendo a una campana a medida que el casquete epitelial se hace más profundo (Fig II.3.).

La histodiferenciación son diferentes cambios de desarrollo desde el estadio de casquete hasta el estadio de campana. Una masa de células epiteliales similares se transforman en componentes morfológicamente distintos. Las células ubicadas en el centro del órgano dental sintetizando y segregando un ácido mucopolisacárido

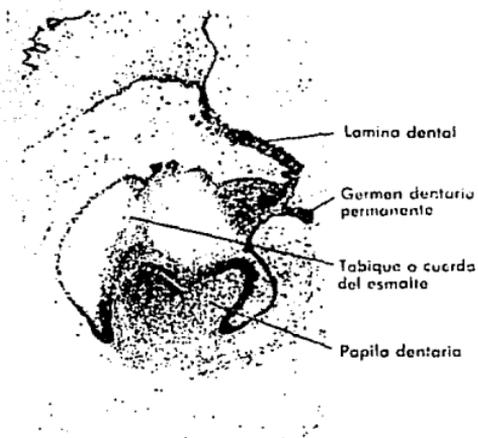


- (a) Estadio primitivo de casquete del desarrollo dentario. Se puede identificar fácilmente una condensación del ectomesénquima asociada con el casquete epitelial.

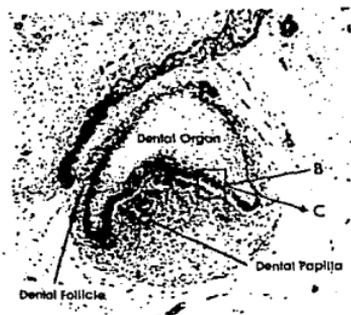


- (b) Se aprecia el estadio de casquete, en el cual el epitelio del órgano del esmalte se ubica sobre una esfera de células mesenquimatosas llamada papila dentaria, que también se extiende alrededor del borde del órgano del esmalte para formar el folículo dental.

Fig II.2. (a) Estadio primitivo de casquete y (b) Estadio de casquete.



(a) Estadío de campana inicial. El órgano del esmalte parece estar dividido en dos por el tabique o cuerda del esmalte.



(b) Estadío de campana. Se define perfectamente el folículo dental y la papila dental. La superficie interna del órgano del esmalte se ha profundizado dando el aspecto de una campana. En el recuadro se aprecia una separación entre la lámina dental y el germen dentario permanente pero esto es causado por el plano de corte.

Fig II.3. (a) Estadío inicial de campana y (b) Estadío de campana del desarrollo dentario.

(en el compartimiento extracélular entre las células epiteliales) éstos son hidrofílicos, de modo que atraen el agua dentro del órgano dental. La cantidad creciente de líquido aumenta el volumen del compartimiento extracelular del órgano dental de modo que las células del órgano son forzadas a separarse. Como las células mantienen conexiones entre sí por medio de sus contactos desmosómicos adoptan la forma de una estrella. Por tal razón el centro del órgano dental se denomina retículo estrellado.

En la periferia del órgano dental, las células adoptan una forma cúbica y forman el epitelio dental externo. Las células que bordean la papila dental se diferencian en dos componentes histológicamente diferentes. Aquellas inmediatamente adyacentes a la papila dental aceptan una forma columnar corta y se caracterizan por un alto contenido de glucógeno. Juntos forman el epitelio dental.

Entre el epitelio dental interno y el retículo estrellado recientemente diferenciado, las células epiteliales se diferencian en una capa de células achatadas llamadas el estrato intermedio. Las células de esta capa rápidamente se caracterizan por una actividad excepcionalmente alta de la enzima fosfatasa alcalina. Aunque las células de esta capa son histológicamente distintas de las células del epitelio dental interno, ambas capas deben de ser consideradas como una sola unidad funcional responsable de la formación del esmalte. La zona de unión entre el epitelio dental interno y el extremo se llama borde cervical.

Otros acontecimientos son la formación de la estructura final del germen dentario, la papila dental en el estadio de campana, la desintegración de la lámina dental y determinación del patrón que tendrá la corona. La lamina dental que une el germen dental al epitelio bucal se rompe formando pequeñas islas de células epiteliales, separando en esta forma el diente en desarrollo del epitelio bucal. Una consecuencia importante de la fragmentación de la lamina dental es que el diente sigue su desarrollo dentro de los tejidos maxilares separados del epitelio bucal. Esto quiere decir que antes que los dientes puedan funcionar deben establecer

una conexión con el epitelio bucal y penetrarlo para alcanzar el plano oclusal.

La formación de los gérmenes dentales temporales y permanentes es muy similar, sólo varía en que se forman en momentos diferentes. La dentición primaria se inicia entre la sexta y octava semana de vida intrauterina y los dientes permanentes se forman entre la vigésima semana intrauterina y el décimo mes después del nacimiento (esto, en el caso del tercer molar es al quinto año de vida extrauterina).

Estadio de campana tardío se presenta después de que se ha formado la primera capa de dentina. Las células del epitelio dental interno se diferencian adoptando funciones secretoras y produciendo una matriz orgánica sobre la superficie dentinaria recientemente formada, casi de inmediato esta matriz orgánica se mineraliza parcialmente y se convierte en el esmalte coronario. Las células productoras de esmalte o ameloblastos, se alejan de la dentina, dejando por detrás un esmalte que se "engrosa" cada vez más. La formación del esmalte no puede comenzar hasta que se haya formado algo de dentina. Esta interdependencia entre los tejidos dentina y esmalte es un ejemplo de inducción recíproca (Fig. II.4.).

II.2. Formación de los tejidos duros.

La dentina, el cemento y el hueso son tejidos conectivos especializados cuyo colágeno tienen un papel importante en el mantenimiento de su estructura y que además tienen mucha similitud en su formación. El ESMALTE no es un tejido conectivo y no posee colágeno en su estructura.

La producción de células de una matriz orgánica es capaz de aceptar material de tipo mineral con la participación de la enzima fosfatasa alcalina y una buena vascularización como requisito esencial. Las células forman las matrices orgánicas de los tejidos duros ya que son sintetizadoras y poseen el armamento metabólico

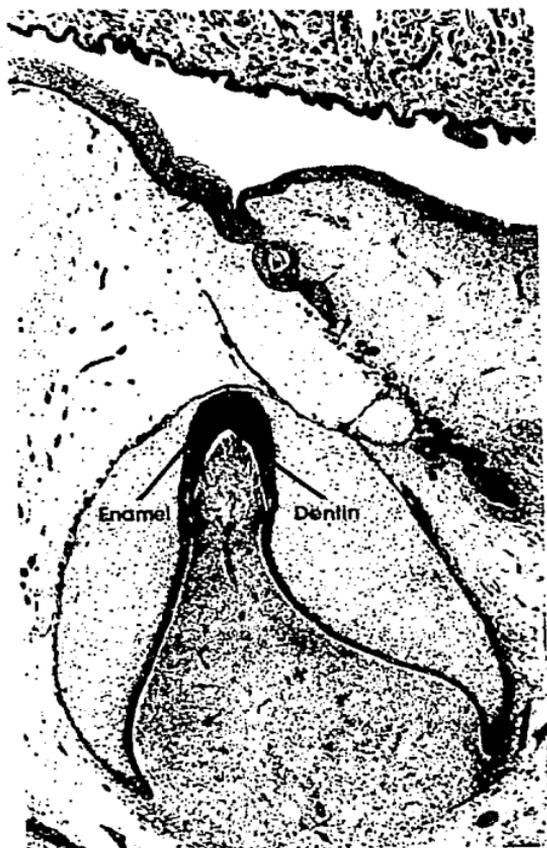


Fig II.4. Estadio de campana tardío (estadio de corona inicial) del desarrollo dentario. La lámina dental se está desintegrando, de manera que el diente continúa ahora su desarrollo separado del epitelio oral. La dentina y el esmalte han comenzado a formarse a nivel de la cresta del epitelio dental interno no plegado.

para llevar a cabo esta síntesis. Otra función de las células es la de secreción. Estas funciones están bien establecidas y son efectuadas por los siguientes organelos: retículo endoplasmático rugoso, vesículas de transporte, aparato de Golgi y vesículas secretorias.

La matriz orgánica de los tejidos duros está formada por proteína colágeno asociada con cantidades y tipos variables de otras moléculas tales como glucosaminoglucanos, glucoproteínas y glucolípidos. A estas macromoléculas no colágenas a menudo se les denomina colectivamente como sustancia fundamental. La matriz del esmalte es distinta, consistiendo de sus proteínas especiales llamadas amelogenina y enamulina. Todas las matrices de tejidos duros, sin importar cuál sea su composición, son capaces de aceptar material de tipo mineral en forma de hidroxiapatita.

La mineralización es un proceso complejo. Los cristales de apatita no pueden precipitar espontáneamente a partir del calcio iónico y el fosfato a las concentraciones fisiológicas halladas en los fluidos tisulares. Una vez que se ha formado el primer cristal, un líquido tisular sobresaturado puede permitir la deposición continua de mineral sobre ese cristal y se presenta el crecimiento cristalino. Para que haya mineralización debe haber un aumento local en los iones inorgánicos para permitir la precipitación espontánea de los cristales (nucleación homogénea), o debe haber una sustancia nucleante para poder llevar a cabo la cristalización sin la necesidad de que haya un aumento en la concentración iónica (nucleación heterogénea).

La mineralización inicial de un tejido conectivo implica la actividad celular. Después que la célula formadora de un tejido duro ha producido una cantidad suficiente de matriz orgánica, se desprenden vesículas pequeñas de su membrana plasmática dentro de una matriz extracelular orgánica. Estas estructuras pequeñas originadas en la membrana plasmática, que se llaman vesículas matriciales, contienen lípidos fijadores de calcio y la enzima fosfatasa alcalina. Se presume que proveen el microambiente en el cual se forman los primeros cristales de hidroxiapatita. Una vez

que el primer cristal aparece dentro de una de estas vesículas crece rápidamente y emerge a través de sus paredes, de modo que existe un conjunto agrupado de cristalitos orientados casi radialmente en una matriz que contiene fibras colágenas dispuestas laxamente y abundante sustancia intercelular.

La iniciación de la mineralización en el esmalte es aún un completo misterio ya que no se encuentran vesículas matriciales en asociación con la amelogénesis ni hay presentes fibrillas de colágeno. La matriz orgánica del esmalte es totalmente diferente, dado que la mineralización sucede dentro de ella casi tan pronto como se deposita. La única característica común es la presencia de grupos sulfatados. El colágeno puede acumular mineral dentro de sí mismo. De esta manera los cristales se empaquetan entre las moléculas de colágeno en los agujeros creados a medida que las moléculas se agregan. El esmalte se halla tan mineralizado que la cantidad de matriz orgánica que contienen es despreciable. Su presencia se limita a una delgada película al rededor de cada cristalito (Fig II.5.).

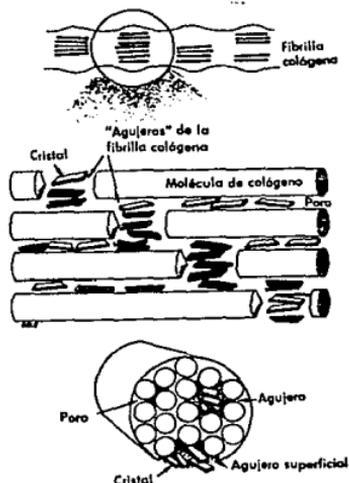


Fig II.5. Diagrama que ilustra la localización de mineral dentro de la fibrilla colágena.

II.3. El órgano dental humano.

Para reconocer las partes que constituyen macroscópicamente al órgano dental las podremos dividir de la siguiente manera: la porción CORONARIA y la porción RADICULAR. Otra división es en base a los tejidos que lo conforman (histológicamente):

Esmalte.- Este tejido se encuentra en la porción externa de la corona dental.

Dentina.- Se encuentra este tejido en la parte media de la corona y de la raíz del órgano dental.

Cemento.- Se localiza en la parte externa de la porción radicular.

Pulpa .- Es el tejido vascularizado que se encuentra en la parte central de la porción coronaria y de la porción radicular.

De los cuatro tejidos que constituyen al órgano dental humano, tres son los tejidos duros, el Esmalte, la Dentina y el Cemento, la Pulpa es el único tejido blando y además proporciona el aporte sanguíneo y nervioso (Fig II.6.). Las discusiones sobre la composición y estructura de la fase (o fases) orgánica del esmalte, dentina y hueso continúan. Las principales dificultades son debidas a que:

a) Los minerales biológicos son microcristalinos e inhomogéneos en naturaleza evitando la aplicación de técnicas que han sido usadas con éxito en la determinación de monocristales de las apatitas sintéticas.

b) Las apatitas biológicas son no-estequiométricas, esto es, la razón molar Ca/P es menor a 1.17 para el esmalte y dentina mientras que es mayor a 1.67 para el hueso.

c) Los elementos inorgánicos menores y de traza presentes en las apatitas biológicas pueden ser elementos impureza en la red de la apatita, pueden ser absorbidos en la superficie del cristal de apatita o segregarse formando otras fases.

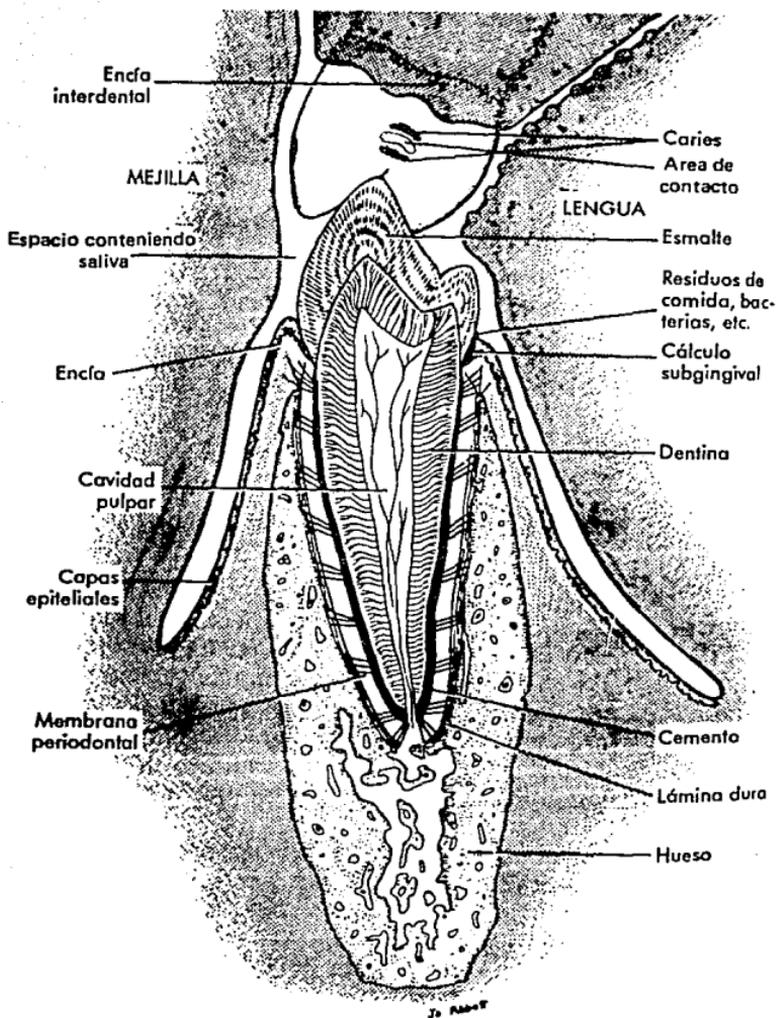


Fig II.6. Diagrama de un diente en un corte longitudinal mostrando los tejidos que lo constituyen, así como también las estructuras adyacentes.

El esmalte, la dentina, el cemento y el hueso difieren en su composición en términos de: cantidad y tipos de fases orgánicas presentes, cantidad de agua, concentración de elementos minoritarios (por ejemplo, CaO_3 , Mg, Na.), en la fase orgánica, medida del cristal, morfología, orientación y distribución del cristal de apatita biológica con respecto a la matriz orgánica (Tabla II.1 y 2). Los componentes orgánicos en esmalte, dentina y hueso son los siguientes:

- 1) El esmalte tiene el menor porcentaje de componente orgánico, 1 wt.% o 2 vol.%, consistiendo de un 58% de proteínas (amelogeninas, enamelinas y fosfoproteínas), 40% lípidos y pequeñas cantidades de azúcares, citratos y lactatos.
- 2) La dentina contiene cerca de 20 wt.% or 30 vol.% de componentes orgánicos: 90% de colágena y un 10% de proteínas no colagenoides. Estas son principalmente proteínas fosforiladas con pequeñas cantidades de γ -carboxyglutamato conteniendo proteínas del tipo osteocalcico, proteínas GLA, glycoproteínas acidas, proteínas sericas y pequeños proteoglycanos.
- 3) Los componentes orgánicos de la predentina difieren en la abundancia y tipos de fosfoproteínas y en la cantidad de proteoglycanos.
- 4) El hueso contiene cerca de 25 wt.% o 35 vol.% de componentes orgánicos, los cuales consisten principalmente de colágena y pequeñas cantidades de proteínas no colagenoides, glycoproteínas acidas, proteínas sericas y pequeños proteoglycanos. La presencia de fosfoproteínas altamente fosforiladas es única para la dentina.
- 5) Los cristales de apatita en el esmalte parecen estar fuertemente enlazados a las enamelinas, mientras el componente de amelogenina disminuye con la madurez.

El contenido de agua en el esmalte, la dentina y en hueso es paralelo al contenido orgánico, con el esmalte teniendo considerablemente menos agua que el hueso y la dentina: en el

Composición ^a	Esmalte	Dentina	Hueso
Calcio ^b , Ca ²⁺	36.5	35.1	34.8
Fosforo, P	17.7	16.9	15.2
Relacion molar ^b , Ca/P	1.63	0.6	1.71
Sodio ^b , Na ⁺	0.5	1.23	0.9
Magnesio ^b , Mg ²⁺	0.44	0.05	0.72
Potasio ^b , K ⁺	0.08	5.6	0.03
Carbonato ^c , CO ₃ ²⁻	3.5	0.06	7.4
Fluoruro ^b , F ⁻	0.01	0.01	0.03
Cloro ^b , Cl ⁻	0.03	0.10	0.13
Pirofosfato ^d , P ₂ O ₇ ⁴⁻	0.02	70.0	0.07
Material inorganico	97.0	20.0	65.0
Material organico	1.5	10.0	25.0
Agua	1.5		10.0
Propiedades cristalograficas			
Parametros (± 0.003 Å)			
a-axis	9.441	9.42 ^d	9.41 ^d
c-axis	6.880	6.88	6.89
Indices de cristalinidad	70-75	33-37	33-37
Tamaño del cristal	1.300×300	200×40	250×30
Productos (800°C)	β-TCP+HA	β-TCP+HA	HA+CaO
^a Peso % ^b Muestra ^c Metodo IR ^d Valores reportados en la literatura. ^e Principales componentes organicos: no colageno, esmalte; colagenos: dentina y hueso. ^f Calculado de la razon de dispersion coherente/incoherente, mineral HA = 100.			

Tabla II.1. Comparación de las propiedades físicas y composición de fases inorgánicas de esmalte, dentina y hueso de adulto humano.

esmalte es igual a 3 wt.% o 11 vol.%, en la dentina es igual a 10 wt.% o 21 vol.%, en el hueso es igual a 15 wt.% o 28 vol.%.

El esmalte es el más denso, los minerales o fases inorgánica contienen cantidades de cerca de 95 wt.% (87 vol.%) en comparación con la dentina que es de un 70 wt.% (47 vol.%) y el hueso 65 wt.% (36 vol.%). El promedio de la razón molar de Ca/P del esmalte humano es de cerca de 1.64, de dentina humana madura 1.62, de hueso maduro 1.70. El esmalte humano contiene la mínima cantidad de CO_3 , Mg y Na, la dentina y el hueso contienen grandes cantidades de los mismos constituyentes, la dentina contiene menos CaO_3 y más Mg que el hueso.

La diferencia en el ensanchamiento de los picos de difracción de rayos x y los índices de "cristalinidad" sugieren ciertas diferencias en el tamaño del cristal su perfección y/o el esfuerzo cristalino. También indican que los cristales de apatita en el esmalte son mucho más largos y/o menos deformados que en el caso de la dentina y hueso. Los estudios de microscopía electrónica de transmisión han mostrado lo largo y primático de los cristales del esmalte y lo mucho más pequeño y plano de los cristales del hueso y la dentina.

Las marcadas diferencias en el tamaño entre los cristales de apatita del esmalte, hueso y dentina han sido atribuidos a las diferencias en la naturaleza y composición de sus respectivas matrices orgánicas: la naturaleza thixotrópica de la matriz orgánica del esmalte se consideró que permitía el crecimiento de los cristales largos de apatita, mientras la matriz más rígida de colágena del hueso y la dentina se consideró que restringía el crecimiento de éstos. Sin embargo esta atractiva y plausible idea no a sido aún confirmada.

II.4. Amelogenesis y Estructura del esmalte.

El esmalte es un tejido ectodérmico que cubre la corona anatomica del diente y es el tejido más altamente mineralizado que

se conoce (Tabla II.2). Consta de un 96% de mineral, 4% de material orgánico y agua . El esmalte dental se forma por el órgano dental, el cual deriva de una proliferación localizada del epitelio oral. Las células que originan al esmalte, los ameloblastos, se diferencian dentro del epitelio dental interno como una parte del organo dental. Debido a que este proceso de diferenciación requiere la presencia de la dentina, éste comienza en la región del futuro extremo cuspídeo y propagándose hacia las vertientes cuspídeas hasta que todas las células del epitelio dental interno se han convertido en ameloblastos.

Durante la dentinogénesis los odontoblastos se retiran centralmente dejando por detrás dentina formada. Los ameloblastos también se retiran pero en forma periférica, dejando esmalte recién formado sobre dentina previamente formada. Como el epitelio dental interno termina a nivel del borde cervical, esta estructura determina la extensión de la aposición del esmalte. La dentinogénesis comienza en el estadio de campana tardío del desarrollo dentario. Inmediatamente cuando comienza la amelogénesis, en el germen dentario se describe como que ha comenzado el estadio de corona en desarrollo del diente.

El contenido inorgánico del esmaltes es un fosfato de calcio cristalino conocido como Hidroxiapatita, que también se encuentra en el hueso, el cartilago calcificado, la dentina y el cemento. Varios iones, tales como el estroncio, el magnesio, el plomo y el flúor, pueden ser incorporados dentro de él o absorbidos por los cristales de hidroxiapatita. La susceptibilidad de estos cristales a la disolución por ácidos, provee la base química de la lesión que constituye la caries dental.

Aunque casi todo el volumen del esmalte se halla ocupado por cristales de Hidroxiapatita densamente "empaquetados", hay una red delicada de material orgánico que se ubica entre los cristales, el cual es de naturaleza proteica y contiene algún material polisacárido.

La formación del esmalte es un proceso complejo que comprende

CONSTITUYENTES	ANALISIS
	Porcentaje en peso
Ca	33.6 - 39.4
P	16.1 - 18.0
CO ₂ *	1.95 - 3.66
Na	0.25 - 0.90
Mg	0.25 - 0.56
Cl	0.19 - 0.30
K	0.05 - 0.30
F	Partes por millón
	Mayor de 50 5,000 en la superficie
Fe	8 - 218
Zn	152 - 227
Sr	50 - 400
Cu	10 - 100
Mn	0 - 18
Ag	0 - 100
Relación (en peso)	1.92 - 2.17
Relación (molar)	1.5 - 1.68

*Presente como carbonato

TABLA II.2. Componentes orgánicos principales y menores (excluyendo el agua) del esmalte humano maduro seco. (Valores recopilados de los reportes de Brudevold y Söremark, 1967).

tres estadios. El primero es informativo e implica la secreción de una matriz orgánica por parte de las células diferenciadas a partir de epitelio dental interno a una velocidad promedio de 0,023mm por día. Esta matriz se mineraliza casi inmediatamente, de modo que el esmalte recién formado consta de alrededor de 65% de agua, 20% de material orgánico (proteínas) y un 15% de material inorgánico (apatita). La secreción de este esmalte parcialmente mineralizado continúa hasta que se ha formado casi todo el espesor del esmalte, con algunas modificaciones de la matriz.

Cuando se segrega por primera vez, la matriz consta de dos tipos de proteínas: una la amelogenina hidrofóbica rica en prolina, con un peso molecular de alrededor de 25,000 y una fosfoproteína ácida glucosilada con peso molecular de alrededor de 55,000 llamada enamulina. Las amelogeninas exceden a las enamelinas a una razón de 19:1. Los cristales depositados en esta matriz son largas placas delgadas de hidroxipatita cuya longitud se completa inmediatamente. A medida que se segrega más matriz, las proteínas del esmalte muestran una reducción progresiva del peso molecular, ocasionada probablemente por proteólisis extracelular y los cristales aumentan en ancho. De esta manera la matriz del esmalte se mineraliza hasta un 30% y posee consistencia blanda.

La matriz sufre un segundo estadio: la maduración, un proceso que comprende el ulterior crecimiento de cristales de mineral y la pérdida de agua y proteínas. La maduración comienza en el centro del crecimiento en el momento en que el esmalte ha alcanzado su total grosor a nivel del extremo cuspideo. Procede siguiendo el mismo patrón de la secreción de la matriz, comenzando en el límite amelodentinario, radiándose hacia la superficie externa de un arco cervical a una velocidad de 0,04-0,05mm diarios más rápido que la secreción de la matriz. La remoción de material proteico durante la maduración es selectiva, dado que se extraen todas las amelogeninas, dejando solo las enamelinas de más alto peso molecular fuertemente unidas a las superficies del cristal de apatita. Se pierde algo de agua, de manera que ahora el esmalte está altamente mineralizado, pero aun es muy poroso.

El tercer estadio es la formación del esmalte resulta en el agregado de más mineral y en la pérdida de la porosidad (fig II.7) Debido a su alto contenido mineral el esmalte es bastante duro, una propiedad que le permite soportar las fuerzas mecánicas aplicadas durante su funcionamiento. Esta dureza es comparable con la del acero liviano, sin embargo también hace que el esmalte sea frágil. Se necesita una capa subyacente de dentina, más elástica para mantener su integridad. Si se pierde el soporte dentinario el esmalte se fractura fácilmente.

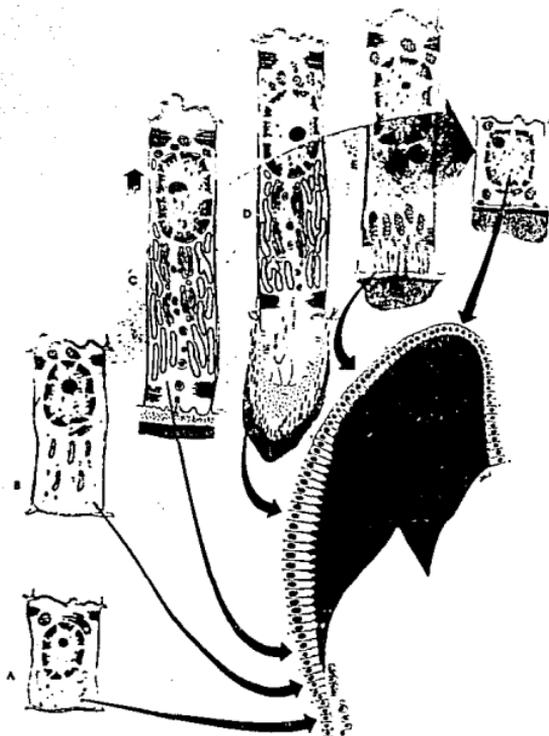


Fig II.7. Resumen de los cambios citológicos que se verifican en el ameloblasto. En A la célula está relativamente indiferenciada y se halla en el estadio morfogenético. En B la célula está alargada preparándose para convertirse en secretoria y es en este estadio (el estadio de organización) que la célula induce la diferenciación de los odontoblastos. C y D representan el estadio secretorio del ciclo vital del ameloblasto. En C está comenzando la secreción inicial de la matriz del esmalte y la célula debe migrar para dar espacio al desarrollo de los procesos de Tomes, los que se diagraman en D. E es el estadio de maduración, mientras que F es el de protección. La línea en G marca un límite por debajo del cual, en los cortes histológicos, se preserva la matriz del esmalte, porque está menos mineralizada. Por encima de la línea se pierde el esmalte y se ve como un espacio.

CAPITULO III

FOSFATOS DE CALCIO

En este capítulo describiremos los minerales que forman el esmalte: los fosfatos de calcio. Principalmente comentaremos las apatitas, de las cuales la hidroxiapatita es el compuesto que mayoritariamente presenta la estructura de los cristales del esmalte. Por lo tanto, la estructura y propiedades de la hidroxiapatita serán descritas en detalle. También hemos incluido los conceptos básicos sobre los materiales sólidos cristalinos y los índices de Miller los cuales serán usados muy frecuentemente a lo largo del presente trabajo de tesis. Las referencias generales para este capítulo fueron 21, 26, 29 y 30.

III.1. Fosfatos de calcio de importancia biológica.

Los fosfatos de calcio son sales ácido fosfórico, H_3PO_4 , y debido a que éste es un ácido tribásico pueden formarse sales que contengan iones $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} o PO_4^{3-} . Las que contienen el ion $H_2PO_4^-$ no son importantes desde el punto de vista biológico, ya que sólo se forman a partir de soluciones muy ácidas. Por otro lado, los iones HPO_4^{2-} y PO_4^{3-} se presentan en el fosfato de calcio de huesos, dientes y cálculos dentales, que son importantes desde el punto de vista biológico. Algunas de estas sales son hidratadas o básicas (contienen iones hidroxilo).

Todos los fosfatos de calcio son sólidos blancos, de los cuales la mayor parte son solubles en agua, en tanto que algunos son insolubles, pero todos se disuelven en ácidos diluidos. Las sales biológicamente importantes precipitan bajo condiciones muy similares y una ligera perturbación, con frecuencia, ocasiona la transformación de una en otra. Algunos fosfatos de calcio existen como minerales en los seres vivos. Se usan generalmente nombres cortos en lugar de sus nombres químicos sistemáticos.

Los fosfatos de calcio de significancia biológica se clasifican de la siguiente manera:

- 1.- Fosfatos de Calcio Amorfos.
- 2.- Fosfato Dihidratado de Calcio -Brushita- ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).
- 3.- Fosfato Anhidrico de Calcio -Monetita- (CaPO_4)
- 4.- Fosfato Octacalcico ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- 5.- Fosfato Tricalcico -Whitlockita- ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
- 6.- Pirofosfato Dihidratado de Calcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$)
- 7.- Apatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2(\text{HA})$).

La estructura cristalina, grupo espacial y la razón Ca/P de estos fosfatos de calcio son listados en la Tabla III.1. Los fosfatos de calcio, principalmente la Hidroxiapatita, tienen un gran número de aplicaciones clínicas para reparar, por ejemplo, defectos, huesos rotos y como recubrimientos para implantes metálicos. Otros componentes calcícos de interés en la biología oral son la Fluorita, o Fluoruro de calcio (CaF_2) y la forma calcica del Carbonato de Calcio (CaCO_3). Debido a las complejidades de las fases de Fosfato de Calcio ha sido necesario estudiar sistemas sintéticos para investigar con mayor detalle: la nucleación y crecimiento de estas fases, las propiedades de solubilidad y absorción del esmalte humano, su formación y transformaciones.

III.2. Apatitas.

La apatita es una serie isomorfica de minerales que se encuentran como granos o como prismas hexagonales vidriosos terminados en piramides o bipiramides, ya sean truncadas o no. Los minerales van de transparentes a opacos, y pueden ser piedras alargadas verdes, grises, cafés, rojo y más raramente de color violeta, rosa o sin color. Si no fuera por su fragilidad (su dureza Mohs es de 5, comparado con 7 o 9 de las gemas preciosas), la apatita sería una piedra preciosa muy popular. Son difíciles de pulir y cortar, sus planos de clivaje son pobremente paralelos a la base y se fracturan fácilmente. La Tabla III.2. muestra las características físicas de las apatitas.

Fosfatos de Calcio	Estructura cristalina	Grupo especial	Ca/P ^a
Fosfato dicálcico, dihidratada, brushita, DCPD	monoclinico a=5.182 Å b=15.18 c=6.239 B=116 25'	C2/c	1.0
Monetita, DCP	triclinica a=6.91 Å b=6.63 c=6.99	PI	1.0
Fosfato octacalcico	triclinica a=19.87 Å b=9.63 c=6.87	PI	1.33
Whitloquita, β-TCP fosfato tricalcico	hexagonal a=10.428 Å c=37.378	R3c	1.50
Witloquita, β-TCP (substituye-Mg)	hexagonal a=10.32 c=37.00 monoclinica a=22.84 Å b=9.994 c=17.088	R3c C2/c	1.50 ^b 1.50 ^b
Hidroxiapatita HAP	hexagonal a=9.377 Å c=6.880	P6 ₃ /m	1.67
Fluorapatita FAP	hexagonal a=9.377 Å c=6.880	P6 ₃ /m	1.67
Clorapatita CIAP	monoclinica a=9.632 Å c=7.000	C2/c	1.67
^a Racion molar. ^b (Ca + Mg)/P.			

Tabla III.1. Propiedades cristalográficas de los fosfatos.

La apatita es uno de los minerales Fosfaticos de mayor abundancia en el mundo. Cristaliza con el sistema hexagonal y grupo espacial $P6_3/m$ (ver Tabla III.1). Los iones fosfato tienen en la apatita una disposición compacta hexagonal (Fig III.1-2). En realidad las distorsiones de la forma hexagonal las ocasionan los iones hidroxilo (o flúor) y calcio, cuyas posiciones se consideran en la figura III.3 Y 4). Como se puede observar, existen canales que atraviesan la estructura. Los cuales son consecuencia directa del arreglo hexagonal compacta. Dos tercios de estos canales (marcados con triangulos) se ocupan por columnas de iones Ca^{2+} ; estas columnas representan dos quintos del calcio. El otro tercio de los canales lo ocupan columnas de iones con carga negativa, OH^- en la hidroxiapatita y F^- en Fluorapatita. Estos mismos canales están rodeados por los tres quintos restantes del Ca^{2+} .

La estructura de la apatita incluye no menos de 10 especies minerales que tienen la formula general $X_5(YO_4)_3Z$, donde X es generalmente Ca^{2+} o Pb^{2+} , Y es P^{5+} o As^{5+} y Z es F^- , Cl^- o $(OH)^-$. Es un mineral muy raro, pero es el fosfato de calcio más importante en el reino animal porque está en estrecha relación con el fosfato de calcio básico de los huesos y de los dientes. El grupo de las Apatitas contiene tres series: La serie de las Apatitas con Calcio, las Piromorfitas (contienen Plomo en lugar de Calcio) y las Suabititas (intemedia entre las otras dos). Tres son los miembros que forman una serie completa de solución sólida que involucran los aniones halidos y los hidroxilos y estos son: Fluorapatita ($Ca_5(PO_4)_3F$), Cloroapatita ($Ca_5(PO_4)_3Cl$), y la Hidroxiapatita ($Ca_5(PO_4)_3OH$). Así que la serie general puede ser escrita como $Ca_5(PO_4)_3(F, Cl, OH)$. La Fluorapatita es el mineral más importante comercialmente.

Las apatitas son estructuras iónicas (a excepción de los enlaces covalentes dentro del ion fosfato). Por lo tanto no es sorprendente que sean sustancias bastante duras, refractarias, con puntos de fusión, casi siempre, mayores de $1,600^\circ C$. La sustitución parcial o completa de iones de la malla por otros iones de tamaño similar es otra propiedad esperada en las estructuras iónicas.

Características físicas de las apatitas

Color	Variable, predominantemente verde.
Lustre	Vidrioso.
Dureza (Mohs)	5
Gravedad específica	2.9-3.2
Forma	En forma de cristales alargados; granulos gruesos y compactos; concreciones nodulares.
Clivage	Fractura irregular.
Indices de refracción	$n = 1.63 - 1.67$
Comentarios	Presentan frecuentemente fluorescencia a la luz ultravioleta y a los rayos X; fosforescentes y algunas veces fuertemente termoluminiscientes.

Tabla III.2. Características físicas de las apatitas: carbonato-apatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3\text{H}_2\text{O}$, clorapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$, fluorapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$, e hidroxiapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$.

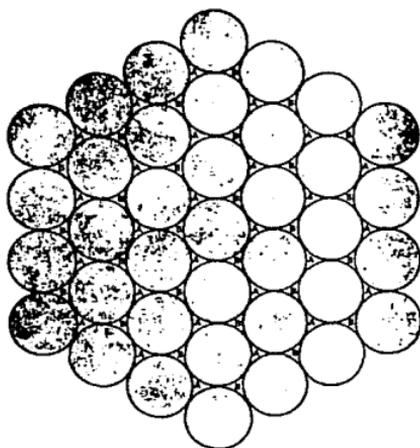


Fig III.1. Esferas acomodadas compactamente. La mitad de las depresiones entre las esferas están marcadas como A y las otras como B.

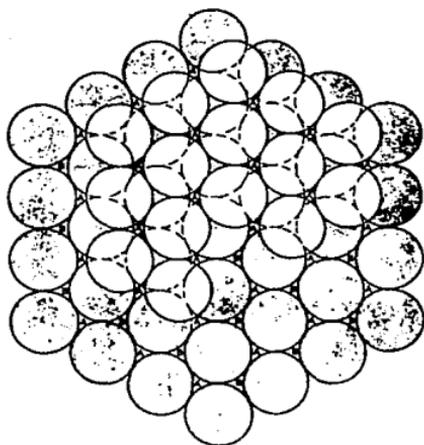


Fig III.2. Esferas que se muestran en la figura anterior, pero ahora las depresiones B están ocupadas.

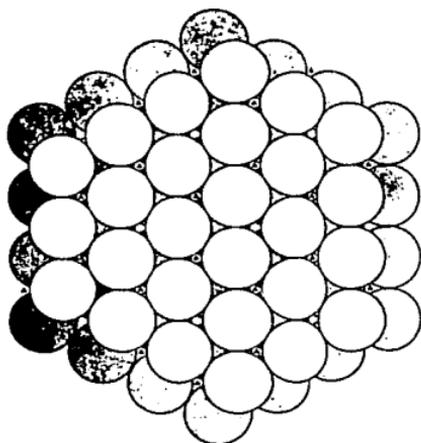


Fig III.3. Vista superior de un grupo de esferas acomodadas en una disposición hexagonal compacta. En la hidroxiapatita, los canales a través de la estructura marcados Δ se llenarían con columnas de iones calcio y todos los canales no marcados por columnas de iones hidroxilo.

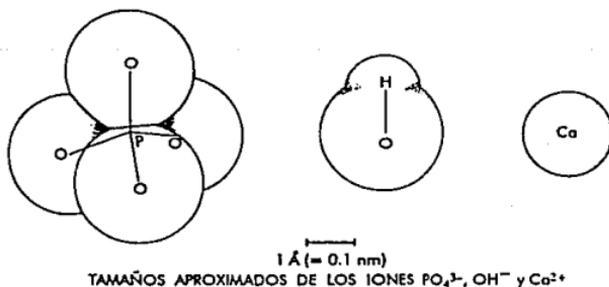


Fig III.4. Tamaño y forma de los iones fosfato, hidroxilo y calcio en la hidroxiapatita. El ion Flúor es un poco menor que el ion hidroxilo.

III.3. Apatitas que contienen carbonatos.

La principal dificultad con las apatitas que contienen carbonatos está en decidir si los iones carbonato forman parte integral de la estructura cristalina, son externos a ésta, adsorbidos en la superficie de los cristales o en una fase separada. Aun si los iones carbonato substituyen iones en la estructura, existen dos posibilidades. La primera de éstas, en la cual se reemplazan los iones hidroxilo, puede prepararse haciendo CO_2 seco sobre la hidroxiapatita a $1,000^\circ\text{C}$. Si un fosfato de calcio básico se precipita a la temperatura ambiente o corporal en presencia de carbonato o bicarbonato, la apatita resultante siempre contendrá un porcentaje alto de carbonato o bicarbonato.

El carbonato tiene el efecto de hacer a la apatita mucho menos cristalina y se forma un producto amorfo. Desde el punto de vista estructural, estas apatitas mantienen estrecha relación con las apatitas de los huesos y de los dientes, como podría esperarse de las condiciones de formación. La posibilidad más importante es la substitución parcial de fosfato por carbonato en los cristales de apatita; al mismo tiempo quizá se halle una pequeña fracción (menos de 10%) de los iones hidroxilo reemplazados por carbonato. El carbonato puede adsorberse en la superficie de los cristales, o presentarse en una fase amorfa separada.

III.4. Materiales sólidos cristalinos.

Los átomos de los diferentes materiales sólidos y cristalinos se distribuyen en el espacio con una geometría específica. A la unidad mínima de orientación se le llama celda unitaria. Un material sólido cristalino se caracteriza por tener:

- a) Simetría traslacional; esto es, la repetición de la celda unitaria a lo largo de un eje longitudinal hasta el infinito y,
- b) Simetría rotacional, que es la repetición de la celda unitaria al girarla sobre un mismo eje.

Los materiales cristalinos pueden acomodarse, en el espacio básicamente en 14 formas diferentes llamadas redes de Bravais.

Estas redes se subdividen, a su vez, de la siguiente forma:

- 1) Cuando se coloca un átomo de un material (base) a cada punto de intersección (nudo) a la red cristalina se origina una celda simple o primitiva.
- 2) Cuando se asocia un átomo en el centro de dos caras paralelas se conoce como celda de base centrada.
- 3) Si se asocia un átomo en el centro geométrico de la red se llama celda de cuerpo centrado.
- 4) "A cara centrada" se le conoce, si hay un átomo en cada cara de la celda unitaria.

Entonces se concluye que "un cristal puede presentarse como la mínima geometría espacial de un material sólido, constituido por una red, más una base, que además cuenta con orientación traslacional y rotacional". Las 14 formas básicas de celdas unitarias se muestran en la figura III.5.

III.5. Índices de Miller.

Para identificar en un cristal los planos y direcciones de la celda unitaria, se utilizan los llamados índices de Miller. Estos nos permiten conocer la dirección en la cual un sistema cristalino dado es observado.

a) Los índices de dirección son números enteros dados por el recíproco mínimo de la intersección de la celda con los ejes de referencia elegido. Estos índices son presentados como $[u\ v\ w]$. En la figura III.6 se presenta un ejemplo para una celda unitaria cúbica simple con sus índices de Miller.

b) Los índices de plano atómico se denota por $(h\ k\ l)$ referidos también a un sistema de coordenadas. Estos son números enteros que provienen del recíproco del segmento cortado por el plano a caracterizar. Como se observa en la (fig III.7.) hay algunos planos que interceptan mayor número de átomos que otros; estos se

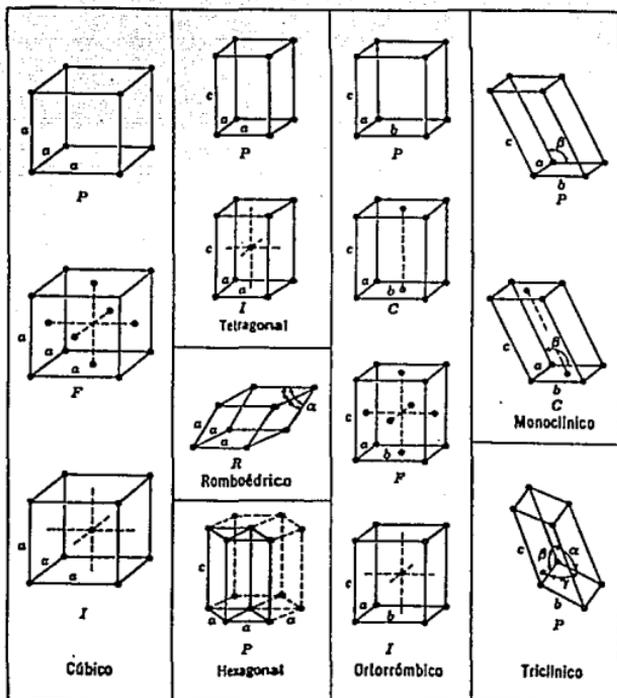


Fig III.5. Celdas unitarias convencionales de las 14 redes espaciales de Bravais. Las letras mayúsculas se refieren al tipo de celdas: P primitiva; C celda con un puntoreticular en el centro de dos caras paralelas; F celda con un punto reticular en el centro de cada cara; I celda con un punto reticular en su centro; R celda primitiva romboédrica.

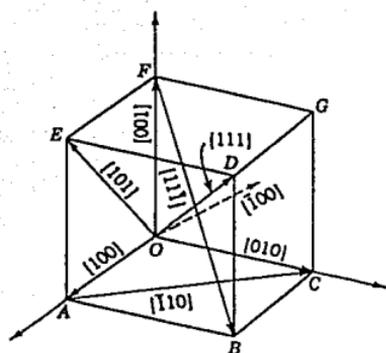


Fig III.6. Celda unitaria cubica mostrando los indices de Miller de sus direcciones principales.

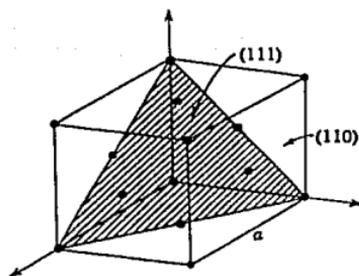


Fig III.7. Celda cúbica unitaria mostrando los planos con indices de Miller (111) y (110) .

conocen como planos de mayor densidad, y dependiendo de la dirección que tome este plano, es en donde se verán afectadas las propiedades físicas y químicas del cristal. Esta desigualdad de propiedad del monocristal en las diferentes direcciones cristalográficas se llama "anisotropía".

Los materiales polisacaridos muestran, en general, isotropía, debido a que los cristales están orientados en diferentes direcciones unos de otros. La isotropía no se da en los materiales que en sus cristales muestran una textura establecida; es decir, que todos sus cristales estén orientados en la misma dirección.

La deducción de los índices de Miller es de la siguiente manera en el caso de un sistema cúbico:

- 1) Tomar el eje de referencia Z perpendicular a la cara del cubo.
- 2) Medir la posición de los átomos a lo largo de los ejes, tomando como unidad de longitud la del cubo.
- 3) Encontrar las intersecciones de cualquier plano con los tres ejes. Tomar los recíprocos de estos tres números y reducirlos a los tres enteros más pequeños.

III.6. Estructura de la hidroxiapatita.

Las estructuras cristalinas de la hidroxiapatita y la fluorapatita fueron establecidas por Naray-Szabo y col. (31) en 1930 y refinada posteriormente por Beevers y McIntyre (32) y Kay y col. (33) en 1964. Posteriormente la estructura de la hidroxiapatita, fluorapatita y cloroapatita fueron re-refinadas por Young y Elliott (34) en 1966. La hidroxiapatita es una definición de la estructura y no de la composición. Pertenece al sistema hexagonal, grupo espacial $P6_3/m$ caracterizado por un eje de simetría 6 a lo largo del eje c y tres ejes equivalentes a lo largo del eje a con ángulos de 120° entre ellos (ver Tabla III.1.). Su celda unitaria contiene 10 Ca, 6 PO_4 , y dos grupos OH. PO_4 forma tetraedros. Los iones OH localizados en las esquinas de la celda están rodeados por dos conjuntos de átomos de calcio (Ca^{II}) arreglados en un patrón triangular en los niveles $z=1/4$ y $3/4$; por

dos conjuntos de tetraedros PO_4 también arreglados en forma triangular en los niveles $z=1/4$ y $3/4$, y por un arreglo hexagonal de átomos de calcio. Los 10 átomos de calcio son descritos como CaI y CaII de acuerdo al medio que los rodea: 4 CaI ocupan las posiciones a los niveles $z=0$ y $z=1/2$; 6 CaII ocupan los niveles $z=1/4$ y $z=3/4$ en conjuntos de tres. Los grupos OH se muestran como una sola unidad y están situados entre los triángulos imaginarios de Ca en un arreglo lineal O-H-O-H... paralelo al eje c. Las posiciones respectivas de los grupos OH son:

O en las posiciones $z=0.2$ o 0.3 y 0.7 o 0.8 .

H en las posiciones $z=0.06$ o 0.44 y 0.56 o 0.94 .

En la fluorapatita el fluor se encuentra en $z=0.25$ y 0.75

En la clorapatita el cloro se encuentra en $z=0$ y 0.44

La figura III.8 muestra la estructura por capas de la celda unitaria de la hidroxiapatita a lo largo del eje c. Las cadenas de los grupos PO_4 en los arreglos fuertemente empaquetados juegan un papel muy importante para la estabilidad de la estructura de las apatitas. La figura III.9. muestra la celda unitaria de la hidroxiapatita a lo largo de las direcciones $[110]$ (fig. III.9a), $[010]$ (fig. III.9b), $[001]$ (fig. III.9c), $[111]$ (fig. III.9d), $[100]$ (fig. III.9e). Los arreglos atómicos de la hidroxiapatita, Fluorapatita y Clorapatita son muy similares con respecto a las posiciones de los Ca y PO_4 pero difieren en las posiciones respectivas de los átomos OH, F, y Cl a lo largo del eje c en el centro de los triángulos imaginarios que forman los CaII (fig III.10). Estas diferencias se reflejan en las dimensiones de la celda unitaria y en la estabilidad de la estructura, los cuales siguen el orden $FAP > HAP > ClAP$. Las substituciones de cualquiera de los átomos de la celda unitaria de estos compuestos cambian la cristalografía original. Por ejemplo la clorapatita pertenece al sistema monoclinico en lugar del sistema hexagonal (ver Tabla III.1)

Estructura de la Hidroxiapatita por capas		
	Eje c.	Atomos
6.8 Å	1	Ca
	0.93	O, H
	0.93	Ca, O, P
	3/4	O
	0.70	O
	0.57	H, O
	1/2	Ca
	0.43	H, O
	0.30	O
	1/4	Ca, O, P
	0.20	O
	0.70	H, O
	0	Ca

Fig III.8. Estructura del cristal de hidroxiapatita mostrado por capas a lo largo del eje c cuya dimensión es de 6.8 Å. Las posiciones de los átomos han sido representadas en fracciones de 0 a 1, siendo 1 igual a la dimensión del eje c.

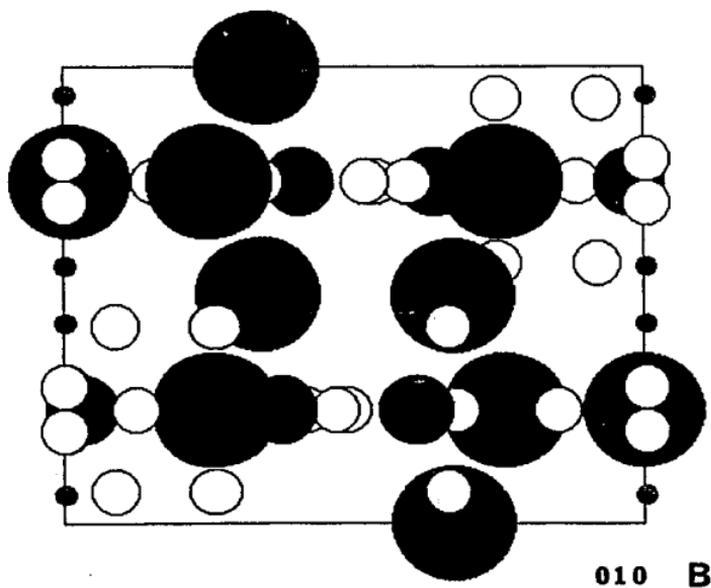
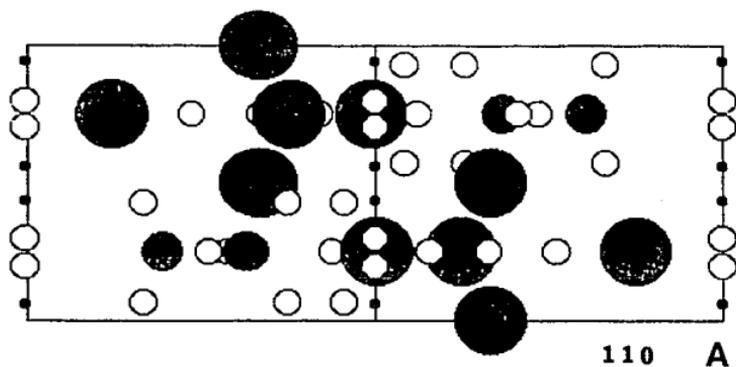


Fig III.9a.y III.9b.

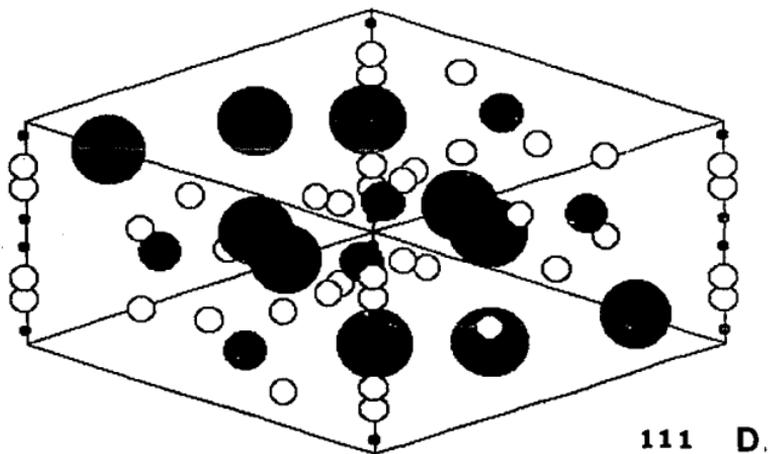
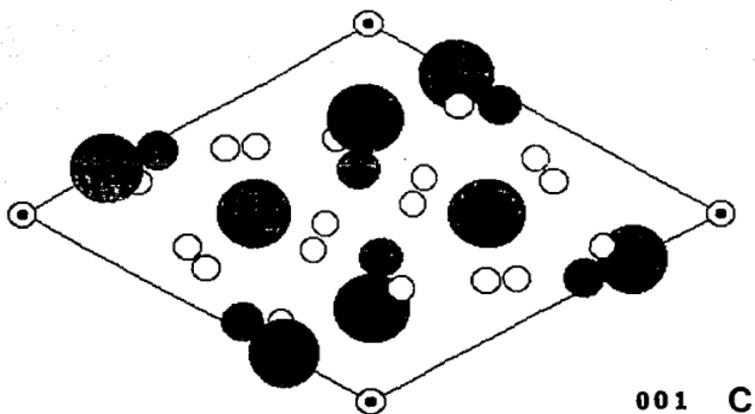


Fig III.9c y III.9d.

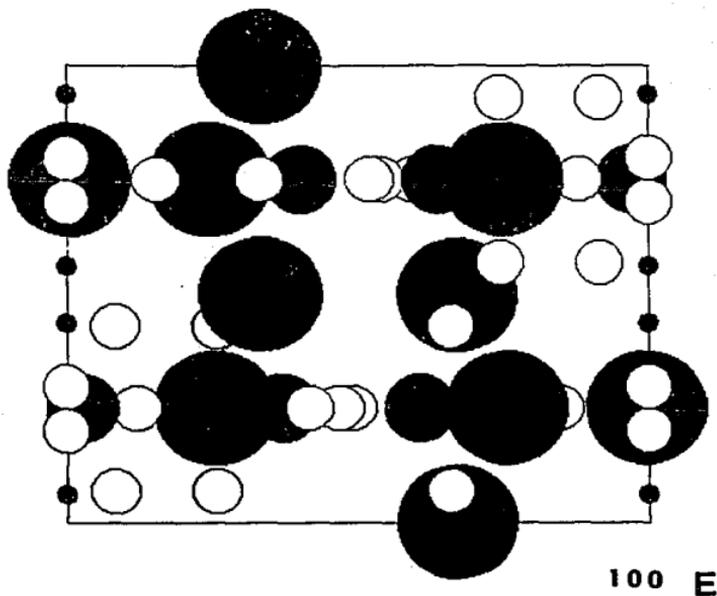


Fig III.9e.

Fig III.9. Representación esquemática de las posiciones de los átomos de Ca, P, O y H en la celda unitaria de la hidroxiapatita observados a lo largo de las direcciones [110] (a), [010] (b), [001] (c), [111] (d) y [100] (e).

CAPITULO IV

EL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE TRANSMISION

En este capitulo describiremos el diseño del microscopio electrónico así como se funcionamiento. La idea que se persigue es la de describir el equipo utilizado para la presente investigación. Puesto que el concepto de difracción es utilizado, y juega un papel importante, a todo lo largo del presente trabajo, comentaremos sus bases al final del capitulo. Las referencias generales utilizadas en este capitulo fueron 29, 35, 36.

IV.1. Conceptos generales.

Los procesos físicos en los que se basa el diseño del microscopio electrónico y sus componentes son los mismos que los del microscopio óptico compuesto: ambos están formados por lentes condensadoras, objetivas, intermedias y de cierta forma proyectoras. La diferencia radica en el sistema de iluminación, el primero usa electrones, mientras que el segundo usa luz visible. Por lo tanto las lentes en el microscopio electrónico son bobinas mientras que en el óptico son lentes de vidrios (Fig IV.1.).

Cuando el haz de electrones interacciona con la muestra en observación se producen varios tipos de fenómenos entre los que se encuentran: 1) Electrones retrodispersados y secundarios, que son los electrones que son rebotados en la superficie de la muestra, llevando información sobre ésta (Microscopia electrónica de barrido); 2) Los electrones absorbidos, que nos dan información sobre la conductividad de la muestra; 3) Los electrones Auger y rayos X característicos que nos dan información sobre la composición química de la muestra; y 4) Los electrones que atraviesan la muestra, transmitidos y difractados, son los que usa la lente objetiva para formar la imagen de la muestra o su patrón de difracción dándonos información de la estructura de la muestra (Microscopia Electrónica de Transmisión).

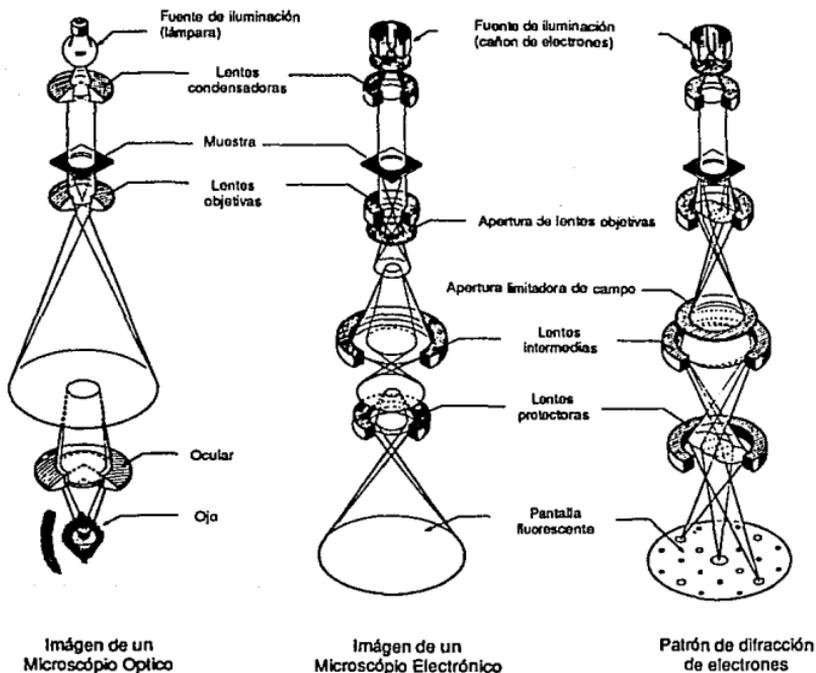


Fig IV.1. Comparación esquemática entre el microscopio electrónico y el microscopio óptico. También se muestra el recorrido que efectúa el haz de electrones al formar un patrón de difracción.

En la figura IV.1 tambien se muestra un esquema de la formaci3n de un patron de difracci3n formado en un Microscopio Electronico de Transmisi3n.

Estos tipos de se~ales determinan diferentes m3todos de an3lisis con distintas formas de detecci3n. Por lo anterior, existen Microscopios Electr3nicos de Transmisi3n y de Barrido. La diferencia fundamental en el tipo de muestra que se pueden observar con el microscopio electr3nico de transmisi3n y con el microscopio electr3nico de barrido es que en el MET la muestra debe ser tan delgada para ser atravezada por los electrones, mientras que para el otro la muestra puede tener un volumen considerable.

IV.2. Partes del microscopio electr3nico de transmisi3n.

Todos los microscopios electr3nicos se pueden considerar divididos para su estudio en tres partes:

- Sistema 3ptico.
- Sistema de vaci3o.
- Sistema el3ctrico.

El sistema 3ptico incluye: la fuente de electrones, los electrodos aceleradores, las lentes magn3ticas, las diferentes aberturas, la pantalla fluorecente y la c3mara fotogr3fica.

a) CAÑON ELECTRONICO (Fig IV.2.) En el cañon electr3nico se encuentra el filamento, el cilindro Wehnelt y el 3nodo acelerador.

i) EL FILAMENTO es la fuente de electrones y est3 constituido por un conductor en forma de "V" al que se le hace pasar una corriente con el objetivo de provocar la emisi3n de electrones por el fen3meno de termoemisi3n. Generalmente el material utilizado es el tungsteno, aunque 3ltimamente se utilizan aleaciones especiales que son m3s duraderas y con mejores caracteristicas termoemisivas.

ii) CILINDRO WEHNELT. El filamento a su vez esta rodeado por un cilindro conductor; el cilindro de control, cuyo potencial es



Fig IV.2. Columna de un Microscopio Electrónico de Transmisión y partes que lo forman.

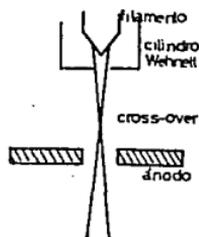


Fig IV.3. Cilindro Whenelt.

negativo con respecto al filamento. Como consecuencia de este potencial negativo, el campo electrónico alrededor del pequeño orificio de salida del cilindro de control actúa como una lente electrostática y produce una concentración de electrones (Crossover) en un punto por debajo de este cilindro de control y de un diámetro menor que el filamento (Fig IV.3.).

iii) ANODO ACELERADOR. Este electrodo está situado por debajo del punto de concentración de los electrones que salen del cilindro de control y tiene un potencial positivo de miles de Volt con respecto al filamento (de 40 a 100 kV en los microscopios más comunes y hasta de 3MV en los últimos microscopios construidos). El objetivo de este electrodo es acelerar los electrones, que a partir de este elemento continúan con la misma energía hasta interactuar con la muestra ya que todo el cuerpo del microscopio está al potencial del ánodo.

b) LENTES CONDENSADORAS Y ABERTURAS DE ILUMINACION. Las lentes condensadoras están situadas inmediatamente después del ánodo acelerador y estas son las encargadas, junto con la abertura del condensador (o abertura de iluminación), de controlar la iluminación sobre la muestra. El diámetro de la abertura del condensador varía de un instrumento a otro, pero generalmente se encuentra entre los 0,1 y los 0,5 mm pudiéndose cambiar en pasos con controles externos que posee la columna del microscopio (fig IV.4.).

c) LENTE OBJETIVA Y ABERTURA DE CONTRASTE. Inmediatamente después de las lentes condensadoras se coloca la muestra. Cuando el haz de electrones pasa a través de esta algunos electrones son dispersados. Si estos electrones dispersados llegan a la pantalla fluorescente del microscopio se vería una imagen borrosa de la muestra (sobre todo en muestras gruesas) perdiéndose los contrastes de la misma. Por esta razón se colocan inmediatamente debajo de la muestra una pequeña abertura (abertura de contraste o objetiva) para detener estos electrones dispersados. Generalmente esta abertura tienen diámetros entre 0,01 y 0,1 mm, pudiéndose seleccionar por pasos desde el exterior similarmente a la abertura

de iluminación. Esta abertura está situada en el plano focal de la lente objetiva. La lente objetiva tiene como función obtener la primera imagen ampliada de la muestra y es la que debe de ser construida con mayor perfección pues es la que determina el poder de resolución del microscopio (fig IV.5).

d) LENTES INTERMEDIA Y PROYECTORA. Estas lentes se colocan después de la lente objetiva y tienen por objeto obtener el aumento final de la muestra en la pantalla fluorescente. Estas lentes no tienen que ser de tan alta calidad como la lente objetiva ya que no tienen que aumentar imágenes tan pequeñas (fig IV.6).

e) PANTALLA FLUORECENTE. Esta pantalla está constituida por una placa recubierta de una sustancia electrón-sensible (sulfuro de Zinc) que se ilumina al interactuar con los electrones similarmente a lo que ocurre en un tubo de rayos catódicos de un osciloscopio.

f) CAMARA FOTOGRAFICA. Con el fin de examinar las imágenes obtenidas, los microscopios electrónicos poseen una o varias cámaras fotográficas. Una de estas cámaras generalmente se coloca debajo de la pantalla fluorescente. La posición de esta cámara no es crítica debido a la gran profundidad de enfoque que posee el microscopio electrónico. Para que los electrones puedan llegar a la placa fotográfica el microscopio posee un manipulador externo que permite levantar la pantalla fluorescente.

EL SISTEMA DE VACIO. Debido a que los electrones tienen poca penetración en el aire (sólo unos cm) ya que interactúan fácilmente con las moléculas del mismo produciendo otras partículas cargadas (iones) que interferirían en el movimiento de los electrones. Además, se que el filamento en presencia del oxígeno del aire se quemaría rápidamente. Por lo tanto todo el sistema óptico del microscopio electrónico descrito anteriormente debe estar sometido a un alto vacío final en la columna del microscopio. (Fig IV.7.).

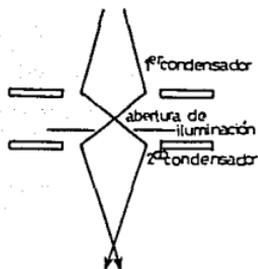


Fig IV.4. Lentes condensadoras y abertura de iluminación.

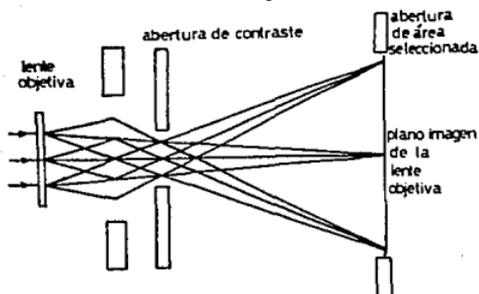


Fig IV.5. Lente objetiva y abertura de contraste.

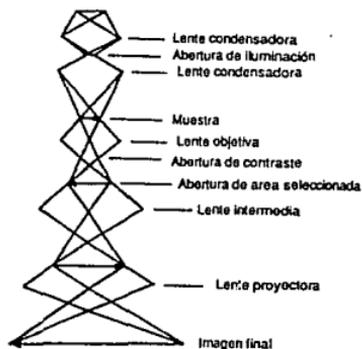


Fig IV.6. Esquema que representa el trayecto que siguen los electrones hasta llegar a formar la imagen final.

EL SISTEMA ELECTRICO lo constituyen fundamentalmente, la fuente de alto voltaje, las fuentes de corriente y los interruptores principales del microscopio se encuentran en un panel aparte de la columna del mismo. La estabilidad de la fuente de alto voltaje no debe ser menor de 10^{-5} y la de corriente en las lentes del orden de 10^{-6} para evitar la aberración cromática de las lentes. En la Fig IV.8 se muestra un microscopio electrónico de transmisión.

IV.3. Diseño y funcionamiento del microscopio electrónico de transmisión.

El cañón de electrones es la única lente electrostática que lo compone. Esta formado como ya lo mencionamos por un filamento en forma de V, generalmente de tungsteno, el cilindro de control o wenhelt y el ánodo acelerador.

El filamento es la fuente de los electrones emitidos termiónicamente, con velocidades muy semejantes entre sí, al pasar una corriente eléctrica, que eleva la temperatura, produciéndose la emisión de electrones manteniéndolo a 100 Kv con respecto al resto del microscopio. El cilindro de control que rodea al filamento tienen una diferencia de potencial negativo con respecto al filamento, provocando un campo eléctrico alrededor de un pequeño orificio de salida del cilindro. Después del ánodo acelerador se encuentra las lentes condensadoras que son las encargadas de enfocar el haz de electrones sobre la muestra.

Inmediatamente después se coloca la muestra en un hueco especial dentro del microscopio que es evacuado al alto vacío y tiene los arreglos necesarios para producir movimientos e inclinación de las muestras, así que áreas diferentes pueden ser estudiadas en orientaciones controladas con respecto al eje del microscopio. Si la muestra es cristalina, además del haz primario, la máxima interferencia se forma detrás de la muestra como resultado de la difracción del arreglo cristalino de ésta.

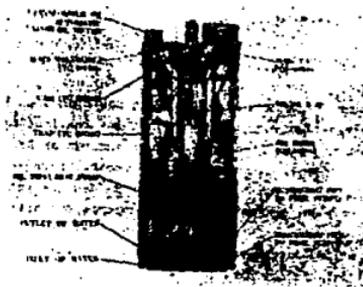


Fig IV.7. Sistema de vacio o bomba difusora.

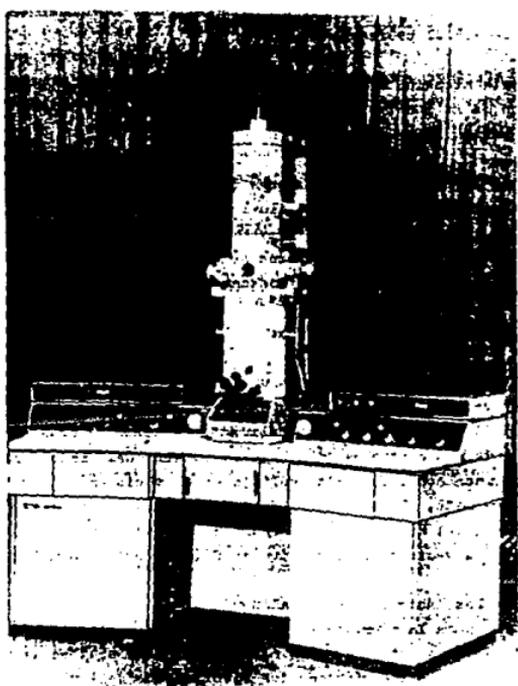


Fig IV.8. Microscopio Electrónico de Transmisión Jeol 100x

Los electrones al atravesar la muestra se difractarán, pudiendose operar el microscopio de modo que se produzca un patrón de difracción o una imagen del área iluminada por los electrones. El haz transmitido, así como los difractados se reunirán en distintos puntos sobre el plano focal detrás de la lente objetiva, formándose un patrón de difracción. Más adelante se reunirán todos los haces que provienen de un punto creándose una imagen real (Fig IV.1).

La función de las lentes objetivas es obtener la primera imagen ampliada de la muestra y es la que debe ser constituida con mayor perfección ya que ésta determina el poder de resolución del microscopio. En el plano de esa primera imagen se encuentra la abertura de área selecta para seleccionar electrones de una área particular de la muestra. Una vez que los electrones dejan la lente objetiva, puede ponerse un diafragma en el plano focal del objetivo de manera que solo se permita pasar uno de los haces enfocados allí. Si se deja el transmitido, se dice que hacemos microscopia de campo claro y si es uno de los difractados el que formará la imagen, se denomina campo oscuro. La ampliación de la imagen real formada detrás del objetivo (primera imagen intermedia) se lleva a cabo por las lentes intermedias proyectoras. Una pantalla fluorescente ó placa fotográfica se coloca en el plano imagen de la lente proyectora de manera que si existen diferencias en el número de electrones que llegan a cada punto se registran las diferencias correspondientes de la luz emitida para la pantalla. La pantalla tiene una sustancia sensible a electrones (sulfuro de zinc) que al interactuar con los electrones emite luz.

Si la lente intermedia se enfoca no en el plano de la primera imagen intermedia, sino en el plano focal de la objetiva y la abertura del objetivo se quita, entonces se obtienen una imagen del patrón de difracción formado allí. El área de la que se obtienen el patrón de difracción es la misma que la que se ve en el modo de imagen, por lo tanto para localizar dicha área con precisión se coloca un diafragma en el plano de la imagen. Este modo de operación se llama difracción de área selecta. Como los

electrones viajan dentro de la columna del microscopio, ésta debe estar libre de contaminantes, incluyendo el aire ya que los electrones pueden ionizarlo, además de que los electrones tienen poca penetración en el aire y de que el filamento se quemaría más rápidamente en presencia de oxígeno, por lo que la columna se encuentra al alto vacío de 10^{-6} mm de Hg.

El microscopio de Transmisión se puede operar:

a) para formar imágenes por campo claro, campo oscuro o modo de contraste de fases de la imagen. b) para formar patrones de difracción usando aberturas de área selecta y enfocando las lentes intermedias sobre el patrón de difracción formado detrás del plano focal de las lentes objetivas.

IV.4. Difracción de electrones.

Supongamos que un haz de electrones incide perpendicularmente sobre la superficie de la muestra y que ésta es un sólido perfectamente cristalino. Podemos visualizar el haz como ondas planas cuyo frente de onda es paralelo a la superficie de la muestra y se mueve de la misma forma que lo hace la luz monocromática cuando pasa por una rejilla.

Los patrones de difracción que consta de un arreglo de puntos luminosos (Fig IV.9) son típicos de monocristales. Esto significa sólo un cristal difracta el haz. Si el haz electrónico es bastante ancho o la muestra está formada por varios cristales pequeños orientados aleatoriamente, es decir una muestra policristalina, el patrón de difracción consistirá de anillos concéntricos cuyos diámetros corresponden al espaciado existen entre los planos atómicos del cristal (fig IV.9.).

Un patrón de difracción contiene básicamente dos tipos de información:

1) El arreglo espacial, definido en función de la simetría que presenta el patrón, de los valores de las distancias que existan entre los puntos de difracción y el punto central, y los ángulos

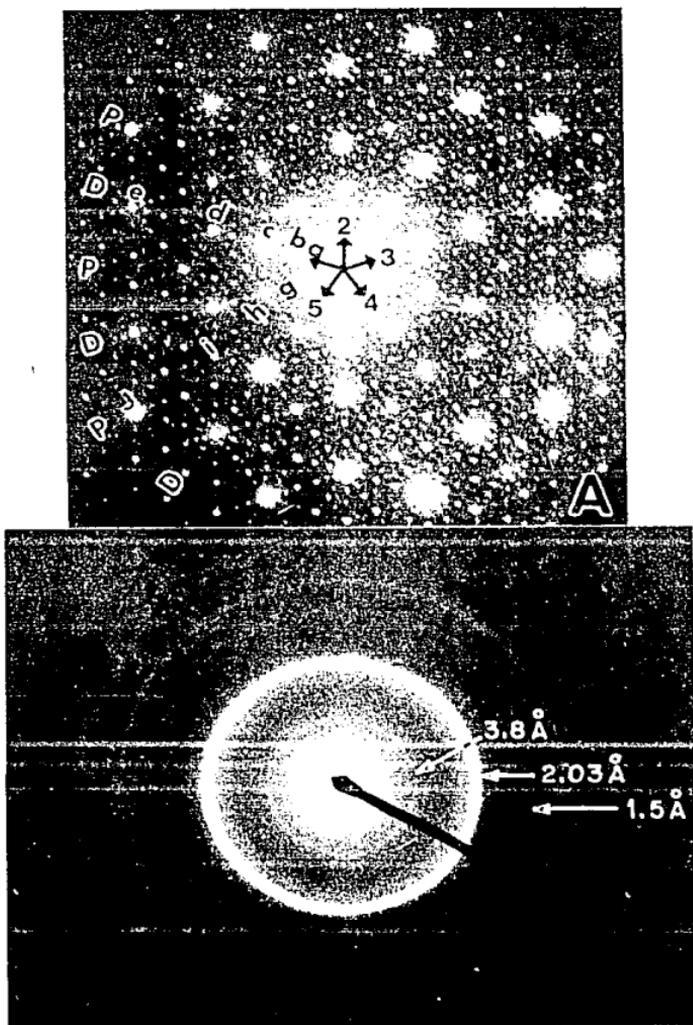


Fig IV.9. Se ilustran dos patrones de difracción en el A se ilustra un arreglo de puntos luminosos, y el B se aprecian perfectamente los anillos concéntricos.

que se forman entre las líneas que van del centro a cada uno de los puntos.

2) La cristalografía, a partir de las intensidades de los puntos. Así, al hacer una comparación entre las intensidades de diferentes puntos difractados, y diferentes patrones de difracción de la misma muestra pero en diferentes orientaciones, es posible obtener el tipo completo de la celda unitaria que presenta el cristal en estudio.

Una ecuación muy importante en difracción es la conocida como LEY DE BRAGG la cual nos dá la condición para que exista interferencia constructiva de la radiación incidente después que ha interactuado con la muestra, la ecuación es la siguiente:

$$2d \operatorname{sen}\theta = n\lambda$$

Donde d es la distancia entre los planos de la red en la dirección de incidencia y θ es el ángulo entre el haz incidente y la interferencia del cristal (Fig IV.10). Esta ecuación nos indica que la interferencia constructiva entre los rayos AC y DF se dá cuando las diferencias de caminos ópticos de la radiación dispersada por planos sucesivos es un múltiplo entero n de la longitud de onda. Esto es, el rayo DF recorre una distancia GE + EH más que el rayo AC, entonces la diferencia de caminos recorridos es de $2d \operatorname{sen}\theta$ La reflexión de Bragg sólo ocurre para longitudes de onda tales que $\lambda < 2d$. Puesto que en los sólidos cristalinos d es del orden de angstroms, esto indica la razón del porque no se puede utilizar luz visible para que ocurra difracción en cristales.

IV.4.1 Indexación de patrones de difracción.

La forma de asignar los índices de Miller (hkl) a los puntos o a los anillos de un patrón de difracción es lo que se conoce como indexación.

La obtención de un patrón de difracción en un microscopio

electrónico en primera aproximación es como se muestra en la figura IV.11. Aquí R es la distancia entre el haz más intenso del patrón es decir el haz transmitido, y un punto de difracción.

De la figura 24 tenemos:

Puesto que la ley de Bragg, con $n=1$ y para ángulos pequeños, es $2d\theta = \lambda$, y en este caso $\tan 2\theta = 2\theta$:

$$Rd = \lambda L$$

Esta ecuación relaciona distancias interplanares "d" en el cristal con distancia "R" en el patrón de difracción. La cantidad λL es llamada "constante de cámara" la cual es fácil de calcular puesto que L es generalmente dada por el instrumento. Al conocer el voltaje de aceleración λ queda fija. Por lo tanto, podemos obtener una lista de distancias interplanares del cristal y comparar sus valores con tablas de distancias para diferentes cristales (aquellas obtenidas a partir de análisis de rayos x) y encontrar el tipo de cristales que se trata.

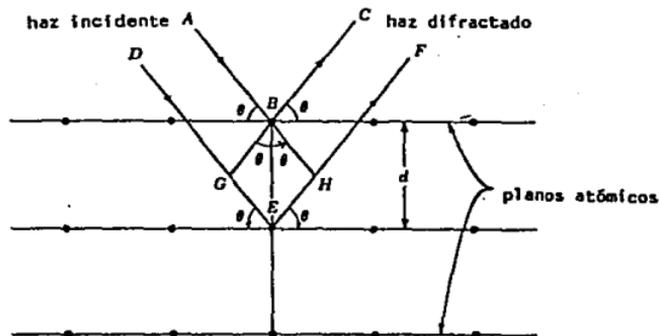


Fig IV.10. Esquema que nos permite calcular la Ley de Bragg.

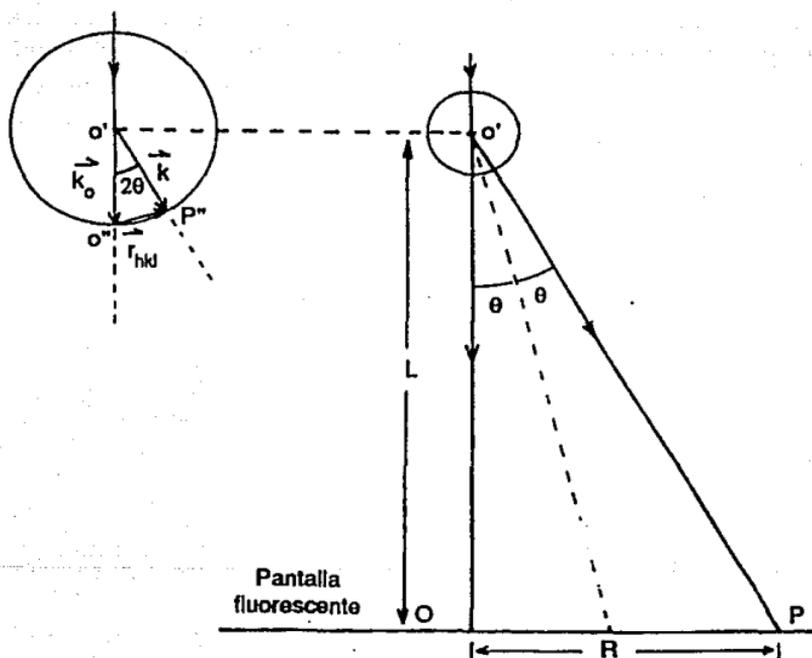


Fig IV.11. Representación esquemática de la longitud de cámara (L) y la distancia del haz transmitido a cualquiera de los puntos difractados (R).

CAPITULO V

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

V.1 Desarrollo experimental

Se utilizaron 10 premolares humanos sanos pertenecientes a pacientes de 20 años de edad, estos órganos dentarios fueron extraídos por razones quirúrgicas y ortodónticas. Dichos dientes se recolectaron en la Clínica de Cirugía Bucal de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, U.N.A.M.

Las muestras se conservaron en agua desionizada, la cual se cambiaba dos veces al día hasta el momento de realizar el experimento. Del total de los especímenes, cinco órganos dentarios se utilizaron para la obtención de muestras en forma de pastillas, estas se prepararon cortando bloques de 0.3 X 0.3 X 0.1 cm con una cortadora de disco de diamante. Las dimensiones no son arbitrarias ya que son específicas para ser observadas con el microscopio electrónico de transmisión además deben tener un espesor del orden de 50 a 100 nm. con el objeto de que los electrones puedan atravesar la muestra. Para obtener las muestras se realizaron los siguientes pasos: las pastillas se pulieron mecánicamente hasta obtener un espesor de aproximadamente 13 μm , usándose un aparato para desgaste mecánico modelo Dimpler 2000 (E.A. Fishione). Posteriormente se realizó un pulido final y una perforación en el centro de la muestra con una pulidora iónica (Ion Mill mca. Gatan Dual Ion Mill, mod. 600). Las áreas alrededor del orificio presentan los espesores deseados, ya que son tan delgados que permiten el paso de los electrones para su posterior observación al microscopio electrónico de transmisión.

Los otros cinco especímenes se utilizaron para obtener polvo de esmalte, con la técnica de separación por densidades, de acuerdo al método usado por Manly y Hodge (37). Las muestras de

polvo se dispersaron en etanol y se depositaron en una rejilla de cobre cubriendola con una película de carbon.

Los diferentes especimenes se examinaron a 100 Kv en un microscopio electrónico JEOL 100 CX, usando técnicas de campo claro y campo obscuro. También se usaron técnicas de difracción de electrones, seleccionando áreas específicas en las imagenes de los cristalitos de esmalte. Para las observaciones de ultra alta resolución, se usó un microscopio electrónico JEOL 4000 EX a 400 Kv. Las imagenes fueron procesadas computacionalmente para realzar su contraste. Para este procesamiento se utilizó un sistema INNOVION conectado a una computadora VAX 1178. La simulación computarizada de imagenes de los cristales de hidroxiapatita se efectuó por medio del programa simulador de imagenes Mc TEMPAS, el programa se corrió en una computadora Mc.Intosh mod II CX. Los patrones de difracción de rayos X se obtuvieron por medio de un Difractómetro Siemens D 500.

CAPITULO VI

RESULTADOS

Los resultados fueron más que excelentes. La técnica de preparación empleada para los dientes fué crucial para este éxito. La obtención de estos resultados fue por medio de las técnicas de microscopía electrónica.

VI.1. Microscopía electrónica convencional.

Las observaciones de las muestras preparadas en pastilla, muestran la presencia de cristales alargados en las imágenes de campo claro y campo oscuro (Fig VI.1a y 1b). En la figura VI.2, se muestra la imagen de campo claro, donde se pueden observar el tamaño y distribución de los cristales en el esmalte. El tamaño promedio es de 100 nm. Aquí es posible reconocer la presencia de la línea oscura a lo largo de los cristalitas (algunas de ellas han sido indicadas por medio de flechas). Debemos de notar que ésta no se observa en todos ellos. En la figura VI.3, se muestra la imagen de los cristalitas en resolución de red, es decir el rayado representa planos atómicos de la estructura de los cristalitas de esmalte, donde la línea oscura se observa con más detalle. El rayado en este caso representa los planos (100) de la hidroxiapatita. En las figuras VI.4a y 4b muestran las imágenes fuera de foco (fig VI.4a) y en foco (fig VI.4b) de uno de los cristales. Como puede observarse, la línea oscura se contrasta bastante bien en las imágenes fuera de foco y desaparece cuando se encuentran en foco.

La muestra de polvo también mostró que los cristalitas del esmalte tienen una forma alargada. La figura VI.5 muestra la imagen de campo claro y campo oscuro en este tipo de muestra. La figura VI.5a. muestra claramente uno de estos cristalitas que difícilmente observaríamos en la imagen de campo claro. Debemos de hacer notar en este caso que la presencia de material inorgánico

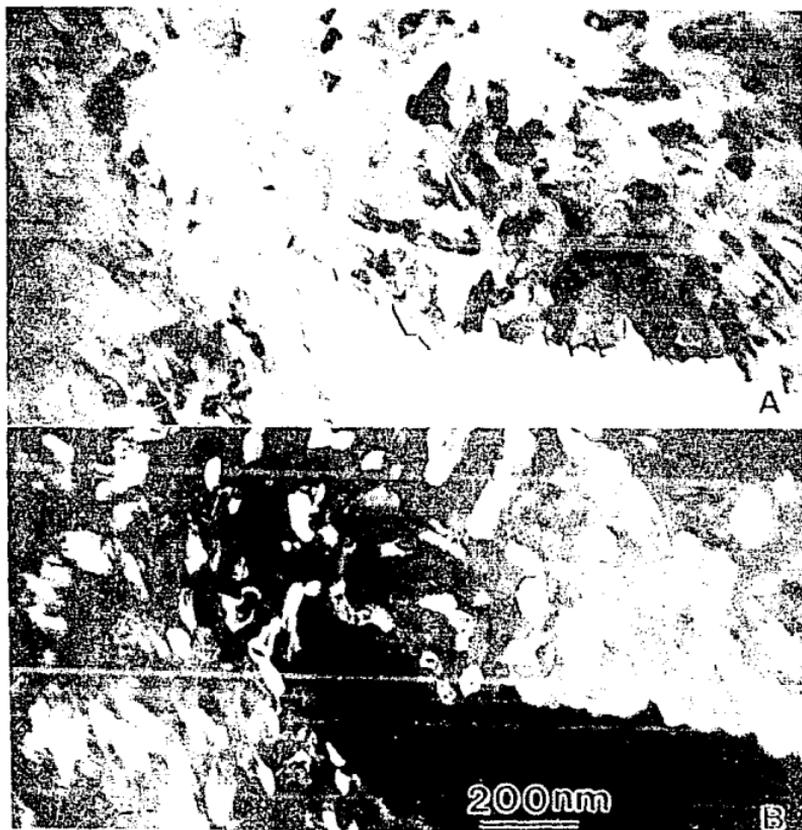


Fig VI.1. Imágenes de campo claro (a) y campo oscuro (b) de la muestra preparada en pastilla de la zona del esmalte. Las flechas indican algunas de las líneas oscuras observadas en los cristalitas del esmalte.



Fig VI.2. Imagen de campo claro de los cristales del esmalte. Note el tamaño de estos cristales. Las flechas indican algunas de las líneas oscuras observadas.

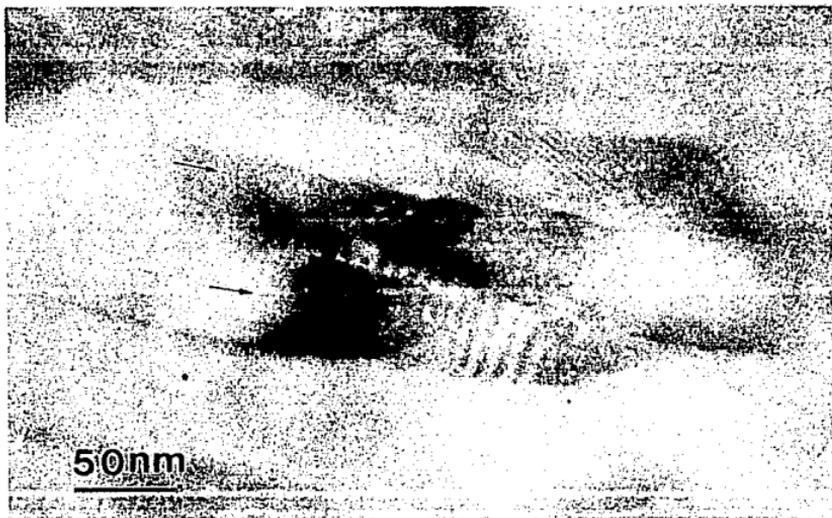


Fig VI.3. Imágen en resolución de red de los cristalitas del esmalte. El rayado muestra los planos (100) de la hidroxiapatita. La línea oscura es fácilmente observable.



Fig VI.4. Imágenes de resolución de red a diferentes desenfoques. La línea oscura se observa con detalle cuando la imagen se encuentra fuera de foco (a) y desaparece en foco (b). El rayado representa los planos (100) de la hidroxiapatita.

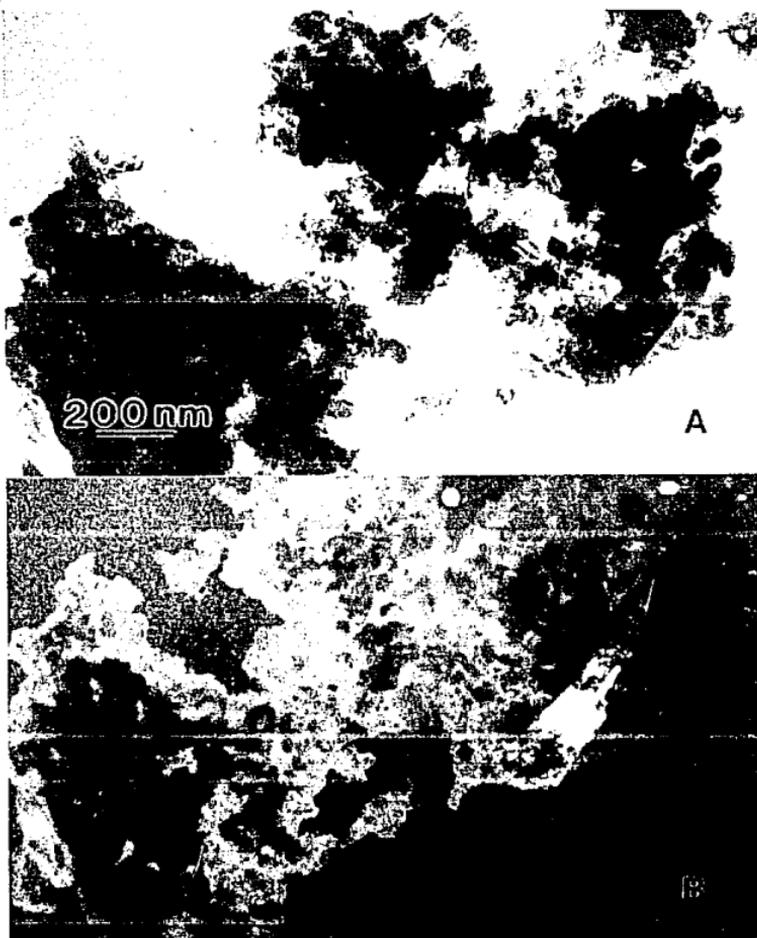


Fig VI.5. Imagenes de campo claro (a) y campo oscuro (b) de la muestra del esmalte preparada en polvo. Notese que en la imagen de campo oscuro las dimensiones de un cristalito del esmalte son fácilmente resueltas.

es mayor, siendo altamente probable que se deba al método de preparación que se utilizó.

Los patrones de difracción de área selecta obtenidos del área mostrada en la figura VI.2. presentan serie de arcos concéntricos (fig VI.6a). Estos arcos indican la presencia de cristales con una orientación preferencial. En este tipo de patrones de difracción, cuando la muestra se inclina en su eje a lo largo del diámetro paralelo al eje de inclinación, los arcos coinciden con el patrón del anillo original, mientras que a lo largo del diámetro perpendicular, los anillos originales desaparecen y aparecen otros nuevos, ya que la inclinación provoca que la esfera de reflexión corte los planos de los círculos de capas de mayor orden. Cuando se toman los patrones de microdifracción (provenientes de una área de aproximadamente 10nm) de cada uno de estos cristales, se obtiene un patrón monocristalino (fig.VI.6b - 6d). Estos patrones de difracción muestran los ejes de zona [010], [016] y [011] del cristal de hidroxiapatita. En el caso de la muestra en polvo, la difracción de área selecta fué suficiente para mostrar que los cristalitas del esmalte presentan los patrones de difracción del cristal de hidroxiapatita. Esto se muestra en la figura VI.36 en la cual el cristalito del recuadro (fig VI 7a) originó el patrón [010] de la hidroxiapatita (fig VI.7b).

El análisis de difracción de rayos X (fig VI.8), demuestra que la estructura del esmalte está formada en su mayor proporción por hidroxiapatita.

Resumiendo los resultados en esta sección tenemos que los cristales del esmalte humano son altamente anisotrópicos con uno de los ejes, el eje c, siendo el eje preferencial. También demuestran que estos cristalitas presentan la estructura de la hidroxiapatita.

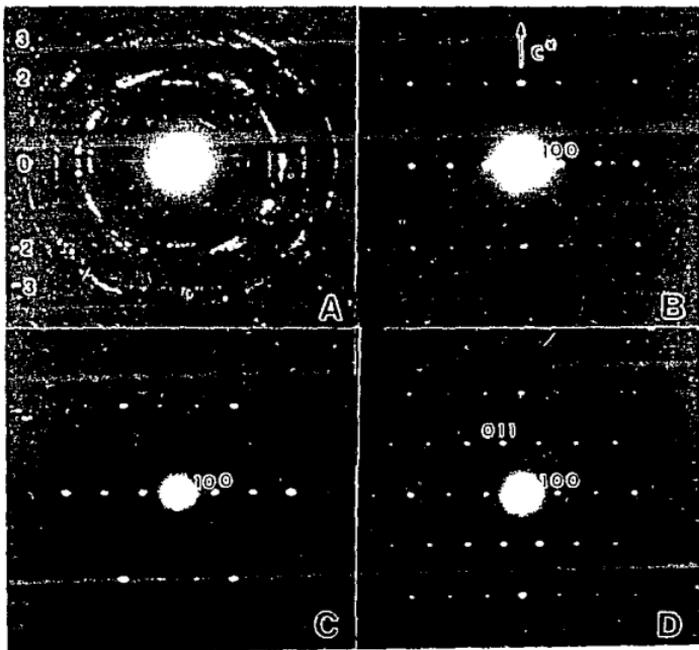


Fig VI.6. Patrones de difracción de los cristales del esmalte. En (a) el patron de difracción de area selecta es mostrado. (b) muestra el patron de difracción de un solo cristalito en la dirección $[010]$, (c) en la dirección $[016]$, y (d) en la dirección $[011]$. Las direcciones concuerdan con la estructura de la hidroxiapatita.

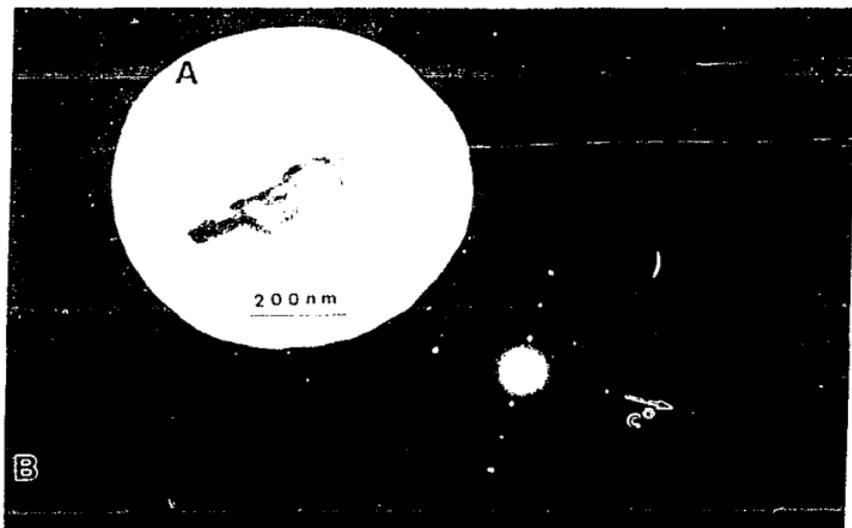


Fig VI.7. El recuadro (a) muestra el cristalito del esmalte del cual se obtuvo el patron de difracción mostrado en (b). El patron de difracción en la dirección $[010]$.

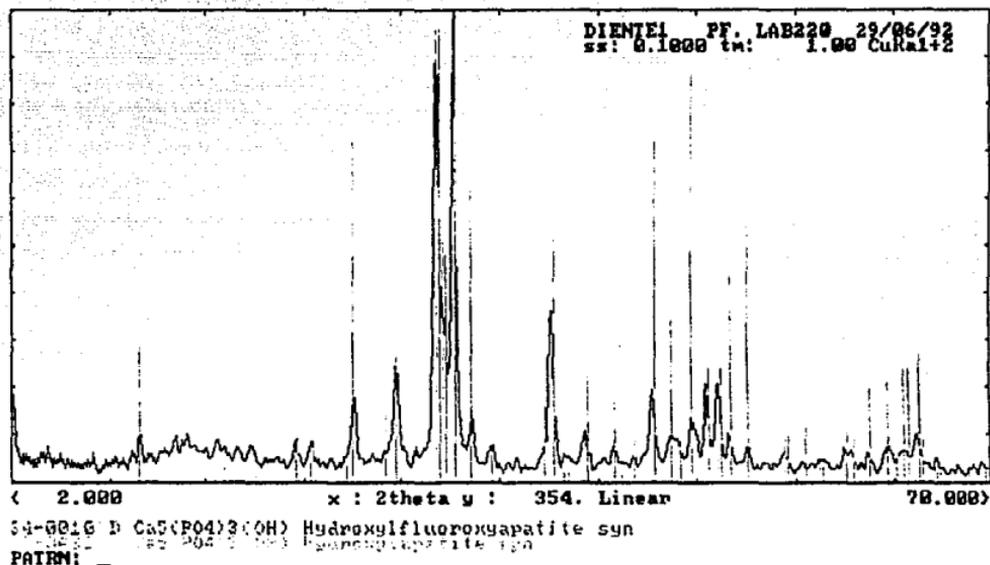


Fig VI.8. Difractograma de rayos X de los cristalitas del esmalte.

VI.2 Microscopia electrónica de alta resolución.

Las imágenes de alta resolución de los cristales de esmalte muestran características muy interesantes (fig VI.9.). Primeramente debemos de notar que entre estos cristales existe material amorfo (marcado A en la figura VI.9.), seguramente material orgánico. La figura VI.10, muestra una imagen típica de alta resolución del esmalte, y cuyo análisis demuestra que corresponde a la dirección [010] de la estructura de la hidroxiapatita. La figura VI.11, muestra el contraste de la línea oscura en alta resolución, ésta es más fácil de observar si se mira la fotografía en incidencia rasante a la superficie de la figura.

Otros cristallitos mostraron otros tipos de defectos muy diferentes a la línea oscura (fig VI.12.). Estos defectos podrían clasificarse como fallas de apilamiento.

Las imágenes de alta resolución nos permiten, en resumen, observar los defectos existentes a nivel atómico, sin embargo su interpretación es no fácil. Las imágenes aquí pueden ser solamente interpretadas en términos de la estructura de la muestra por simulaciones computacionales de imágenes y una cuidadosa comparación entre estas imágenes y las experimentales.

VI.3. Procesamiento digital de imágenes

Con el propósito de mejorar el contraste observado en las imágenes de alta resolución de los cristallitos del esmalte, y principalmente estudiar las características de la línea oscura presente en éstos, se procesaron digitalmente varias imágenes.

Esto nos permitiría, entre otras cosas, realzar el contraste deseado y estudiar por medio del análisis de Fourier las características de las imágenes. En la figura VI.13, se muestran

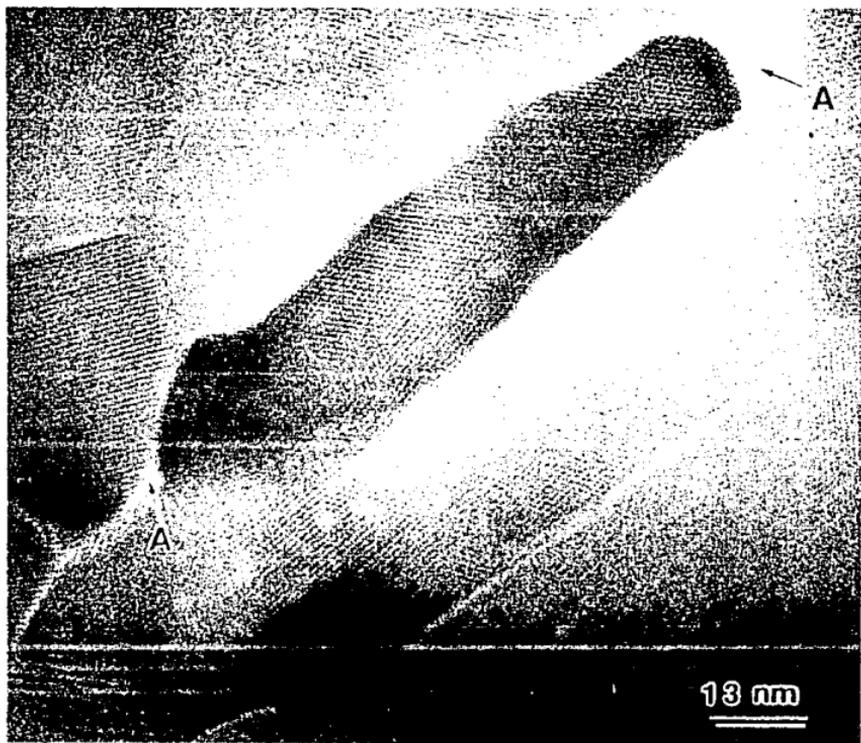


Fig VI.9. Imágen de alta resolución del esmalte donde se muestran los cristalitas en la dirección [001]. La letra A indica la región del material amorfo.

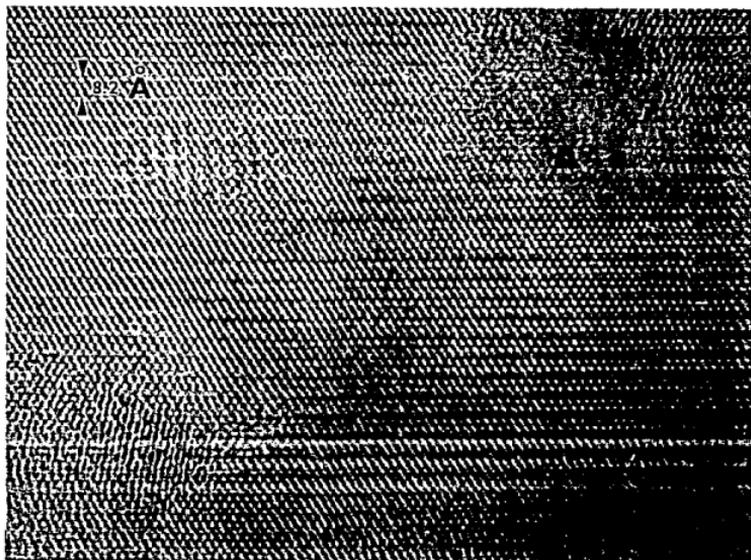


Fig VI.10. Imágen de alta resolución de un cristalito del esmalte en la dirección [010].



Fig VI.11. Imágen de alta resolución del cristalito del esmalte en la dirección [001]. La línea oscura se observa claramente.

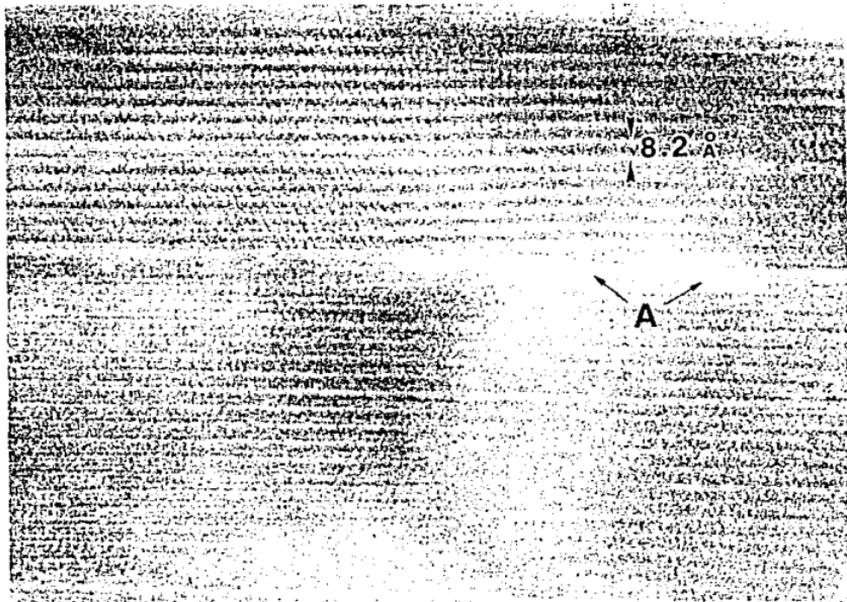


Fig VI.12. Imágen de alta resolución del cristalito del esmalte en la dirección $[010]$. En este caso la línea que se muestra no presenta el mismo contraste que el mostrado por la línea oscura. La letra A indica las regiones de material amorfo.

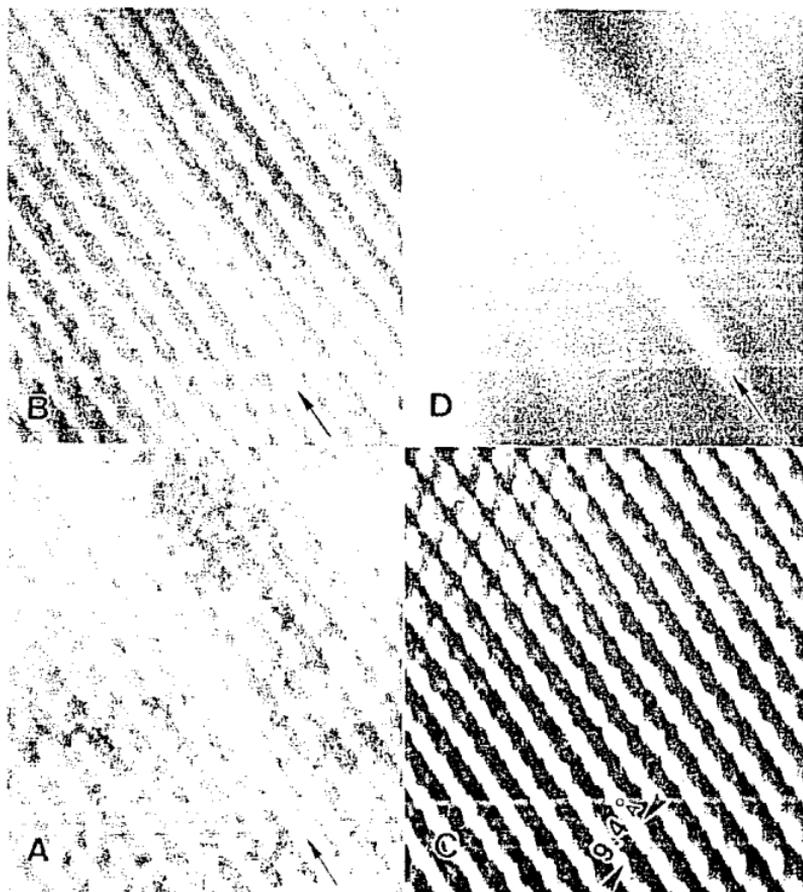


Fig VI.13. (a) Imagen original del cristalito del esmalte en donde se encuentra una línea oscura (indicada por la flecha). (b) imagen procesada digitalmente y en la cual todas las señales de la transformada de Fourier pasaron a través del filtro. (c) imagen procesada en donde solo las reflexiones que forman el hexágono en la transformada de Fourier pasaron a través del filtro. (d) imagen procesada en donde solo la línea difusa de la transformada de Fourier (marcada con cabezas de flecha en la fig.14) pasa a través del filtro.

las imágenes procesadas de la zona de la línea oscura tomada de la figura VI.11. La figura VI.13a muestra la imagen sin procesar a partir de la cual se obtuvo el patrón de difracción (espectro de Fourier) mostrado en la figura VI.14. Este patrón de difracción muestra aspectos muy importantes. Uno de ellos es la línea diagonal difusa presente (señalada con las cabezas de flecha en la figura). Otro es el desdoblamiento de dos de los puntos que forman el hexágono (señalado por medio de flechas completas en la figura VI.14) estas características son muy importantes puesto que nos dan información sobre la línea oscura. De esta forma la figura VI.13b muestra la imagen procesada cuando todos los puntos y la línea difusa que forma el patrón de difracción se les permite formar la imagen. Esto quiere decir que el filtro usado permitió el paso de todas las señales del patrón de difracción. En este caso la imagen presenta la línea oscura realzada. Sin embargo cuando solo se permite el paso de los puntos del patrón de difracción exceptuando la línea difusa la figura VI.13c es obtenida. En este caso la imagen presenta un cristal perfectamente periódico, es decir la línea oscura ha desaparecido. En el caso contrario, es decir cuando solo se permite el paso a la línea difusa del patrón de difracción la figura VI.13d se obtiene, ahora se presenta solamente la imagen de la línea sobre un fondo difuso.

Otro tipo de información que se puede obtener por medio del procesamiento digital de imágenes es la periodicidad que presentan las imágenes a lo largo de direcciones dadas. Es decir podemos obtener gráficas de intensidades contra posición en cualquier dirección. A este proceso se le llama "trazas". Con la idea de analizar la periodicidad mostrada por los cristalitos de esmalte al rededor de la línea oscura, varias trazas fueron obtenidas. De esta forma cualquier irregularidad en la periodicidad del cristal será fácilmente observada.

La figura VI.15, muestra las direcciones en las cuales las periodicidades fueron analizadas, éstas fueron llamadas x, y, y z, siendo z a lo largo de la línea oscura. La figura VI.16 a, c y e

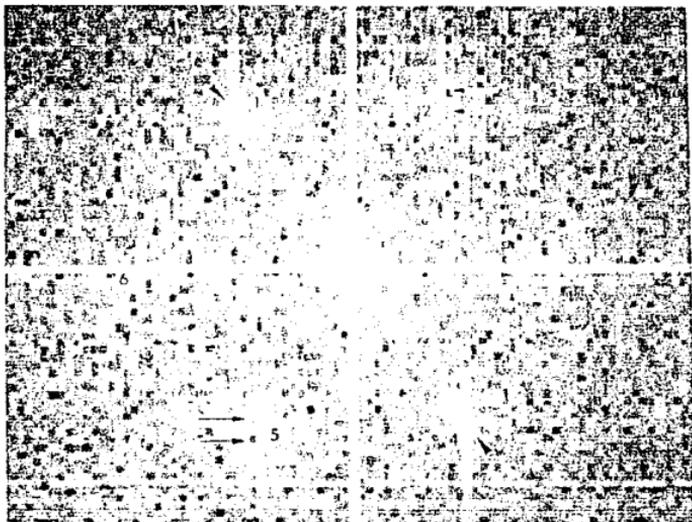


Fig VI.14. Transformada de Fourier de la imagen procesada mostrada en la figura 13. Notese la forma hexagonal que presenta en donde los puntos marcados con los numeros 2 y 5 presentan desdoblamiento (marcado con las flechas completas). La linea obscura tambien produce la linea difusa que se encuentra entre los puntos 1 y 4 (marcada con las cabezas de flecha).

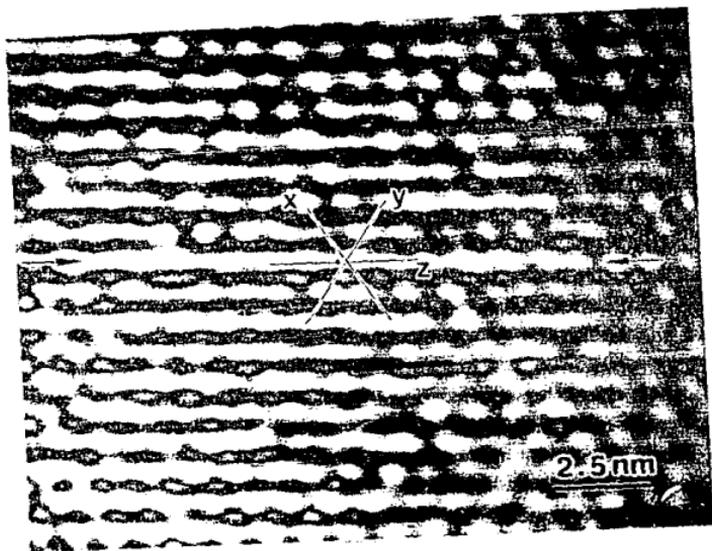
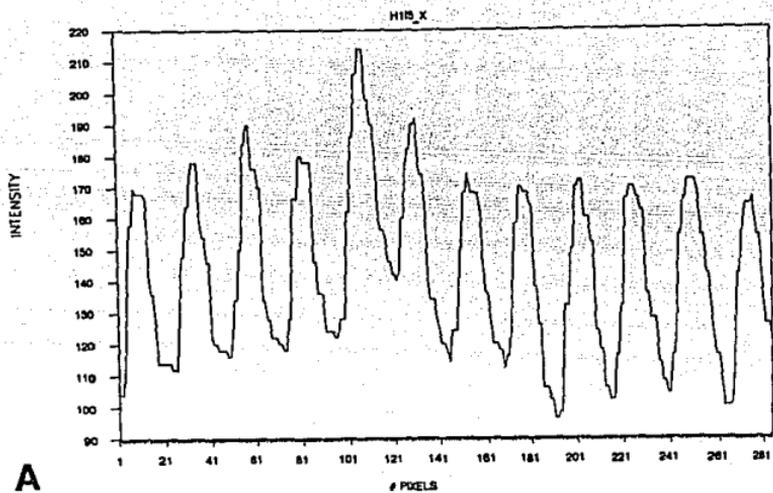
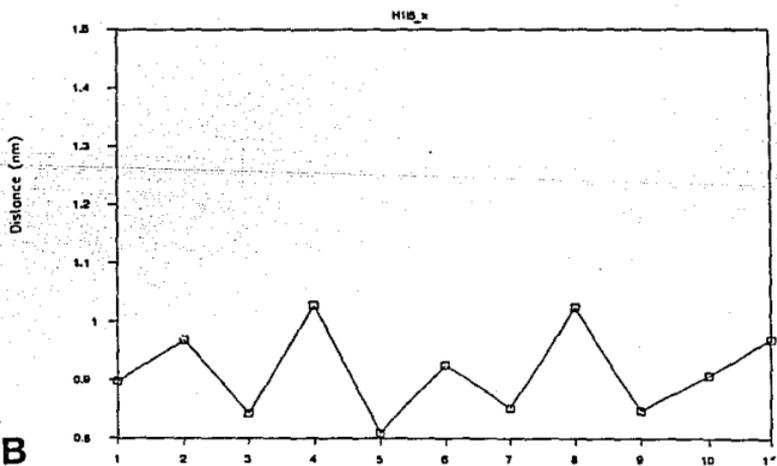


Fig VI.15. Imagen de alta resolución del cristalito de esmalte en la dirección [001] en donde la línea negra esta presente (marcada por medio de flechas). Las direcciones X, Y, y Z en las cuales las trazas mostradas en la figura 16 fueron tomadas se muestran en esta figura.

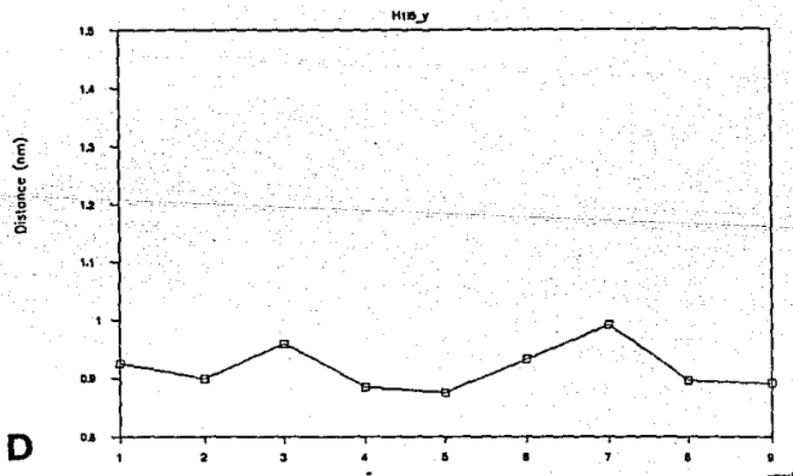
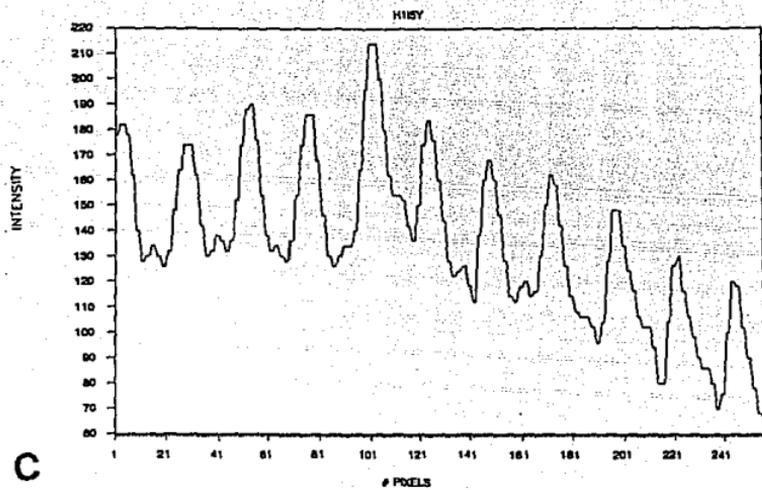
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

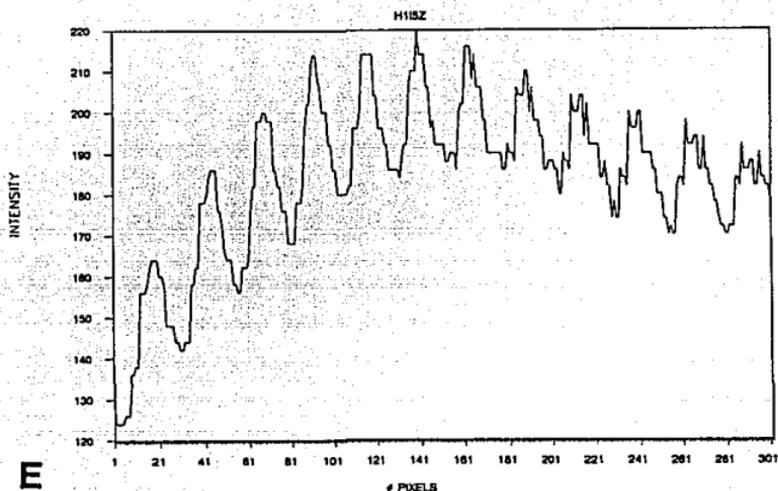


A

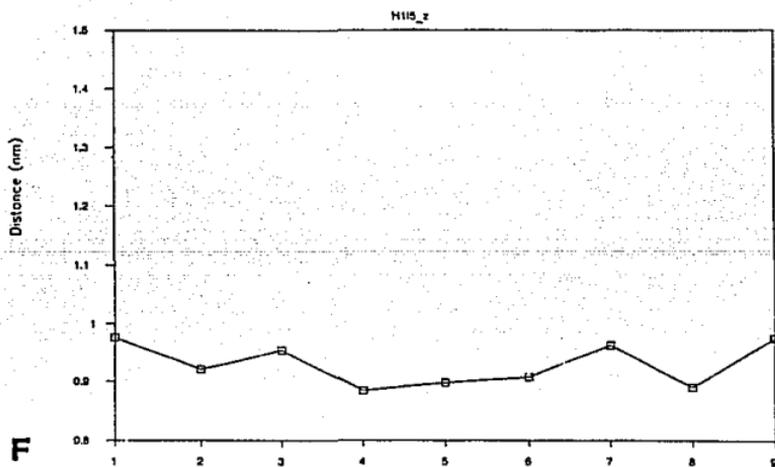


B





m



n

Fig VI.16. Graficas de las trazas tomadas en las direcciones X, Y y Z mostradas en la figura 15. Las graficas (a), (c) y (e) muestran las periodicidades presentes en estas direcciones. Las graficas (b), (d) y (f) presentan las variaciones en distancia de estas periodicidades. (a y b) la dirección X, (c y d) la dirección Y, y (e y f) la dirección Z.

muestran las trazas obtenidas. Como puede observarse, variaciones en la periodicidad están presentes en las direcciones x y y, es decir en las direcciones que atraviesan la línea oscura. En las figuras VI.16 b, d y f se ha graficado la distancia presentada por la periodicidad con respecto a la posición de los picos en las graficas mostradas en las figuras VI.16 a, c y e. Como puede verse en estas graficas las variaciones son considerables en todas las graficas. Sin embargo facilmente observamos que la distancia se incrementa notablemente al atravesar la línea oscura como lo muestran las graficas en x y y. A lo largo de la línea oscura la distancia también varia.

Resumiendo, los resultados de esta sección nos permitió conocer que el espectro de Fourier del cristal con la línea oscura presenta una línea difusa que es exactamente la señal producida por la línea oscura. Los perfiles de la traza nos muestra que la línea oscura tiene un espaciado atómico ligeramente diferente al de la estructura de la hidroxiapatita. Según estos resultados, la línea oscura presenta un aumento en la celda unitaria de la hidroxiapatita.

VI.4. Simulación de imágenes

En las figuras III.16a y III.16c se observan la celda unitaria en las direcciones [110] y [001] y las cuales fueron simuladas con el programa Mc TEMPAS tomando como base la composición química relativa de la hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ a partir de los datos de Young y Elliott().

Una vez generada la celda unitaria de cualquier material es muy facil obtener el patrón de difracción de ésta en cualquier dirección. La figura VI.17 muestra los patrones de difracción obtenidos a partir de la celda unitaria de la hidroxiapatita en las direcciones [001] (fig VI.17a), [010] (fig VI.17b) y [011] (fig VI.17c). Comparando las dimensiones y las simetrias mostradas con los patrones de difracción experimentales mostrados en la

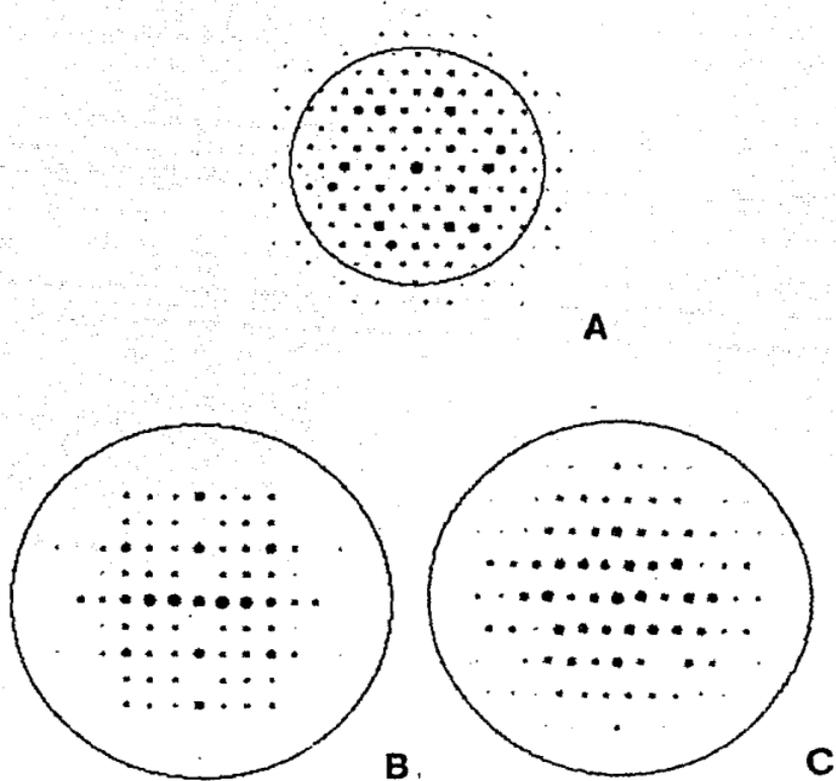


Fig VI.17. Patrones de difracción de la hidroxiapatita obtenidos a partir de la simulación de imágenes. (a) en la dirección [001], (b) en la dirección [010], (c) en la dirección [011].

figura VI.6 son iguales. Por lo tanto la estructura de la hidroxiapatita sera la que utilicemos para analizar los resultados experimentales.

La figura VI.18 y 19 muestran las imágenes de los cristalititos del esmalte en las direcciones [001] y [010] respectivamente. Los recuadros en estas figuras muestran las imágenes simuladas para estos cristales con las condiciones de las imágenes experimentales. Como puede notarse los contrastes simulados concuerdan muy bien con los experimentales.

Una de las ventajas de la simulación de imagenes, siempre y cuando se trabaje con la celda unitaria correcta, es que las posiciones de los átomos son obtenidas facilmente. De esta manera la interpretacion y las posiciones de los átomos en las imágenes experimentales se facilitan notablemente. De la misma forma, en nuestro caso si contamos con la imagen simulada cuyo contraste reproduce el de la imagen experimental la posicion de los átomos se da directamente. En las figuras VI.20 y 21 se muestran las imágenes mostradas en los recuadros de las figuras VI.18 y 19 pero en este caso los atomos son mostrados.

En resumen, la simulación de imágenes demostraron que los cristalititos del esmalte son cristales con la estructura de la hidroxiapatita.

VI.5. Daño en los cristales del esmalte producido por el haz electrónico

Despues de un tiempo de observación continuo el haz electrónico produce daño apreciable en los cristalititos del esmalte (Fig VI.22). Dos tipos de daños son fácilmente detectados: primeramente ocurre un tipo de sublimación del material sin un daño visible en los planos atómicos los cuales siguen presentando las mismas características que en el material sin daño. Despues de un tiempo más largo de radiación electrónica amorfización local de

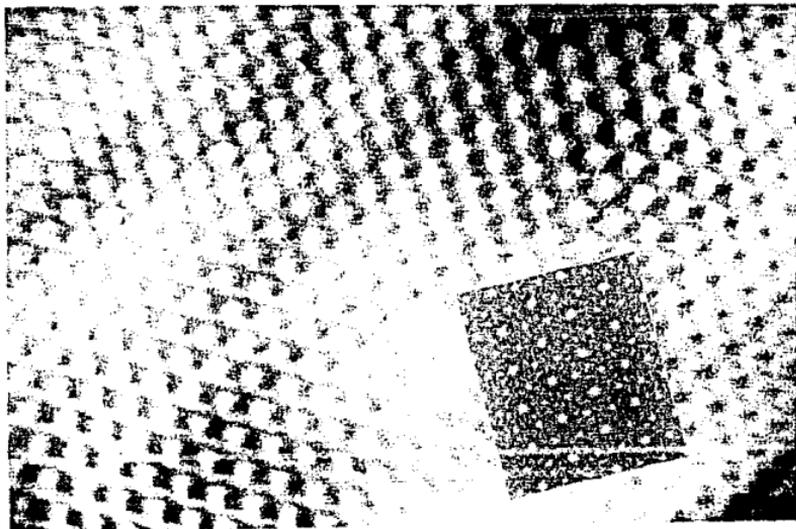


Fig VI.18. Imagen de alta resolución en la dirección [001]. El recuadro muestra la imagen de la hidroxiapatita simulada computacionalmente en esta dirección.

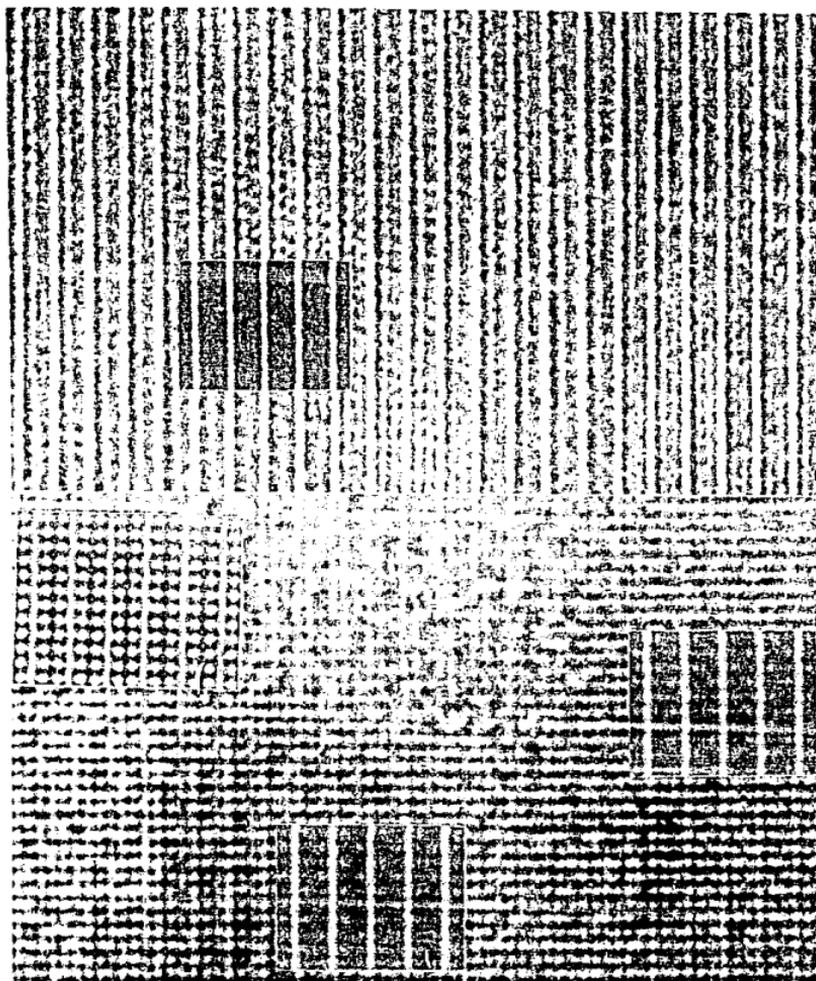
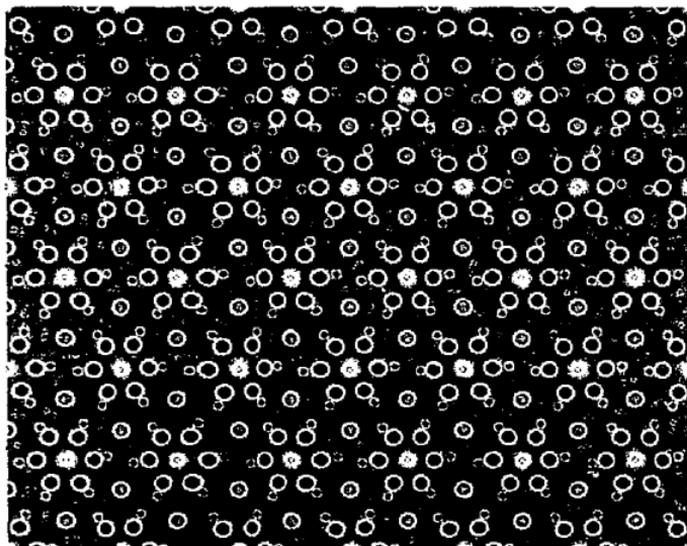
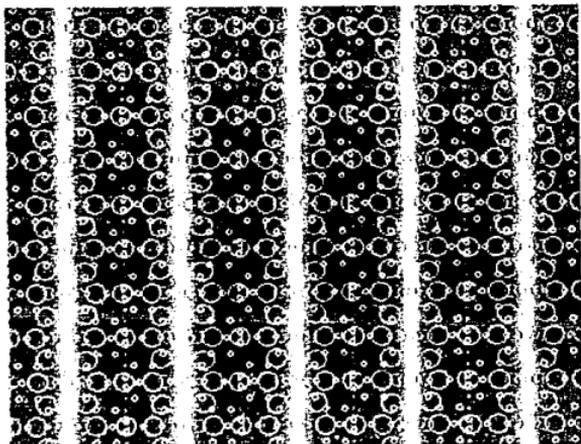


Fig VI.19. Imagen de alta resolución en la dirección $[010]$. El recuadro muestra la imagen de la hidroxiapatita simulada computacionalmente en esta dirección.

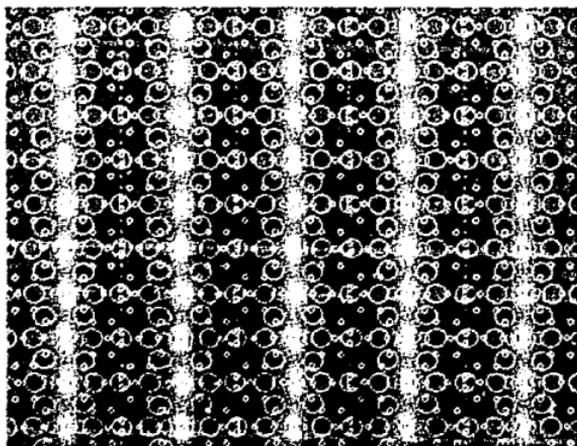


Hydroxylapatite $Z=001$ $V=1200$ $W=303A$ $D=1200A$ $Cs=1.0mm$ $DEL=$
 $455A$ $OLV=0.6mm$ $R=0.99$

Fig VI.20. Imagen simulada computacionalmente en la dirección [001] mostrando las posiciones de los átomos de la hidroxiapatita en esta dirección.



hydroxyapatite Z=010 V= 400KEV T= 402A Df= 1100A Cs= 1.0mm DEL=405A DIY=0.6mr R=0.99



hydroxyapatite Z=010 V= 400KEV T= 300A Df= 1300A Cs= 1.0mm DEL=405A DIY=0.6mr P=0.99

Fig VI.21. Imágen simulada computacionalmente en la dirección [010] mostrando las posiciones de los átomos de la hidroxiapatita en esta dirección.

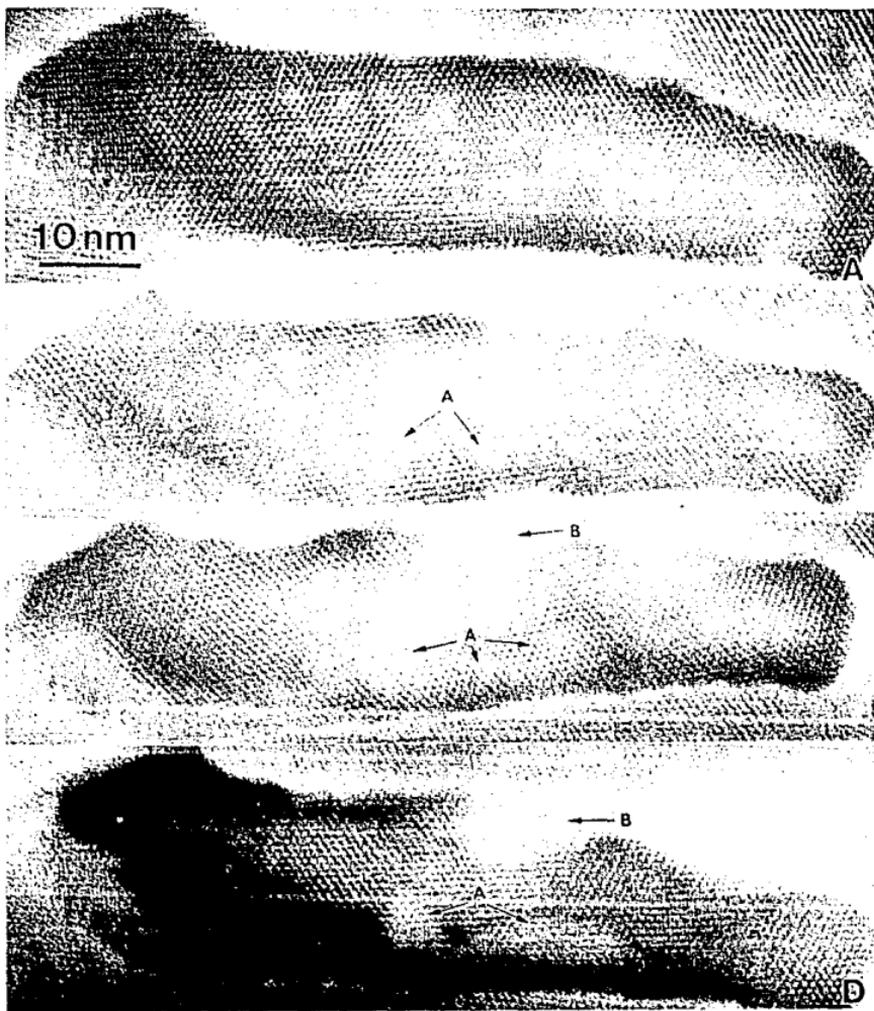


Fig VI.22. Secuencia de imágenes mostrando el daño producido en los cristales del esmalte por el haz electrónico. Se muestran dos tipos de daños: El daño señalado por A en el cual la estructura del cristal sigue observándose, y el daño señalado por B en el cual el proceso de amorfización se presenta. En el daño tipo B la estructura del cristal desaparece completamente.

los cristales del esmalte es presente. En este caso los cristales del esmalte son altamente dañados y los planos atómicos se dejan de observar.

Este proceso es un claro ejemplo de amorfización inducida por el haz electrónico. En general cuando un haz electrónico o un haz iónico de alta energía pasa a través de una muestra este pierde su energía principalmente a través de interacciones electrónicas (produciendo ionización) e interacciones nucleares (colisiones elásticas) con los átomos de la muestra. El daño producido en el primer caso es conocido como "radiolítico" y en el segundo caso como "golpe directo" (knock-on).

En el daño por "golpe directo" el átomo es "golpeado" en su posición atómica obligándolo a dejar la estructura. Algunas veces recibe suficiente energía tal que puede desplazar otros átomos, creando un efecto de cascada. Generalmente el daño por golpe directo no ocurre cuando se usan voltajes menores a 300 KV. Sin embargo para elementos ligeros este tipo de daño puede observarse a voltajes menores de 200 KV.

En el caso del daño radiolítico el incremento en energía transmitida a los electrones de los átomos de la muestra resulta en rompimientos de enlaces atómicos y consecuentemente en la posible relajación de la estructura de la muestra. Sin embargo los efectos de ionización decrecen significativamente cuando se incrementa el voltaje de aceleración por arriba de los 100 KV después del cual disminuye considerablemente. Por lo tanto, cuando un material presenta un proceso radiolítico, el proceso de golpeo directo es insignificante y viceversa. Consideramos que en nuestro caso tenemos ambos tipos de daño y sería muy interesante conocer cual átomo deja primero la red de la hidroxiapatita.

Consideramos que el daño mostrado en los cristales del esmalte es un resultado de daño de "golpe directo". En este caso los átomos fácilmente desplazables serían los hidrógenos o los

iones hidroxilos de la estructura de la hidroxiapatita. Esto se basa en el hecho de que en la hidroxiapatita los iones OH pueden formar radicales oxígeno e hidrógeno despues de la radiacion electronica y eventualmente formar CaO como producto de descomposicion final.

También es bien conocido que materiales que contienen grupos H₂O incorporados a su estructura tienden a ser más sensitivos al haz electrónico que los materiales que no los presentan. Por ejemplo el fosfato octacalcico es más sensitivo al haz electrónico que la hidroxiapatita. Lo anterior podria explicar, en el caso que la línea obscura este compuesta de fosfato octacalcico, la línea obscura desaparesca despues de un tiempo de exposicion al haz electrónico relativamente corto, tal y como se observa en la figura VI.22.

CAPITULO VII

DISCUSION

VII.1. La línea oscura.

Las observaciones realizadas de la línea oscura concuerdan con los hallazgos de Ronnholm, Nylén y Frazier (22,23,24), estos autores reportaron que la línea oscura se observa en conjunto con las franjas de la red (100) de la hidroxiapatita cuando se esta fuera de foco y cuando se esta en foco desaparece. El término "línea oscura" es, por lo tanto, inadecuado puesto que el contraste de este defecto lineal depende fuertemente del desenfoque al momento de ser observado. Esta línea oscura ha sido interpretada como un defecto planar el cual puede terminar tanto dentro como fuera del cristalito del esmalte. Sin embargo las imágenes de alta resolución muestran que las líneas interatómicas son altamente coherentes y continuas cuando atraviesan de un lado a otro el defecto, es decir las líneas no son desplazadas o dobladas a través del defecto. La ausencia de algun contraste conocido en las imágenes de microscopia electrónica del defecto indica que éste no es una falla de apilamiento, una frontera de antifase o una frontera de gemelacion (twin). Aunque varios autores han reportado la observacion de dislocaciones asociadas a este defecto, nuestras observaciones no mostraron dichos contrastes. Además el plano (100) no es un plano de gemelación para una estructura hexagonal. El hecho de que el defecto planar algunas veces termine dentro del cristal indica que éste no puede ser una frontera que separe cristales que tengan una relación de gemelación entre ellos. Como ya se ha comentado, esta línea es de particular interés debido a que es probable que ahí es donde se inicia la disolución en los primeros estadios de la caries. Por lo tanto, el conocimiento sobre el tipo de defecto que representa es primordial para conocer el papel que juega durante este proceso.

El defecto central y la disolución preferencial del centro

cristalino ha sido atribuido a la composición preferencial entre el centro y el resto del cristal. Parte de esta diferencia podría deberse a la presencia de un mineral rico en CO_3 o a una estructura de multicapas de OCP/HA. Una alternativa en la explicación del origen del defecto es que el crecimiento inicial del cristal es relativamente rápido tal que las imperfecciones no son diluidas y poco después se presenta un crecimiento lento lo cual permite la obtención de un cristal perfecto. Durante el proceso de crecimiento rápido, grandes cantidades de iones "impureza" (por ejemplo CO_3^{2-} y Mg^{2+}) son incorporados en el centro del cristal. Investigaciones del esmalte del tiburón (rico en F y pobre en CO_3) en comparación del esmalte humano (pobre en F y rico en CO_3) han mostrado similar abundancia de cristales con la línea oscura central, esto indica que la presencia de F o de CO_3 no es un factor dominante para su presencia.

Como se ha comentado anteriormente, es altamente probable que este defecto represente una variación local en la composición química de la estructura, por ejemplo una sustitución de otros tipos de átomos en la red cristalina (21). Esto necesariamente involucra a los elementos que normalmente aparecen en el esmalte, siempre y cuando estos componentes se presenten en cantidad suficiente para causar tal efecto. Veamos algunos de los efectos producidos en la hidroxiapatita por los tipos de sustituciones que se pueden presentar.

VII.2. Posibles sustituciones en la estructura de la hidroxiapatita. (21)

Algunos elementos que ocurren en concentraciones de 0.01-7.0 wt.% (referidos como elementos minoritarios), como son el CO_3 , Cl, F, Mg, y Na están asociados con las apatitas biológicas del esmalte, dentina, cemento y hueso. Otros elementos cuya ocurrencia en concentración se da en partes por millón son referidos como elementos traza. Además de estar asociados con el mineral dentario, estos elementos minoritarios y de traza están también

presentes en el agua para beber y comida y han sido descritos con propiedades promotoras de caries o inhibidoras de caries. Estos elementos han sido clasificados tentativamente como sigue:

- a) Cariostaticos: B, Ba, Cu, F, Li, Mg, Mo, Sr, Va.
- b) Cariogenicos: CO_3 , Cd, Cl, Cu, Fe, Pb, Mg, Mn, K, Se, Si.
- c) Efecto ambiguo: Be, Br, Co, Mn, Zn.
- d) Sin efecto: Ba, Al, Ni, Fe, Ti.

Los mayores substituyentes en el esmalte humano son HPO_4 , Cl, CO_3 , Mg, Sr, K, Na y otros cationes. Las apatitas sinteticas han sido clasificadas como del tipo A o del tipo B dependiendo del tipo de substitución: CO_3 por OH (Tipo A) o CO_3 por PO_4 (Tipo B). El tipo A es caracterizado porque los ejes a y c son más grandes que en el caso de la celda unitaria de la hidroxiapatita pura. Pequeñas cantidades de CO_3 en apatitas biologicas se presentan por la sustitución de OH, tipo A. Las apatitas biologicas normales son principalmente del tipo B.

Los parametros de red de la apatita del esmalte dentario humano adulto son $a = 0.9441 \text{ nm}$, $c = 0.6880 \text{ nm}$; la apatita de la dentina es $a = 0.9419 \text{ nm}$, $c = 0.6880 \text{ nm}$; la apatita del hueso es $a = 0.9417 \text{ nm}$, $c = 0.6880 \text{ nm}$. La dimension del eje a de la apatita del esmalte dentario humano en comparacion con el de la hidroxiapatita (0.9441 y 0.9422 nm respectivamente) fue atribuida previamente a la substitucion de CO_3 por OH lo cual causaria una expansion en el eje a mientras que una substitución tipo B (CO_3 por PO_4 acompañado de Na por Ca) causa una contracción. La expansion observada en las dimensiones del eje a de la apatita del esmalte dentario humano puede ser atribuida por la substitucion parcial de Ca^{2+} por HPO_4^{2-} y Cl^- y efectos combinados de cationes más grandes (por ejemplo Sr^{2+} , K^+). Mientras que las apatitas de hueso y dentina pueden tambien tener HPO_4^{2-} , su efecto de expansion del eje a puede ser contrareestado por el alto contenido de CO_3 (tipo B). Las regiones cariosas del esmalte fueron reportados presentando alto contenido de HPO_4^{2-} y bajo CO_3^{2-} con respecto a las regiones normales. La apatita del tiburon y algunos

otros peces tienen un eje a mucho menor que la apatita del esmalte humano (0.9377 y 0.9441 nm respectivamente). Esta diferencia se puede deber al alto contenido de fluor de estas apatitas con respecto a la del esmalte humano (3.7 wt.% en el caso del tiburón con respecto al 0.1 wt % del esmalte humano) . Los parámetros de la red de las apatitas biológicas cambian durante calentamiento debido principalmente a la pérdida de algunos iones (CO_3 es liberado como CO_2) y el reacomodo de los iones para formar una apatita más estable.

La sustitución de F por OH en la apatita produce un decrecimiento en el eje a y no cambia significativamente las dimensiones del eje c. La mayor estabilidad de la fluorapatita con respecto a la hidroxapatita es reflejada en una mayor estabilidad química, solubilidad más baja y el incremento en resistencia a la disolución ácida. La fluorapatita mineral es la más estable y abundante en la naturaleza. El fluoruro se ha demostrado que presenta los siguientes efectos:

- a) Promueve la formación de hueso.
- b) Realza la remineralización y la calcificación.
- c) Acelera la hidrólisis de ACP, DCPD y OCP hacia apatita.
- d) Permite la formación de Fluoroapatita a expensas de β -TCMP en solución conteniendo un alto porcentaje molar Mg/Ca.

Y los siguientes efectos en las propiedades fisicoquímicas de las apatitas:

- a) Incrementa la estabilidad estructural debido al mejor ajuste del ion F^- dentro de los triángulos imaginarios de Ca en la estructura de la apatita.
- b) Contracción del eje a, pero no cambia las dimensiones del eje c de la apatita.
- c) Incremento en la "cristalinidad" reflejando un incremento en el tamaño del cristal y un decremento en los esfuerzos cristalinos.
- d) Contribución a una mejor razón molar Ca/P aproximándose al valor estequiométrico de 1.67.

e) Decrecimiento en la solubilidad.

La sustitución tipo B (CO_3 por PO_4 y Na por Ca) en las apatitas causan los siguientes efectos:

- a) Decrecimiento en el eje a e incremento en el eje c en comparación con las dimensiones de la apatita.
- b) Decrecimiento en el tamaño del cristal.
- c) Incremento en el esfuerzo cristalino.
- d) Cambio en la morfología del cristal.
- e) Solubilidad más alta.

La alta incorporación de CO_3 en las apatitas es influenciado por la presencia simultanea de otros cationes con los iones de Ca^{2+} , por ejemplo la presencia de Na^+ permite la maxima sustitución mientras que la presencia de Sr^{2+} limita la cantidad que se incorpora de CO_3 . Los enlaces Ca-CO_3 son más debiles que los enlaces Ca-PO_4 , esto hace que la apatita conteniendo CO_3 es más susceptible a la disolución acida.

La sustitución de Cl por OH resulta en la expansion del eje a y decrecimiento del eje c. La estabilidad termica, la apatita conteniendo cloro es menos estable termicamente que la apatita conteniendo F, resultando en la formación de grandes cantidades de β -TCP con ignición de hidroxiapatita.

La sustitución de HPO_4 por PO_4 es observado en apatitas del tipo B pero no en las apatitas de tipo A. Este tipo de sustitución causa una expansion en el eje a y un decrecimiento en el eje c. Los reportes sugieren que las apatitas deficientes en Ca son más solubles que las apatitas estequiometricas.

La incorporación de Mg en las apatitas es muy limitado (el maximo es de 0.4 wt.% Mg) a menos que iones CO_3 y F esten simultaneamente incorporados con el Mg. Cuando la razon molar Mg/Ca es más grande que 0.3/1, se forma Whitlockita con Mg. La presencia de Mg en apatitas causa los siguientes efectos en sus

propiedades:

- a) Decrecimiento en las dimensiones del eje a.
- b) Incremento en la incorporación de HPO_4 .
- c) Decremento en la cristalinidad.
- d) Incremento en la disolución.

Sr es fácilmente incorporado tanto en apatitas del tipo A como del tipo B. La sustitución de Sr por Ca resulta en la expansión de las dimensiones de los ejes a y c debido a que el radio iónico del Sr es más grande. En las apatitas tipo B, la incorporación de Sr es básica (pH 9) en lugar de ácida (pH 5). La sustitución de Sr en la apatita no muestra una diferencia significativa en la cristalinidad pero muestra pérdida de resolución en las bandas de absorción en los grupos PO_4 en el espectro de rayos infrarrojos. Es bien conocido que la presencia de Sr hace a la apatita más soluble.

Igual que Sr, los iones divalentes, Ba y Pb pueden substituir a Ca en las apatitas tipo A y tipo B formando $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $\text{Ba}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $\text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ como miembros de las series isomorfas. Estos iones son más grandes que Ca^{2+} por lo que causan expansión de las dimensiones de los ejes a y c cuando substituyen átomos en la red de apatita. Detalles de los efectos causados por la incorporación de Ba y Pb en las propiedades de disolución de la apatita no han sido estudiados hasta el momento.

Los iones polivalentes, como son por ejemplo Al^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , causan un decrecimiento en la cristalinidad de las apatitas. Iones monovalentes, como son por ejemplo Na^+ , K^+ , Li^+ , pueden ser incorporados en apatitas sintéticas. El Na^+ , cuyo radio iónico es similar al del Ca^+ , no se espera que cause ninguna modificación en los parámetros de la red, el K^+ tiene un radio iónico mayor que el Ca^+ , por lo que se espera modificaciones en los parámetros de la red (falta pagina 100 y 101).

Además de HPO_4^{2-} y CO_3^{2-} , otros posibles substituyentes del

PO_4^{3-} en la red de la apatita son sulfato (SO_4^{2-}), manganato (MnO_4^-), vanadato (VO_4^{2-}), y borato (BO_3^{2-}). Al igual que HPO_3^{2-} y CO_3^{2-} las substituciones de estos aniones tienen que ser acompañados por una substitucion cationica, por ejemplo Na por Ca de tal forma de mantener la electroneutralidad. Otros aniones, por ejemplo $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, pueden perturbar la cristalización de la apatita y promover la formación de ACP.

Las diferencias en composición y propiedades cristalinas de los fosfatos de calcio produce diferencias en solubilidades. La solubilidades son también afectadas por substituciones; por ejemplo, la substitucion de CO_3 , Sr^{2+} , o Mg causa la mayor solubilidad, mientras que la substitucion de F^- causa una solubilidad menor en las apatitas. Las solubilidades del esmalte humano son también afectados por el tipo de iones presentes en solución: F^- causa una reducción mientras CO_3^{2-} , Mg^{2+} , o Sr^{2+} causan un incremento en la solubilidad. En la Tabla VII.5. se resumen los efectos cualitativos de los elementos substitutos que comentados.

VII.3. Posibles modelos para la línea oscura.

Nuestros resultados de las trazas hechas por procesamiento digital muestran una ligera expansión de la celda unitaria en la línea oscura. Por lo antes mencionado los candidatos probables en la substitución son CO_3 , HPO_4 , Cl, Sr, Ba, Pb y K. De entre estos elementos el candidato más probable es la substitucion de CO_3 por OH. Cl tiene el mismo efecto pero es muy inestable. Los efectos causados por la substitución de Sr, Ba, Pb y K no han sido aun determinados. También hay que tomar en cuenta que la línea oscura podría ser representada por un plano de una fase diferente a la hidroxiapatita pero que sea coherente con la estructura de esta última. Por ejemplo el fosfato octacalcico (38) tiene una estructura muy cercana a la de la hidroxiapatita y podría actuar como un precursor de su crecimiento.

Substituciones	Radio ionico	Parametros de red (+0.003 Å)	
		a-axis	b-axis
Para calcio, Ca ²⁺	0.99	9.443	6.882
Estroncio, Sr ²⁺	1.12	(+)	(+)
Bario, Ba ²⁺	1.34	(+)	(+)
Plomo, Pb ²⁺	1.20	(+)	(+)
Potasio, K ⁺	1.33	(+)	(nc)
Sodio, Na ⁺	0.97	(nc)	(nc)
Magnesio, Mg ⁺	0.66	(-) ^b	(-) ^b
Cadmio, Cd ²⁺	0.97	(-) ^b	(-) ^b
Manganeso, Mn ²⁺	0.80	(-)	(-)
Estaño, Sn ²⁺	0.93	(am)	(am)
Para OH, (OH) ⁻			
Fluoruro, F ⁻	1.36	(-)	(nc)
Cloro, Cl ⁻	1.81	(+)	(-)
Para PO ₄			
Carbonato, CO ₃ ²⁻		(-)	(+)
Citrato C ₆ H ₅ O ₇ ³⁻			
HPO ₄ ²⁻		(+)	(nc)
Vanadato, VO ₄ ³⁻		(-)	(-)
Pirofosfato, P ₂ O ₇ ⁴⁻			
(+) = Incremento; (-) = decremento; (nc) = sin cambios (am) = amorfo ^a Datos a partir de Weast (98). ^b La fase β-TCP es tambien formada.			

Tabla VII.1.Efectos cualitativos de algunos elementos "substitutos" en los parámetros de la red de las apatitas.

Tambien es posible pensar en modelos estructurales de la línea oscura a partir de vacancias en la estructura de la hidroxiapatita. Las vacancias de calcio satisfacen el criterio de la reducción de la densidad de carga y son consistentes con los datos del analisis químico de las apatitas biológicas que son deficientes en calcio (39).

Nelson y col.(15) han sugerido cuatro modelos para la línea oscura que incluyen tanto vacancias como una capa de fosfato octacalcico en medio de una matriz de hidroxiapatita, y los cuales se muestran en la figura VII.1. El modelo B involucra vacancias en sitios de calcio hexagonales con coordinación 7. El modelo C involucra una falla de apilamiento la cual resulta en un desplazamiento $[1/4 \ 0 \ 0]$ al remover los átomos de calcio de coordinacion 9. El modelo D incorpora una celda unitaria de fosfato octacalcico. El modelo E resulta de una contracción del modelo D en la capa deficiente de calcio y colocando átomos en los sitios correspondientes a la hidroxiapatita. En la fig VII.2 se muestran las imagenes simuladas para estos cuatro modelos. La comparacion de estas imagenes con las imagenes experimentales (Fig VII.3) demuestran que el modelo D, es decir aquel que consta de una capa de fosfato octacalcico embebido en una matriz de hidroxiapatita, concuerda perfectamente bien con las imagenes experimentales. Por lo tanto la línea oscura probablemente consiste de una capa de fosfato octacalcico en una matriz de hidroxiapatita.

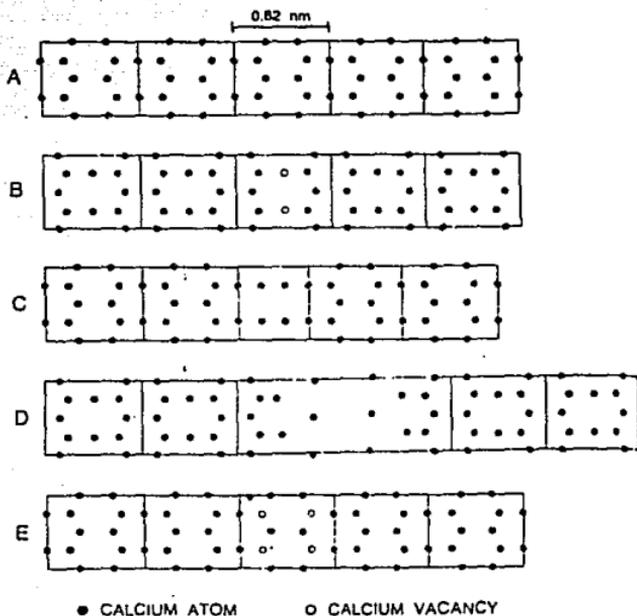


Fig VII.1. Diagrama esquemático de los cuatro modelos de (b-e) sugiriendo el defecto de la línea oscura. En (a) se muestra la proyección en la dirección $[010]$ de la celda unitaria de la hidroxiapatita. Se muestran solo las posiciones de los átomos de calcio.

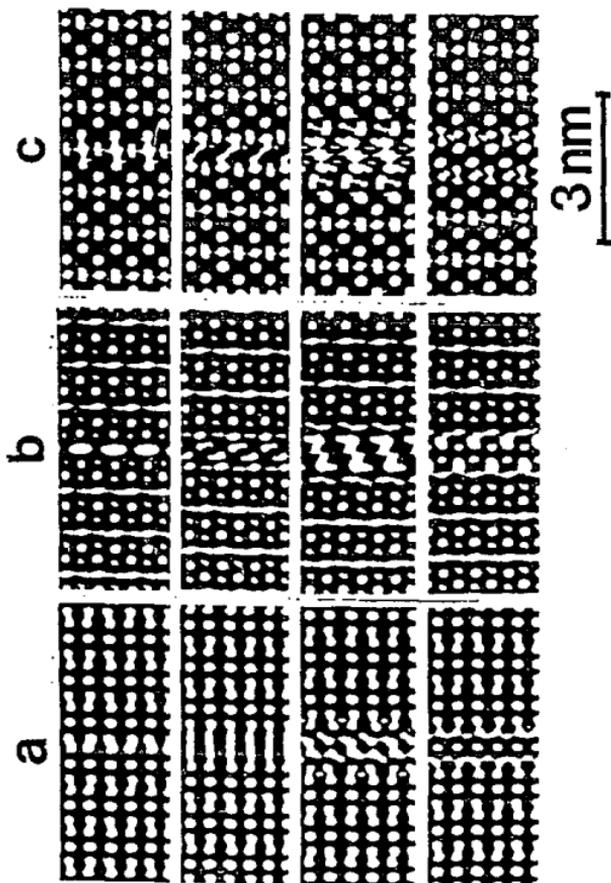


Fig VII.2. Imágenes simuladas de la hidroxiapatita a partir de los cuatro modelos mostrados en la figura 23. Los cuatro modelos son mostrados de arriba hacia abajo. Las condiciones de simulación fueron $V=400$ KV, $Cs=1$ mm, que son los parámetros del microscopio electrónico de alta resolución Jeol 4000. (a) dirección $[010]$, espesor 7.55 nm, desenfoco -50 nm. (b) dirección $[011]$, espesor 7.01 nm, desenfoco -70 nm. (c) dirección $[011]$, espesor 21.02 nm, desenfoco -70 nm.

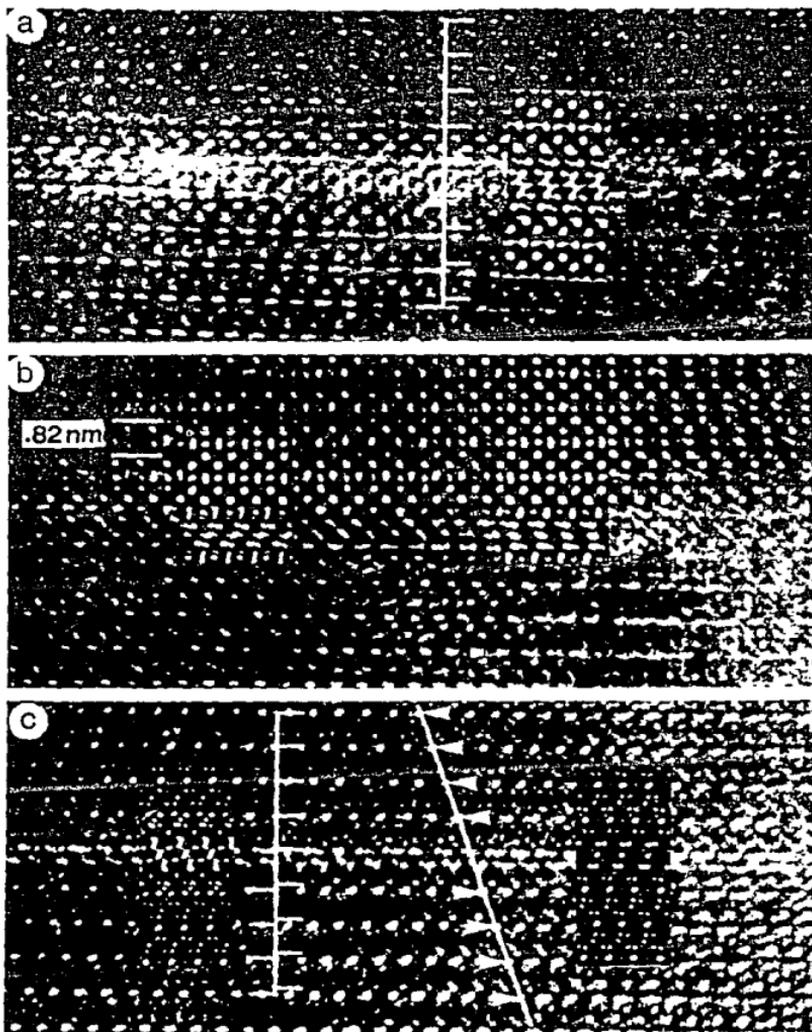


Fig VII.3. Imágenes de alta resolución de los cristales de apatita con carbonato en la dirección $[011]$ tomadas a 400KV. Los recuadros muestran las imágenes simuladas usando los cuatro modelos mostrados en la figura VII.1.

CONCLUSIONES

1. Los cristales del esmalte dental humano tienen forma alargada y presentan la estructura de la hidroxiapatita. Son altamente anisotrópicos con uno de sus ejes, el eje c, siendo el eje preferencial. También son altamente sensibles a la radiación del haz electrónico: después de un tiempo largo de observación el haz electrónico induce la amorfización de éstos. La línea oscura es la primera en desaparecer durante este proceso.

2. La línea oscura presenta un espacio atómico ligeramente mayor que el de la estructura de las hidroxiapatita. Esta línea ha sido interpretada como un defecto como un defecto planar, sin embargo, por el tipo de contraste que presenta, no es una falla de apilamiento, ni una frontera de antifase, ni una frontera de gemelación. Es altamente posible, por otra parte que ésta sea el resultado de una variación local en la composición química de la estructura de los cristales del esmalte. Los posibles candidatos para la sustitución son CO_3 , el fosfato octacalcico y, tomando en cuenta la descalcificación que presenta el esmalte, vacancias en las posiciones de calcio. Todo dentro de una matriz de hidroxiapatita.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Etiopatogenia y profilaxis de la caries dental, Asocación Dental Mexicana.
- 2.- Bioquímica, Emilio Herrera, Ed. Interamericana, México D.F. 1986, 1244pg.
- 3.- Ellwood DR, Baird JK, Hunter JR, Longyer VMC. Variations in surface polymers of streptococcus mutans. J Dent Res 1976;55 Spec Iss:42-8.
- 4.- Whitford GM, Schuster GS, Pashley DH, Venkatwarlu AP. Fluoride uptake by streptococcus mutans. Infect and Immun 1977;18:680-7.
- 5.- Bradsha DJ, McKee AS, Marsh PD. Prevention of population
- 6.- Eggert FM, Maenz L, Tam Y-C. Measuring the interaction of human secretory glycoproteins with oral bacteria. J Dent Res 1987;66:610-2.
- 7.- Pollock JJ, Lotardo S, Gaval R, Grossbard BL. Lysosyme-Protease-inorganic monovalent ions lysis of oral bacterial strains in buffers and stimulated whole saliva. J Dent Res 1987;66:467-74.
- 8.-Bioquímica dental básica y aplicada. Segunda edición 1990, R.A.D.Williams y J.C. Elliott. Ed. El manual moderno, Mexico D.F.
- 9.- LeGeros RZ. Chemical and crystallographic events in the caries process. J Dent res 1990;69 spec Iss:567-74.
- 10.- Bres EF, Barry JC, Hutchinson JL. A structural basis for the carious dissolution of the apatite crystals of human tooth enamel. Ultramicroscopy 1984;12:367-72.
- 11.- Brown WE, Patel PR, Chow LC. Formation of $\text{CaPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ from enamel mineral and its relationship to caries mechanism. J Dent Res 1975;54:475-81.
- 12.- Cutress TW. The inorganic composition and solubility of dental enamel from several specified population group. Arch Oral Biol 1972; 17:93-109.
- 13.- Larsen MJ. Chemical events during tooth dissolution. J Dent Res 1990;69Spec Iss:75-80.
- 14.- Larsen MJ, Jensen SJ. Solubility unit cell dimensions and cristallinity of fluoridated human dental enamel. arch oral Biol 1989;34:1969-73.

- 15.- Nelson KC, Higetti WI. Mechanism of fluoride uptake by hidroxiapatite from acidic fluoride solutions: I. Theoretical considerations. J Dent Res 1970;49:1541-8.
- 16.- Torris L, Rapisarda E. Quantitative Pixie analysis on strontium concentrations in teeth. Phis Med 1987;1:1-8.
- 17.- Davies BE, Anderson RJ. The epidemiology of dental caries in relation to enviromental trace elements. Experientia 1987;43:87-92.
- 18.- Napper DH, Smythe BM. The dissolution kinetics of hydroxyapatite in the presence of kink poisons. J Dent Res 1966;45:1775-83.
- 19.- Aponte-Merced LA, Feagin FF. Effects of fluoride on ion exchange, remineralization and acid resistance of surface enamel.
- 20.- Larsen MJ, Jensen SJ. The hidroxyapatite product of human dental enamel as a function of pH in the range 4-7,7 at 20 degreesC. Arch Oral Biol 1989;34:957-61.
- 21.- Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, Raquel Zapanta Le Geros. Editor Howard M. Myers, San Francisco, California. 1991.
- 22.- Ronnholm E. The amelogenesis of human teeth as revealed by electron microscopy: II. The development of enamel crystallites. J Ultrastruct Res 1962;6:249-303.
- 23.- Nylen MU, Eanes ED, Omnell KA. Crystal growth in rat enamel. J Cell Biol 1963;18:109-23.
- 24.- Frazier PD. Adult human enamel: An electron microscopic study of crystallite size and morpholohy. J Ultrastruc Res 1963;28:1-11.
- 25.- Scott DB., Simmelink JW, Nygaard V. Structural aspects of dental caries. J Dent Res 1974;53:165-78.
- 26.- Bioquímica Dental Basica y Aplicada, 2ª edición, 1990.R.A.D. Williams y J.C. Elliott. Ed. El manual moderno. México D.F.ref 8
- 27.- Histología Oral Desarrollo estructural y Funcional, 2ª edición, A.R. Ten Cate. Ed. Panamericana 1986.
- 28.- Biomateriales Odontologicos de uso Clinico, Humberto José Guzman Báez, 1990. Ed. CAT.
- 29.- Ch. Kittell. "Introduction to solid State Physics", John Wiley and Sons, New York (1971).
- 30.- Ver "Apatitas" en la Enciclopedia Britanica
- 31.- Naray-Szabo, S.,Z. Kristallogr. 75, 387 (1930).
- 32.- Beevers y McIntyre.

- 33.- Kay M.I, Young, R.A., And Pousner A.S., Nature 204 (1964).
- 34.- Young .R.A., and Elliot J.C. Archs Oral Biol. 11,699 (1966).
- 35.- Formación de imágenes en el microscopio electrónico. R.A. Barrio-Paredes. Cuadernos del instituto de Investigación de Materiales, UNAM, No. 3. México (1982).
- 36.- Vigil Santos E., Introducción a la Física del estado sólido, II, Ed. Pueblo y Educación, Cuba (1986).
- 37.- Manly R.S. and Hodge,H.C. Density and refractive index studies of dental hard tissues., J. Dent. Res. 18, 133 (1939).
- 38.- Walter y col., Octacalcium phosphate and hydroxyapatite, Nature 196, 1048 (1962).
- 39.- Nelson y Col., The structure of (100) defects in carbonated apatite crystallites: a high resolution electron microscopy, Ultramicroscopy 19, 253 (1986).