

119
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

PROCESO DE DISOLUCION IN VITRO DEL ESMALTE
DENTAL HUMANO DURANTE UN ATAQUE ACIDO,
OBSERVADO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A
MARIA DE JESUS GLORIA HERNANDEZ



ASESORADA POR
DR. JOSE REYES GASGA

MEXICO, D. F.,

OCTUBRE DE 1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Reyes Gasga. La confianza y la seguridad que me hiciste sentir desde el inicio, le dieron firmeza a este trabajo. Gracias por tu espacio, tiempo y desde luego tu amistad. Admiro tu especial sencillez.

Al Dr. Javier Portilla Robertson por su apoyo para la culminación de este trabajo de tesis.

Por participar con su asesoría técnica, experiencia, tiempo y especialmente su valiosa amistad de la que siempre estuve rodeada, todo ello fundamental para la realización de este trabajo. Gracias a: Pedro Mexía, J. Antonio Ramírez, Lamberto Quinterio, Steven Morningthunder y Fis. Roberto Hernández.

Agradezco también su colaboración y amistad al Dr. Humberto Terrones, Ing. Samuel Tehuacanero, M.C. Jaqueline Cañetas, Ing. Cristina Zorrilla, Sr. Luis Rendón, Sr. Alfredo Sánchez. Así también al IFUNAM, al CONACYT (proyecto 3348-E) y a DGAPAUNAM (proyecto IN103394) por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

IRAS Y NO VOLVERAS

*Sitio de aquellos cuentos infantiles
eres la tierra entera
A todas partes
vamos a no volver
Estamos por vez ultima
en dondequiera*

José Emilio Pacheco

GRACIAS

A DIOS

Por darme el momento oportuno para cada cosa y estar siempre conmigo, por haberme puesto aquí en su Planeta Azul.

A MIS PAPAS. Por dejarme salir de ustedes.

PAPA: No pude haber tenido una base más sólida que tu fortaleza, tenacidad, voluntad e inteligencia. TE AMO

MAMA: Gracias por tanto amor, cuidado, tolerancia, bondad y sobre todo por tus oraciones.

A MIS HERMANAS. Por ser únicas

OLI Eres buena tomando el control de las situaciones.

VERO Gracias por la risa. Contigo todo es fiesta.

CARO Que ligereza la tuya! Eres como ave.

MIRI Con tu sonrisa inocente me das mucha fuerza.

LAS AMO

CONCHIS Y FRANCO. Gracias por la oportunidad de trabajar con ustedes, eso me dió confianza en mis manos, desde el inicio de la carrera.

A MIS FAMILIARES. Es contagiosa la alegría con que todos trabajan.

A MIS AMIGOS (AS). Por ser tan oportunos, cariñosos, impredecibles, por darme consejos; va para ustedes que me hacen reír. De verdad hacen un arduo trabajo los que me toleran todo, me enseñan lo que saben y me confían sus secretos. Inolvidables los momentos con ustedes.

LOS AMO Y ADHIRO

C H U Y

INDICE

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES, OBJETIVOS, JUSTIFICACION E HIPOTESIS.	
CAPITULO I	10
LA MICROSCOPIA ELECTRONICA Y LA LA INVESTIGACION ODONTOLOGICA.	
1.1 El microscopio electrónico. MET.	10
1.2 Información obtenida por MEB.	14
1.3 Uso del microscopio electrónico en la investigación odontológica.	15
CAPITULO II	18
ESTRUCTURA, COMPOSICION QUIMICA Y SOLUBILIDAD DEL ESMALTE.	
2.1 Estructura del esmalte.	18
2.2 Composición química del esmalte.	21
2.3 Solubilidad del esmalte.	23
2.3.1 Comentarios generales.	23
2.3.2 Cinética de disolución del esmalte.	27
2.3.3 Modelos de disolución del esmalte.	31
2.3.4 Efecto del ión fluoruro.	33
2.3.5 Efecto de la edad.	34
2.3.6 Grabado ácido.	36
CAPITULO III	37
DESARROLLO EXPERIMENTAL	
3.1 Obtención de los dientes a estudiar.	37
3.2 Preparación de las muestras para el MEB.	37
3.3 Preparación de muestras para MET.	38
CAPITULO IV	40
RESULTADOS	
4.1 Microscopía Electrónica de Barrido	40
4.2 Microscopía Electrónica de Transmisión	44
4.3 Microscopía Electronica de Alta Resolución	54
4.4 Ejemplo de ataque ácido: Coca Cola	57
CAPITULO V	64
DISCUSION	
5.1 Etapas de la disolución del esmalte.	64
CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFIA	

INTRODUCCION

El presente trabajo de tesis representa la continuidad de la investigación que sobre la estructura, propiedades y composición química del esmalte dental humano se viene realizando desde hace tres años en el proyecto de colaboración entre el Instituto de Física y la Facultad de Odontología titulado "Caracterización Estructural y Química del Esmalte Dental Humano por Microscopia Electrónica". En anteriores trabajos^{1,2} se han estudiado la estructura y composición del esmalte dental humano, dando como resultado un mayor conocimiento de la distribución y características de las estructuras de los cristales que lo componen. En este trabajo se presenta el estudio de la disolución de los cristales del esmalte durante un proceso de ataque ácido. Esto nos permitirá profundizar aún más en el conocimiento de sus propiedades.

La presentación de este trabajo de tesis se ha dividido en cinco capítulos. Los antecedentes, los objetivos, la justificación se presentan al inicio de la tesis como continuación de la introducción. En el capítulo I se comenta el microscopio electrónico, su diseño, sus aplicaciones y sus limitantes que con respecto a la investigación odontológica presenta. En este capítulo se pretende dejar claro que la microscopia electrónica no es la panacea de la investigación odontológica sino una técnica que está a su alcance para la investigación de temas muy específicos. El capítulo II presenta la estructura, composición química y solubilidad del esmalte. Este capítulo intenta explicar

en forma breve y clara la estructura cristalográfica y los elementos químicos que lo componen. Puesto que el presente trabajo tiene como objetivo el análisis de la disolución de los cristales de esmalte durante un ataque ácido, se dan también en este capítulo los elementos necesarios para trabajar sobre los temas relacionados con solubilidad del esmalte. El capítulo III presenta el desarrollo experimental en dónde se detalla la preparación del esmalte dental para su observación por microscopía electrónica. También presentamos el equipo utilizado. En el capítulo IV se presentan los resultados obtenidos, todos ellos excelentes y algunos inéditos. En el capítulo V, el último, se aborda la discusión de los resultados de este trabajo de tesis, en el cual se intenta describir y detallar el mecanismo por el cual pasan los cristales del esmalte durante el proceso de disolución ocasionado por el ataque ácido. Para finalizar se presentan las conclusiones del experimento realizado, el primero en su género que se realiza en nuestro país.

Es necesario comentar la relevancia de este trabajo no sólo en el área de la odontología sino también en el área de biomateriales. Puesto que se está analizando la hidroxiapatita completamente natural, como lo está en el esmalte dental, la caracterización y conocimiento de sus propiedades serán de una alta importancia para la producción de los materiales sintéticos que intenten reemplazarla.

ANTECEDENTES, OBJETIVOS, JUSTIFICACION E HIPOTESIS

Nuestro objeto de estudio es el esmalte dental humano y nuestra meta es la obtención de mayor información sobre su estructura, composición química y propiedades. El objetivo que se persigue así como sus antecedentes, la hipótesis y justificación del presente trabajo será comentado en esta sección.

ANTECEDENTES.

En la tesis titulada "Caracterización del Esmalte Dental Humano"² se mostró que el esmalte está formado por cristalitos de la apatita biológica conocida con el nombre de hidroxiapatita. También que en cada uno de éstos cristales se observa una línea que los cruza a lo largo de sus porciones centrales (fig.1). Esta línea tiene un espesor de aproximadamente 1nm y su contraste es dependiente del foco: se presenta obscura cuando la imagen está sobreenfocada, es blanca bajo-foco y desaparece cuando la imagen está exactamente en foco (fig. 2). La geometría de éste defecto es tal que se puede extender completamente a travez del cristal o terminar en cualquier punto dentro de éste (fig. 3). Algunos autores³ opinan que este defecto es especialmente susceptible a caries puesto que todo hace suponer que sufre disolución preferencial durante los estadios tempranos del proceso carioso. Numerosos estudios se han realizado con el objetivo de conocer su estructura, propiedades y el verdadero papel que juega en la estructura del esmalte³. Sin embargo hasta la fecha muchas preguntas sobre su naturaleza y propiedades se encuentran todavía sin respuesta.



Fig. 1 Cristales que forman el esmalte dental humano observados en dirección transversal por Microscopía Electrónica de Transmisión².

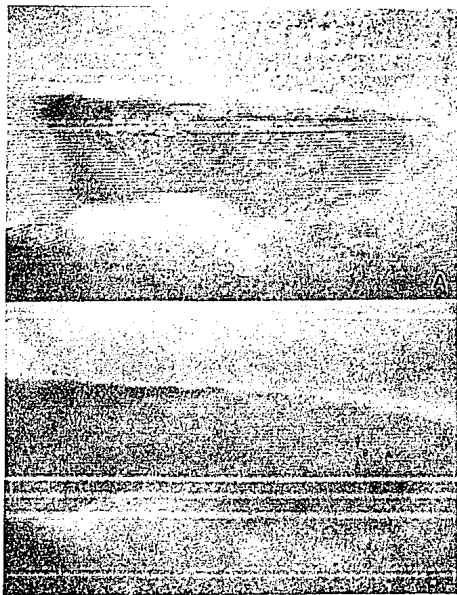


Fig. 2 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión con resolución de línea de uno de los cristales que se muestran en la figura 1. (A) en condiciones de sobrefoco; (B) en exacta condición de foco¹.



Fig. 3 Cristales del esmalte dental humano observados en sección longitudinal por microscopía electrónica de transmisión. (B) presenta parte de los cristales mostrados en (A) en microscopía electrónica de alta resolución².

Este trabajo demostró la variación de contraste y posibles estructuras de la línea oscura. Sin embargo represento sólo el inicio del estudio de este defecto que hasta el momento no ha sido interrumpido. También mostró la necesidad de realizar un estudio más amplio sobre la estructura, propiedades y composición química del esmalte.

La necesidad de reconocer y analizar los rasgos estructurales del esmalte como un camino a seguir para la interpretación de la línea oscura fué solventada por la tesis titulada Análisis Estructural y Químico del Esmalte Dental Humano por técnicas de Microscopía Electrónica². En este trabajo se caracterizaron estructuralmente tanto los prismas como los cristales de esmalte por medio de técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido, Microscopía Electrónica de Transmisión, Microscopía Electrónica de Alta Resolución, Difracción Electrónica y Difracción de Rayos X. El trabajo, incluyó el estudio comparativo de las estructuras anatómicas del esmalte, su composición química y la observación de la línea oscura en esmaltes de distinta edad. La línea oscura estuvo siempre presente en los cristales de esmalte de niño, adulto y anciano, dando como conclusión que ésta no representa el inicio del proceso carioso. De hecho, la línea oscura se ha observado en el esmalte de dientes prenatales⁴. Sin embargo, consideramos que la línea oscura es un punto vulnerable del esmalte y con una alta probabilidad de ser el núcleo de diferentes procesos que lo dañen. Alternamente se mostró en este trabajo que la línea oscura es en realidad un plano que cruza la estructura tridimensional del esmalte (fig. 3). Este fué un resultado de la

observación del esmalte en dirección transversal y longitudinal de los prismas que lo componen².

OBJETIVOS.

Varios autores han comentado que el proceso de la caries implica la disolución del esmalte dental, es decir la disolución de los cristallitos de esmalte y por tanto su estructura⁵. Los puntos de controversia son el lugar inicial y la forma en que éste proceso se lleva a cabo. Mediciones directas de pH indican que la disolución por caries ocurre en ambiente ácido, por ejemplo la teoría acidogénica postula que el esmalte es atacado por ácidos orgánicos que se producen por metabolismo microbiano⁶. Es bien conocido en la ciencia de los materiales que las zonas donde existen defectos son los puntos de inicio del ataque por soluciones ácidas. Por lo tanto hemos tenido considerable interés por la solubilidad del esmalte en soluciones ácidas puesto que nos dará nuevos datos sobre su estructura y los puntos de vulnerabilidad que ésta presenta.

El objetivo del presente trabajo es por lo tanto el estudio de los cambios morfológicos que presentan los cristales del esmalte al inicio de un proceso de ataque ácido. Especialmente tenemos interés en los cambios estructurales mostrados al rededor y en el área de la línea oscura. A partir de esto esperamos que el estudio de disolución del esmalte nos dé indicios de sus propiedades estructurales, composición química y cambios morfológicos. El experimento diseñado en este trabajo nos permitirá seguir el proceso de disolución de los cristallitos del

esmalte en un ambiente ácido y estudiarlo por microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de alta resolución.

JUSTIFICACION.

El tema del ataque ácido al esmalte está directamente relacionado con los procesos de desmineralización que se observan durante el proceso carioso⁷. Puesto que la enfermedad por caries dental en México afecta a un 90% de los habitantes⁸, tenemos un gran problema de salud. Por lo tanto todo estudio sobre caries, o temas relacionados, cobra gran importancia y su justificación es inmediata. Aquí realizaremos el estudio sobre los cambios morfológicos que sufren los cristales del esmalte y su línea oscura durante un proceso de desmineralización *in vitro* como lo es el ataque ácido.

En vista de que existen muchas preguntas sin respuesta sobre este tema, esperamos obtener resultados adicionales en el presente trabajo de tesis que contribuyan a la solución de las interrogantes.

HIPOTESIS

Iniciamos este trabajo de tesis con la hipótesis de que durante un proceso de ataque ácido los puntos de vulnerabilidad de los cristales del esmalte lo representa el material orgánico y la línea oscura.

LA MICROSCOPIA ELECTRONICA Y LA INVESTIGACION ODONTOLOGICA

En este capítulo se describirá el microscopio electrónico, tanto de transmisión como de barrido, sus componentes y su aplicabilidad al estudio de diferentes fenómenos relacionados con la caracterización, análisis químico e información estructural de los materiales. También su uso, posibles aplicaciones y limitaciones en la investigación odontológica.

1.1 El Microscópio Electrónico de Transmisión.

El microscopio electrónico consiste en una columna cilíndrica hueca en la cual quedan confinados los haces de electrones, y un panel en el que se encuentran los controles electrónicos (fig.4). Dentro de la columna, en la parte superior está el cañón electrónico, constituido por el filamento de tungsteno y el ánodo. Aquí los electrones son producidos por el filamento por medio de un proceso de termoemisión y acelerados por el alto voltaje aplicado entre el ánodo y el filamento. Antes de operar el microscopio se hace vacío a través del cual viajan los electrones. Si no se eliminara el aire, los electrones se frenarían debido a las colisiones con la moléculas de aire y el filamento se desintegraría con mayor rapidéz.

Los electrones tienen carga eléctrica negativa, y por lo tanto que se les puede desviar de su trayecto y enfocarlos por medio de un campo magnético que funcionan por lo tanto como lentes.

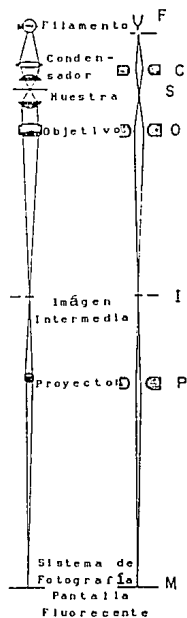
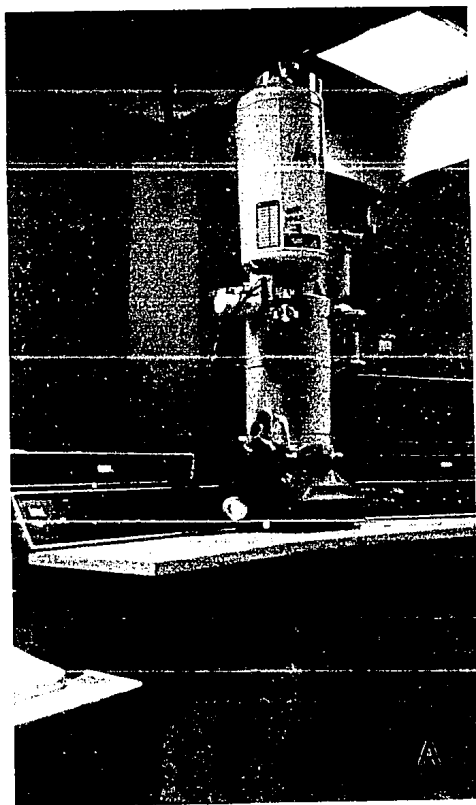


Fig. 4 A) Microscopio Electrónico de Transmisión. B) Esquema de la trayectoria del haz de electrones en el MET⁹.

La fuerza deflectora de las lentes está controlada por la corriente que se les aplica através de los diferentes controles del panel.

Las lentes condensadoras están colocadas entre el filamento y la muestra y son las que producen el enfoque del haz de electrónes sobre la muestra. La mayoría de las veces la muestra está colocada en una rejilla de cobre (fig.5).

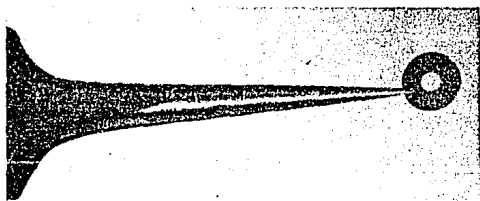


Fig.5 Rejilla portamuestras cuya dimensión es de 3mm de diámetro.

La rejilla se coloca en un portamuestras que al introducirlo al microscópio ésta queda a la mitad de la columna del microscopio. La amplificación se obtiene modificando la corriente de las lentes intermedias. Estas lentes pueden cambiar el factor de amplificación de 1000 veces hasta 250 000. Después de la lente proyectora está una pantalla cubierta con una sustancia fluorescente que es bombardeada por los electrónes que han pasado através de la muestra. Cuando los electrónes chocan contra la pantalla los cristales fluorescentes emiten luz visible que es percibida por el ojo y se forma la imagen de la muestra. Las imagenes y sus detalles son registrados por medio de fotografías, las cuales se amplifican aun más al imprimirlas en papel.

La base física de la formación de una imagen en el microscópio electrónico residen en la dispersión de los electrones al interaccionar con la muestra (fig.6). Sin muestra presente, toda la pantalla presenta un brillo uniforme iluminado. Cuando la muestra se coloca en el trayecto del haz de los electrones, estos se dispersan a diferentes ángulos y producen diferentes tipos de señales. Los electrones retrodispersados y secundarios son la base de la microscopía electrónica de barrido, los electrones transmitidos lo son para la microscopía electrónica de transmisión y los rayos X producidos permiten obtener el análisis químico de la muestra. Los electrones transmitidos que no pasan através de la apertura de la lente objetivo se pierden como participantes de la formación de la imagen en la microscopía electrónica de transmisión.

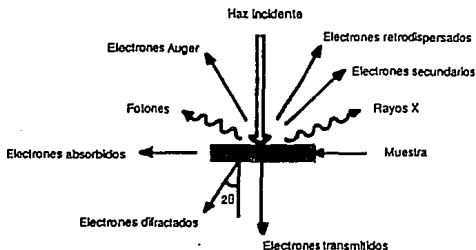


Fig.6 Interacción haz-muestra.

1.2 Microscopía Electrónica de Barrido.

El principio de la microscopía electrónica de barrido (MEB) es enfocar el haz en una área pequeña de la muestra y barrer la superficie detectando en cada zona una intensidad promedio de los electrones secundarios dandonos la información topológica de la muestra (fig. 7).

El haz es producido y enfocado sobre un punto de la muestra por dos lentes condensadoras. La sección transversal del haz con

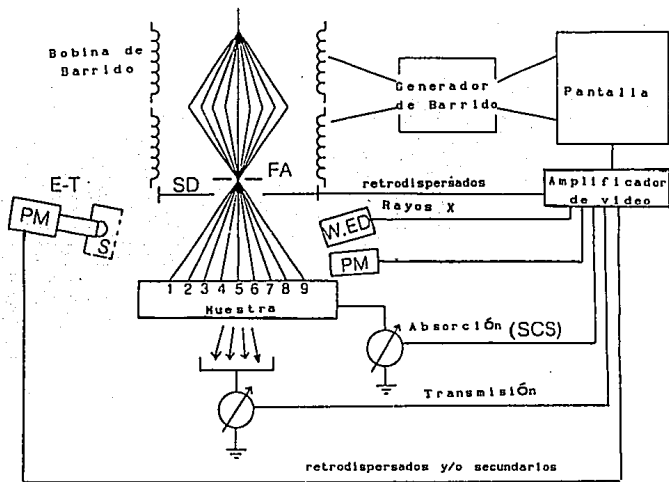


Fig.7 Esquema simplificado de la formación de la imagen en el Microscopio Electrónico de Barrido.

diámetro de 10 a 20 nm, barre la muestra por medio de una serie de bobinas. La imagen se forma detectando los electrones secundarios y cuya señal pasa al tubo de rayos catódicos, y a la pantalla de T.V. Por lo tanto, la imagen muestra la topografía de la superficie de la muestra. El microscopio electrónico de barrido trabaja con voltajes de aceleración de 10, 15, 20 y 25 kv.

El microscopio de barrido cuenta con un sistema de fotografía tradicional (revelado de negativos e impresión de las fotografías) y un sistema de fotografía instantánea que capta la imagen, congelada obtenida en la pantalla, que nos permite un análisis inmediato de la muestra.

1.3 Uso del Microscopio Electrónica en la investigación odontológica.

La información odontológica obtenida por medio de microscopia electrónica en el IFUNAM nos ha reportado grandes beneficios en resultados novedosos del esmalte dental humano. Sin embargo el uso del microscopio electrónico es un recurso que se puede aprovechar en distintas áreas de la investigación odontologica. Podemos hacer referencia por ejemplo la aplicación de la microscopía electrónica en el estudio estructural y/o fabricación de materiales dentales con características específicas. También podemos mencionar el análisis estructural de los materiales actuales entre los que se incluyen estructuras cristalinas (ionómeros, hidroxiapatita sintética), poliméricas (resinas sintéticas), materiales de impresión, aleaciones metálicas (amalgamas, metales de uso protésico, alambres de uso ortodóntico, soldaduras), medios de

unión mecánicos y químicos; solo por citar algunos ejemplos. Es necesario hacer aquí una observación sobre el tipo de información que se obtiene con el microscópio electrónico puesto que no es la panacea de la investigación, sino una técnica de análisis a nivel atómico.

En general el microscópio electrónico, tanto convencional como de barrido y de alta resolución, es utilizado en la caracterización de materiales tales como:

1. Cerámicas superconductoras
2. Semiconductores
3. Aleaciones metálicas
4. Vidrios metálicos
5. Oxidos no estequiométricos
6. Minerales
7. Cristales no moleculares

y los procesos físicos y químicos que pueden ser estudiados por medio de microscopía electrónica son:

1. Procesos epitaxiales
2. Crecimiento cristalino
3. Transformaciones de fase
4. Corrosión y/o oxidación
5. Precipitación
6. Implantación iónica
7. Análisis químico¹⁰

Lamentablemente, y también debe tomarse en cuenta, el campo de la microscopía electrónica de transmisión tiene algunas limitantes en cuanto a análisis de material orgánico se refiere, porque el

método de preparación de las muestras incluyen desgastes mecánicos y iónicos que podrían alterar su composición estructural.

Es distinto el panorama al hablar acerca de las posibilidades de análisis de material orgánico en el microscopio de barrido. En éste es relativamente fácil analizar superficies y uniones mecánicas por ejemplo. Además el tamaño de la muestra que nos permite analizar éste microscopio es mayor que en el caso del microscopio electrónico de transmisión.

Por lo tanto todo tipo de investigación odontológica que quiera realizarse por medio de la microscopía electrónica debe evaluar primero su factibilidad tomando en cuenta los puntos comentados.

ESTRUCTURA, COMPOSICION QUIMICA Y SOLUBILIDAD DEL ESMALTE

En este capítulo se comentará en forma breve la estructura del esmalte y su composición química con la idea de dar los elementos necesarios para la descripción del proceso de solubilidad que presenta en diferentes medios. La solubilidad del esmalte es la parte central de este capítulo. Una mayor información sobre su estructura y composición química se encuentra en las referencias^{1y2}.

2.1 Estructura del esmalte.

Las unidades estructurales básicas del esmalte son los prismas o varillas (Fig. 8). Están altamente calcificadas y las separa una pequeña capa de material orgánico llamada vaina y van de la unión amelodentinaria a la superficie dental. El espesor de un prisma es de $5\mu\text{m}$ aproximadamente, variando cerca de 1.3 veces en la superficie exterior con relación a su tamaño en la unión amelodentinaria. Los prismas observados en corte transversal se dividen en "cabeza" y "cola" (Fig. 9). La cabeza se orienta hacia la superficie oclusal e incisal y las colas en dirección cervical. Los prismas se separan entre sí por vainas de $0,1$ a $0.2\mu\text{m}$ de espesor. Los prismas se apilan semejando un patrón hexagonal Las vainas se distinguen fácilmente alrededor de la cabeza de los prismas, en la cola se tornan borrosas e incluso desaparecen. La distinción entre prisma y la vaina se basa principalmente en la cantidad de material orgánico y calcificación que presentan. El

prisma se compone de los cristales compactos de apatita, dejando libre un mínimo espacio que es ocupado por las vainas coformadas de material orgánico con poco o nulo contenido de cristales de apatita.

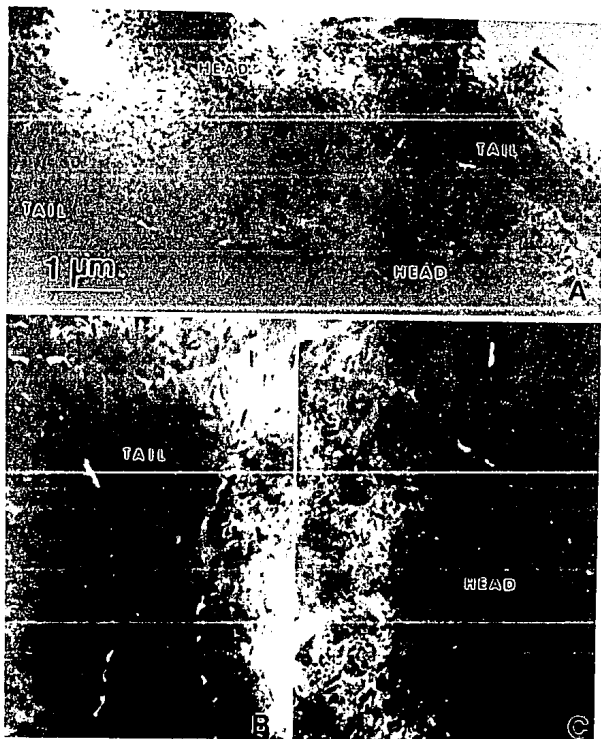


Fig. 8 (A) Estructura del prisma observada por Microscopía Electrónica de Transmisión, (B) cola y (C) cabeza.

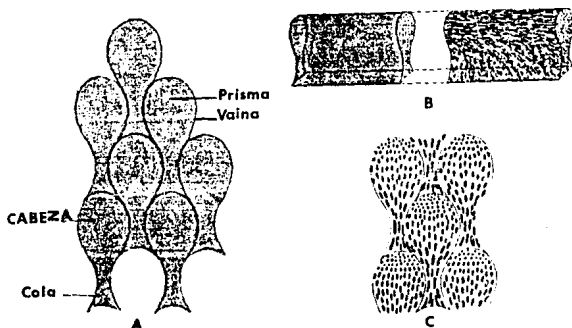


Fig.9 (A) Estructura del prisma, (B) Representación esquemática del arreglo que presentan los cristalitos de apatita en los prismas, (C) Arreglo de los cristales de las apatitas a lo largo de la dirección transversal de los prismas.

Los prismas presentan una trayectoria ondulante principalmente en el tercio del espesor cercano a la unión amelodentinaria, son visibles casi a simple vista. Se presentan alternadas en dirección. Es decir el primer grupo forma convexidades y el segundo concavidades con respecto al plano de transición entre ambos grupos en el que la dirección de los prismas es aparentemente recto. Un efecto óptico de esta estructura las hace aparecer como bandas alternadas claras y oscuras, que son rápidamente identificables en cortes longitudinales. A estas

estructuras se les llama bandas de Hunter-Schreger. Una descripción más detallada de la estructura del esmalte se ha presentado en el trabajo de la referencia².

2.2 Composición química del esmalte.

El esmalte dental humano está compuesto de 96% de material inorgánico y 4% de material orgánico y agua. La hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ es un fosfato de calcio cristalino, y es el principal componente inorgánico del esmalte. La hidroxiapatita también se encuentra en huesos, cartílago calcificado, dentina y cemento. Es una de las apatitas biológicas más conocidas, se sabe que no es completamente pura, porta varios elementos impureza que en ocasiones son benéficas como el flúor, pero el en general rompen su estructura. Es baja en iones hidroxilo y calcio. La celda unitaria de la hidroxiapatita es hexagonal y las posiciones de sus elementos, Ca, O, P, H es tal que forman el grupo cristalográfico $\text{P6}_3/\text{m}$ (Fig 10). Como el esmalte maduro está expuesto a un ambiente de saliva sobresaturada con calcio y fosfato, y contiene otros iones con concentración diferente a un esmalte recién erupcionado, no es raro encontrar diferente composición en la superficie y en el interior del esmalte. Por ejemplo se ha reportado que fluoruro y zinc tienen un gradiente de concentración decreciente de la superficie del esmalte a la unión amelodentinaria, mientras carbonato y magnesio tienen un gradiente en dirección opuesta⁶. Además, el esmalte de la superficie está más mineralizado que el esmalte interno y tiene menor contenido de agua. Elementos como estroncio y cobre, están distribuidas uniformemente por todo el

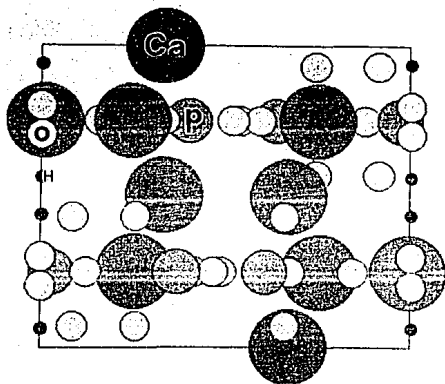


Fig. 10 Celda unitaria de la hidroxiapatita.

esmalte , lo que nos sugiere que se depositaron en el momento de la formación del esmalte y no estuvieron sometidas a cambios. Carbonato y magnesio que se encuentran aumentados de la superficie exterior a la unión amelodentinaria, también se depositaron en el momento de su formación. El gradiente surge por la pérdida de estos componentes de la superficie durante la exposición del esmalte al medio bucal (fig. 11).

A diferencia del resto de los elementos, hay considerables dudas acerca de la cantidad de H_2O , HPO_4^{2-} y OH^- presentes en el esmalte. Se han reportado solo como aproximaciones de 1.0 a 2% de agua en peso total de esmalte dental fresco, cerca del 5% total de fósforo del esmalte está en forma de HPO_4^{2-} y su contenido de OH^- es al menos de 20 a 30% por abajo del contenido máximo de hidroxiapatita.

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

Partes por millón

5,000 en la superficie

F	8 - 218
Fe	152 - 227
Zn	50 - 400
Sr	10 - 100
Cu	0 - 18
Mn	0 - 100
Ag	

Relación en peso

1.92 - 2.17

Fig.11 Tabla de la composición química del esmalte dental humano.

A pesar de las irregularidades anteriormente expuestas, la mayoría de los estudios estructurales y químicos, demuestran que los resultados pueden ser confiablemente interpretados para el cristal de hidroxiapatita.

2.3 Solubilidad del esmalte.**2.3.1. Comentarios generales.**

En este trabajo de tesis estamos interesados en el análisis del proceso de disolución que se presenta durante el ataque ácido del

esmalte. Para llevar a cabo este estudio requerimos de investigar los mecanismos involucrados en este proceso de disolución y en la presente sección pretendemos hacer un repaso breve de éstos.

Al estar el esmalte dental en el medio ambiente bucal en contacto permanente con la saliva produce una reacción de equilibrio entre ambos. Significa ésto un intercambio continuo de los iones que los componen. Cuando este equilibrio se rompe se presenta generalmente un proceso de desmineralización del esmalte. Durante el proceso de mineralización el esmalte experimenta el desplazamiento de agua por minerales. La mayor mineralización del esmalte de la superficie es resultado de la exposición a la saliva pos eruptivamente¹¹.

Puesto que el esmalte humano carece de poder biológico de regeneración, estudios in vitro indican que la saliva tiene la capacidad de remineralizar la superficie de esmalte descalcificada. La saliva sirve como una solución calcificante y actúa como fuente de minerales para la remineralización de espacios submicroscópicos inaccesibles a moléculas orgánicas e inorgánicas necesarias para núcleos en la reparación de grandes espacios.

La remineralización es acelerada en presencia de fluoruro en concentraciones de 1ppm¹². El fluoruro promueve nucleación de fosfato cálcico y reduce el poder disolvente de la fase líquida. En situaciones normales el proceso de desmineralización - remineralización se encuentran en equilibrio. Cuando este se rompe, uno de estos procesos, generalmente la desmineralización

aumenta con respecto a la remineralización y sobreviene la lesión del esmalte. La ruptura del equilibrio depende de varios factores, principalmente de la alimentación. De igual manera si aumenta la acidez de la saliva por el consumo de cítricos y sustancias con pH bajos, tenemos un ataque ácido hacia el esmalte. Aunque el tiempo de ataque es corto, no deja de ser significativo en la lesión del esmalte.

La química de la disolución del esmalte dental en soluciones ácidas es complicada por los cambios en la composición de la apatita inducidos por el intercambio de iones entre las fases sólida y líquida y tiende a aumentar con la disminución del pH¹³. La disolución está confinada inicialmente al esmalte de la subsuperficie, pues la capa más externa está protegida por un alto contenido de fluoruro y por una película de superficie orgánica procedente de la saliva¹⁴.

La barrera a la difusión de la superficie del diente en la capa externa del esmalte reduce la velocidad de disolución ácida y retardan la desmineralización de la superficie. Sin embargo, una vez que pasan la capa superficial protectora, los iones y las moléculas de ácido están en libertad de reaccionar con la estructura del diente y disolverla.

La evidencia más temprana de desmineralización de esmalte en la zona de la superficie se presenta en las líneas de Retzius. A partir de estas líneas, la desmineralización se extiende a las partes interprismáticas y de éstas a la parte orgánica intercrystalina¹⁵. La secuencia se precipita primariamente por la

pérdida de materia orgánica soluble lo cual facilita la desmineralización diferencial.

Además de penetrar entre la matriz orgánica y los cristalitos adamantinos, los ácidos atacan también los sitios de dislocación en el centro de los prismas, produciendo así vacíos en la parte central.

Finalmente, en la superficie del esmalte se crean espacios suficientemente grandes para permitir la invasión por bacterias y por lo tanto, la aparición de caries.

Brudevold¹⁵ enumera las pruebas que sugieren que la caries del esmalte es primariamente un proceso de desmineralización de la siguiente manera: 1) los cambios morfológicos característicos de las lesiones iniciales pueden reproducirse en el esmalte sano cuando se ataca por ácidos débiles; 2) no se ha demostrado la degradación bacteriana de la matriz orgánica en esmalte intacto; 3) la matriz de esmalte desmineralizado es tan débil que se destruye fácilmente por traumatismos mecánicos, lo que evita la necesidad de postular degradación de la matriz orgánica.

La caries es esencialmente un proceso de lixiviación (separación de sustancias solubles de las insolubles) de componentes inorgánicos inducidos por ácidos. En la caries los espacios de las vainas se abren debido a la temprana disolución de los cristales que las revisten¹⁵. La posición y la mayor solubilidad de estos cristales se atribuye al alto contenido de carbonato lo cual los hace altamente susceptibles a la acción de los ácidos.

Los cambios morfológicos van acompañados de alteraciones en la composición química de los tejidos afectados. En caries, el esmalte y dentina contienen más agua, materia orgánica y menos mineral. En la fracción inorgánica, los cambios más señalados asociados con la caries son una disminución de los iones de carbonato y magnesio y un aumento en el contenido de fluoruro. Los valores más altos de fluoruro denotan que en la lesión queda algo de fluorapatita después de haberse disuelto los cristales más solubles¹².

La caries del esmalte es una consecuencia directa de una disolución química de éste y puede definirse en términos de principios fisicoquímicos. El proceso carioso debe incluir la difusión de los reactantes (ácidos) hacia el sitio de la reacción (esmalte), seguida por la reacción (disolución) y por la difusión de los productos de la reacción lejos del sitio en que se formaron. La reacción entre una solución y un sólido es heterogénea y depende generalmente de la velocidad de difusión de los reactantes hacia la superficie del sólido y la reacción a la interface controla la velocidad de disolución. En la reacción química la reacción más lenta del proceso determina la velocidad de disolución¹⁶.

2.3.2 Cinética de disolución del esmalte.

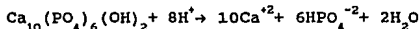
La disolución del esmalte se puede describir por medio de fórmulas termodinámicas y cinéticas convencionales. Un factor que determina la disolución del esmalte es la solubilidad de la hidroxiapatita, otro factor es la velocidad de disolución la cual será controlada

por la reacción más lenta del proceso.

Todas las reacciones implican algún tipo de energía. En el caso del experimento diseñado en este trabajo de tesis, el tipo de energía que produce la reacción es química. Esta es una forma de energía potencial almacenada en las sustancias que pueden reaccionar entre sí para constituir otras nuevas. Para detectar una reacción debe ocurrir un cambio observable. Involucra el proceso por el cual los átomos del ácido fosfórico y el esmalte van a reaccionar y a combinarse entre sí para formar otras sustancias. Se representa por medio de una ecuación química en la que se indican las sustancias reaccionantes y los productos.

La reacción de interés en el experimento descrito en este trabajo es una reacción ácido-base. La teoría de Bronsted-Lowry establece que un ácido es una sustancia que tiende a perder un protón (H^+) en una reacción química, es decir es un donador de protones. Una base es un aceptor de protones¹⁷.

La disolución de esmalte dental en un ataque ácido depende de la reacción entre el ión hidrógeno (H^+) y los materiales inorgánicos del esmalte. Estudios de la cinética química muestran que la difusión de iones de hidrógeno y de moléculas de ácido no disociado en el esmalte y la velocidad de reacción entre el ácido y el mineral son de suma importancia para el control de la velocidad y el grado del ataque ácido. Puesto que este material es hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, su disolución es:



Es decir, se liberan iones de calcio, fosfato y agua. Por lo tanto la disolución del esmalte proporciona calcio y fosfato que pueden reaccionar con la solución y la superficie del esmalte para formar otras fases. Por ejemplo con el calcio la fase superficial podría ser fosfato dicálcico dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)¹⁸. Otros cationes formarán sales insolubles de fósforo. La forma del ión fosfato está determinado por el pH del sistema¹⁸. Hay que tomar en cuenta que la disolución del esmalte es afectada por la placa bacteriana, la saliva y las fases minerales de la superficie.

El proceso está controlado por el coeficiente de solubilidad del material, el cual para la hidroxiapatita es:

$$K_{\text{HAP}} = [\text{Ca}^{2+}]^{10} [\text{PO}_4^{3-}]^6 [\text{OH}^-]^2$$

Por lo tanto la solubilidad depende de las actividades del calcio, el fosfato y el hidróxido en la solución. Cuando este producto es saturado, la hidroxiapatita se precipita y cuando la solución es no saturada la hidroxiapatita se disuelve¹⁸.

Se ha demostrado que conforme la disolución avanza el proceso que controla la velocidad de disolución cambia de una reacción de difusión a una de superficie¹⁸. De esta manera la velocidad de reacción al inicio del proceso de disolución depende de lo rápido que los iones alcanzan la superficie del esmalte, siendo el ácido amortiguador un fuente principal de iones H^+ . El valor encontrado para K_{HAP} oscila entre 10^{-130} y 10^{-132} , y el límite normal del producto termodinámico de solubilidad de la hidroxiapatita oscila

entre 10^{-110} y 10^{-120} . Resultados de experimentos sobre la disolución del esmalte realizados bajo condiciones hidrodinámicas bien controladas revelaron que no hubo desmineralización subsuperficial ni cambio efectivo del area superficial. También han mostrado que la solubilidad del esmalte disminuye al aumentar la temperatura, sin embargo se apoyo la suposición de que la naturaleza de la fase superficial del fosfato de calcio no cambia durante la disolución y es independiente de la temperatura¹⁸. Parece ser que la velocidad inicial de la disolución está controlada por la difusión, pero al proseguir la reacción la velocidad de disolución es controlada por la disolución de la superficie. Datos experimentales¹⁸ mostraron que cuando el producto de la actividad de la solución para K_{HAP} es menor de 10^{-128} , que corresponde a la velocidad inicial de la disolución puesto que el fosfato y el calcio aun no se disuelven, la velocidad de disolución obedece el proceso de difusión. Conforme la disolución continúa aumentan las concentraciones de calcio y fosfato y el producto de actividad de la disolución alcanza un valor de $10^{-115} > K_{HAP} > 10^{-128}$. En esta región la difusión no es controlada en la capa límite y se presenta la disolución rápida de cristales individuales y se forma una zona de descalcificación en lugar de la disolución de la superficie. Estas dos regiones de saturación representan velocidades de disolución para la hidroxiapatita significativamente diferentes¹⁸.

La velocidad de disolución es:

$$V_E = k_1 [H^+] + k_2 K^{1/2} [HB]^{3/4} [B^-]^{-1/4}$$

Dónde:

k_1 y k_2 = funciones de la temperatura y agitación.

K = constante de equilibrio del ácido amortiguador empleado.

$[H^+]$ = concentración del H^+ .

$[HB]$ = concentración del ácido amortiguador sin disociar.

$[B^-]$ = concentración del anión del ácido amortiguador.

La concentración del ácido amortiguador está dada por:

$$[TB] = [HB] + [B^-]$$

Y la constante de disociación del ácido amortiguador es:

$$K = [H^+][B^-]/[HB]$$

El término B^- tiene un exponente negativo lo cual implica un efecto inhibitor. Experimentalmente se encontró que cuando K disminuye la velocidad de disolución aumenta alcanzando un máximo y luego disminuye¹⁸.

2.3.3 Modelos de disolución del esmalte.

Una de las primeras descripciones cuantitativas del proceso de disolución del esmalte fue dada por Gray en 1962 utilizando ácido láctico con diferentes pH^{14} . Sus resultados mostraron que la disolución del esmalte era función de la concentración del ácido amortiguador y su pH , siendo controlada por las velocidades de difusión de los reactantes y de los productos del proceso. Se mostró que un pH entre 3 y 4 redujo los índices de disolución en tanto que un pH entre 5 y 6 no cambian apreciablemente. Esto

sugiere de nuevo dos sitios de disolución del esmalte. Higuchi y col¹⁹. desarrollando un modelo basado en la ley de Fick de la difusión, encontraron que la fuerza motriz de la disolución está gobernada por el producto de la solubilidad de la fase mineral en contacto con el ácido amortiguador mientras que la difusión es un proceso controlado por una capa interacción adyacente al esmalte. Los modelos de Higuchi comprenden como fase disolvente a la hidroxiapatita (modelo A) o de fosfato dicálcico dihidratado (modelo B) (Fig. 12). En ambos casos el proceso de disolución se describe de manera semejante. Los iones H^+ del ácido amortiguador se deben de difundir desde la masa de la solución hasta el esmalte a través de una capa de difusión de espesor constante. La difusión al exterior de los productos de la reacción (el ion Ca^{2+} y los fosfatos no reactivos) pasan a través de la capa de difusión hacia la masa de la solución¹⁹.

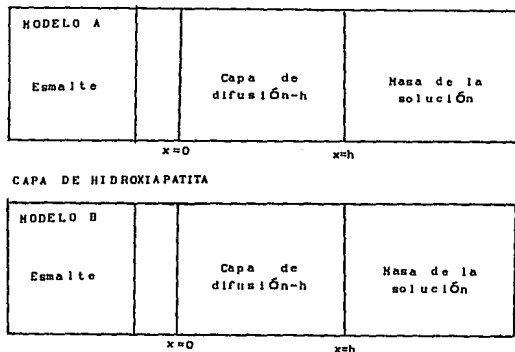


Fig.12 Disolución del esmalte en solución amortiguadora ácida, representando que la solución adyacente a la superficie está en equilibrio con la fase de la hidroxiapatita (modelo A) o con la fase de fosfato dicálcico dihidratado (modelo B).

Los resultados de comparar los modelos con los valores de pH, la concentración de ácido amortiguador y el efecto iónico común dieron una concordancia aceptable¹⁹. Una evaluación más crítica muestra que el modelo B no muestra los efectos iónicos finos, mientras que el modelo A deja observar una concordancia cuantitativa bastante buena en el caso de utilizar ácidos amortiguadores como el acético y cloroacético. En general el análisis de los modelos indica que los datos son mejor explicados por un mecanismo controlado por la difusión en el que interviene la disolución de una superficie de hidroxiapatita. El modelo A describe de manera satisfactoria los índices de disolución del esmalte.

2.3.4 Efecto del ión fluoruro

Resulta evidente que los fluoruros desempeñan un papel múltiple y complejo en la prevención de la caries dental, desde la asimilación por la ingestión de agua fluorada y depositada en el esmalte antes de la erupción del diente y en los años inmediatos a ésta¹³. El fluoruro ingerido es depositado en el esmalte como fluorapatita, la cual es más resistente a la formación de caries que la hidroxiapatita. El fluoruro tiene también la propiedad única de inducir formación de apatita en soluciones de calcio y fosfato. Favorece la conversión de fosfatos ácidos solubles en fosfatos ácidos insolubles, con lo cual se mantiene la estructura apatítica incluso en valores bajos de pH¹². En el proceso alterno de desmineralización y reprecipitación, que caracteriza la reacción entre ácido y mineral del diente, el fluoruro promueve el depósito de apatita. Este efecto es contrarrestado por carbonato,

magnesio y otros iones que poseen la tendencia a perturbar la red de apatita y por agentes como pirofosfatos y otros fosfatos orgánicos que alteran la superficie del cristal de apatita e impiden el crecimiento del cristal¹¹. El efecto del fluoruro para producir resistencia a la caries parece efectuarse en parte por mediación del mantenimiento de la integridad del cristal de apatita. Cuando la hidroxiapatita es expuesta a una concentración baja de fluoruro en ácidos amortiguadores se forma una capa delgada de fluorapatita al rededor de los cristales de hidroxiapatita¹². De este modo ahora la fluorapatita y no la hidroxiapatita es la que gobernará termodinámicamente la fase durante la disolución. El modelo es semejante al B, excepto que se forma FAP en lugar de FDCD.

2.3.5 Efecto de la edad

La resistencia de dientes humanos al ataque de caries parece aumentar con la edad. Al aumentar la edad, hay también aumento en la concentración de fluoruro y disminución en la concentración del carbono del esmalte de la superficie. Los dientes recién erupcionados son considerablemente más susceptibles a la caries que los dientes de mayor edad²¹. La disminución de la propensión a la destrucción ha sido atribuida a un proceso de maduración poseruptivo del esmalte. Aunque se desconoce en mecanismo exacto de maduración y resistencia, en general se atribuye a la exposición a la saliva. Después de la erupción el diente experimenta con el tiempo alteraciones físicas y químicas. La saliva contribuye al cambio en el contenido iónico y la permeabilidad del esmalte²¹.

2.3.6 Grabado ácido.

El tema central de este trabajo de tesis es el estudio de los cambios morfológicos que presentan los cristales del esmalte durante un ataque ácido. El grabado ácido o esmalte acondicionado es un componente importante en la práctica clínica. Esta técnica implica el uso de selladores de fisuras, mejor adhesión de materiales de restauración al esmalte, la adhesión de abrazaderas ortodóncicas y en restauraciones protésicas, buscando un sistema de unión mecánica y excelente sellado en las difíciles condiciones bucales⁴.

El grabado ácido logra dos cosas, remueve la placa y otros desechos junto con una fina capa de esmalte. Tenemos entonces una superficie más porosa debido a la disolución selectiva de cristales, el ácido quita las sales de calcio e incrementa el tamaño y el número de microespacios que nos dan una mejor superficie de retención mecánica y adhesión para los materiales restaurativos²⁰.

Se usan varias concentraciones para acondicionar al esmalte sólo hasta una profundidad máxima de 10 μm . El ácido fosfórico se usa como grabador, con una concentración entre 30 y 50% durante 60 segundos con el que obtenemos un grabado adecuado para la retención de las restauraciones. No se usan concentraciones mayores, ya que paradójicamente se forma un fosfato de monocalcio monohidratado sobre el esmalte, lo cual evita que en el diente se presente una disolución mayor⁴.

En microscopía electrónica de barrido observamos imágenes del efecto del grabado ácido sobre la superficie del esmalte. El más común se conoce como patrón de grabado tipo I, caracterizado por la remoción preferencial de los centros de los prismas. En el tipo II se muestra la remoción preferencial de las periferias de los prismas; dejando el centro del cristal intacto. Hay un tercer tipo que es menos frecuente, en el que ha sido removido gran cantidad de esmalte y este pierde el aspecto morfológico del prisma. Por la importancia que representa el mecanismo de disolución del esmalte, comentaremos un poco más sobre estas morfologías en los capítulos de resultados y discusión.

Las variaciones regionales pueden deberse a variantes en la naturaleza del agente acondicionador, al tiempo de exposición del esmalte a la concentración del ácido, el enjuague y el resto de las condiciones requeridas al momento de efectuar el grabado⁴(fig.13).

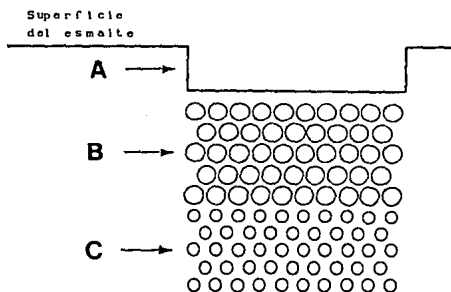


Fig.13 El resultado del grabado ácido fue la formación de tres zonas histológicas distintas: (A) zona grabada, 15 μm ; (B) zona cualitativamente porosa, 20 μm ; (C) zona cuantitativamente porosa, 20 μm .

CAPITULO III

DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo describiremos en detalle los pasos que se siguieron durante la preparación del esmalte dental humano para su observación por microscopía electrónica, tanto de barrido como de transmisión.

El método utilizado para la preparación de muestras es el mismo utilizado en la preparación de materiales cerámicos. La preparación de muestras para MEB difiere de la primera y es mucho más sencilla. El equipo utilizado y las soluciones ácidas preparadas también son descritos.

3.1 Obtención de los dientes a estudiar.

Las piezas dentales utilizadas fueron: cuatro primeros premolares para MET; y seis primeros premolares para MEB. Todas estas piezas fueron de 21 años y extraídos para iniciar un tratamiento de ortodoncia en la Clínica de Exodoncia de la Facultad de Odontología de la UNAM. Los dientes mantuvieron en agua destilada desde el momento de obtenerlos hasta que fueron utilizados.

3.2 Preparación de muestras para MEB.

Con el propósito de conocer la velocidad de disolución promedio del esmalte para cada una de las soluciones preparadas se realizó el siguiente procedimiento experimental.

Para obtener las muestras de esmalte utilizamos una cortadora con disco de diamante; el tamaño tiene de aproximadamente 4mm de ancho y 1cm de largo. El corte se obtuvo de la cara vestibular del tercio medio de las piezas dentales.

Las soluciones para los ataques fueron preparadas con ácido fosfórico puro disuelto en agua destilada. Se prepararon soluciones de ácido fosfórico (utilizando para la medición de su pH, un pH-imetro marca CORNING) con pH de 2.5, 3.17 y 5.0.; El pH de la Coca Cola es de 2.5.

Todas las muestras fueron cubiertas con barniz a lo largo del corte y aproximadamente a la mitad de su ancho, ésto con la finalidad de tener a la misma muestra como testigo durante el ataque de 2, 6, 12, y 24hrs. En cada una de las soluciones que se mantuvieron sumergidas las muestras durante el tiempo mencionado. El ataque con coca cola se hizo sin disolución. Este ataque se realizó con los mismos tiempos de exposición. La muestra fue preparada en las mismas condiciones.

Al final de los ataques ácidos, las características de la superficie deben ser las siguientes: la muestra debe estar libre de partículas (limpieza con acetona y ultrasonido), se realiza el montaje y una metalización con elementos conductivos por cualquiera de los dos métodos: a) salpicado (ionizado) con Au, Au-Pd; b) evaporación (sublimación) con C, que le dan a la muestra características de conductividad y resistencia además de estabilidad en el vacío, estabilidad después de la exposición al haz de e^- y emisión de suficientes e^- secundarios.

3.3 Preparación de muestras para MET.

El método de preparación de muestras del esmalte para MET ha sido descrito en los trabajos de tesis anteriores^{1y2}, lo describiremos brevemente.

Las muestras para MET fueron obtenidas realizando cortes con disco de diamante para obtener bloques de 0.3 x 0.3 x 0.1 cm. Se realizó un desgaste mecánico para lograr un espesor de 60 micras. Utilizando un pulidor mecánico DIMPLER 200, E.A. Fishione se adelgaza la muestra hasta 20 micras. Por último se realiza un desgaste con una pulidora iónica (Dual Ion Mill. Mod. 600. GATAN) para obtener una perforación en el centro de la muestra con el propósito de que sea suficientemente delgada alrededor de esta perforación para permitir el paso de el haz de electrones. Éste espesor es de 10 a 150 nanómetros. Todas las muestras preparadas fueron en dirección transversal.

Las muestras son cubiertas con una capa de carbón para evitar o disminuir el daño por radiación electrónica y son observadas al MET. Una vez obtenidas las imágenes, continuamos con la exposición de las muestras a las soluciones ácidas y son observadas de nuevo al microscópio. Experimentamos los siguientes ataques con variantes de tiempo y pH:

PH 3.17 de ácido fosfórico, tiempos de 3, 6, 9, 12, y 25 segundos.

PH 2.5 de ácido fosfórico y coca cola, tiempos de 3 segundos.

PH 5.8 de ácido fosfórico.

Las muestras observadas en el Microscópio Electrónico de Alta Resolución JEOL 4000EX, son las mismas que utilizamos para el Microscopio Electrónico de Transmisión convencional JEOL 100CX.

CAPITULO IV

RESULTADOS

En este capítulo son presentados los resultados obtenidos al someter al esmalte a un proceso de ataque de ácido fosfórico. Las muestras fueron observadas por microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de alta resolución. Los resultados son más que excelentes y nos han permitido hacer una continuación del trabajo presentado en las tesis anteriores en el proyecto de caracterización de la estructura atómica del esmalte dental humano por técnicas de microscopía electrónica^{1y2}.

4.1 Microscopía Electrónica de Barrido.

El espesor de las muestras que se observan por microscopía electrónica de transmisión deben ser no mayores a 100nm, dependiendo del voltaje. Espesores mayores no permiten el paso de los electrones. El mejor contraste se obtiene a espesores de 30nm. La observación por microscopía electrónica de transmisión de los cambios morfológicos que sufren los cristales del esmalte dental humano durante el ataque ácido requiere del estudio de la velocidad de disolución del esmalte en soluciones ácidas. Esto nos permitirá conocer la solución y el tiempo de ataque adecuado para las muestras con las dimensiones mencionadas.

Una buena alternativa para conocer el tiempo de ataque y el pH idóneos para observar el inicio y la evolución del ataque a los

cristales del esmalte, nos la da el estudio por microscopía electrónica de barrido de la cantidad de esmalte disuelto en diferentes soluciones a un tiempo determinado. Tenemos entonces una aproximación de la velocidad de disolución del esmalte y nos permite determinar el tiempo de ataque.

La figura 14 muestra las imagenes de MEB de la superficie del esmalte atacada a diferentes tiempos en una solución de ácido fosfórico con un pH de 3.17. La figura 14A muestra el perfil obtenido entre la zona atacada y la no atacada. A partir de este tipo de imagenes se puede conocer el volumen de material disuelto, conocemos el tiempo de exposición y, por lo tanto la velocidad de disolución. La figura 14B presenta la misma zona que la figura 14A pero vista en la dirección perpendicular a la dirección de la figura anterior. La diferencia entre la zona atacada y la no atacada es fácil de observar. La figura 14C muestra la diferencia en la cantidad de material disuelto a partir de la profundidad relativa de la zona atacada a dos distintos tiempos de ataque, 2 y 6 horas. Observese la disminución en el espesor de la franja que forma la frontera de las zonas.

La figura 15 muestra la superficie del esmalte atacada con soluciones de ácido fosfórico con diferentes pH. La diferencia entre ellas es evidente. En la fig.15A se observa que un ataque con pH de 5.4 durante 48 hrs. no modifica apreciablemente la zona atacada en comparación a la parte no atacada.

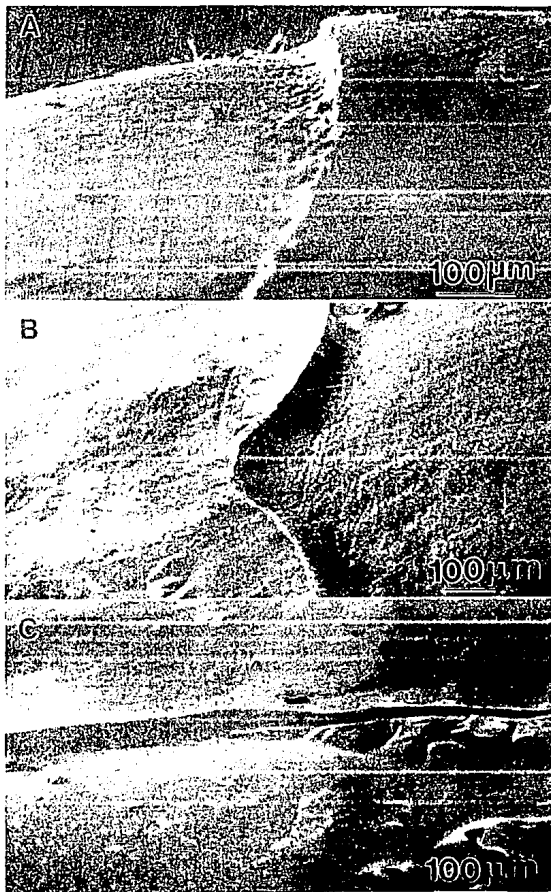


Fig. 14 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las muestras de esmalte atacada con una solución de ácido fosfórico con pH de 3.17 desde diferentes vistas (AyB). Diferencia entre 2 y 6 hrs de ataque(C).

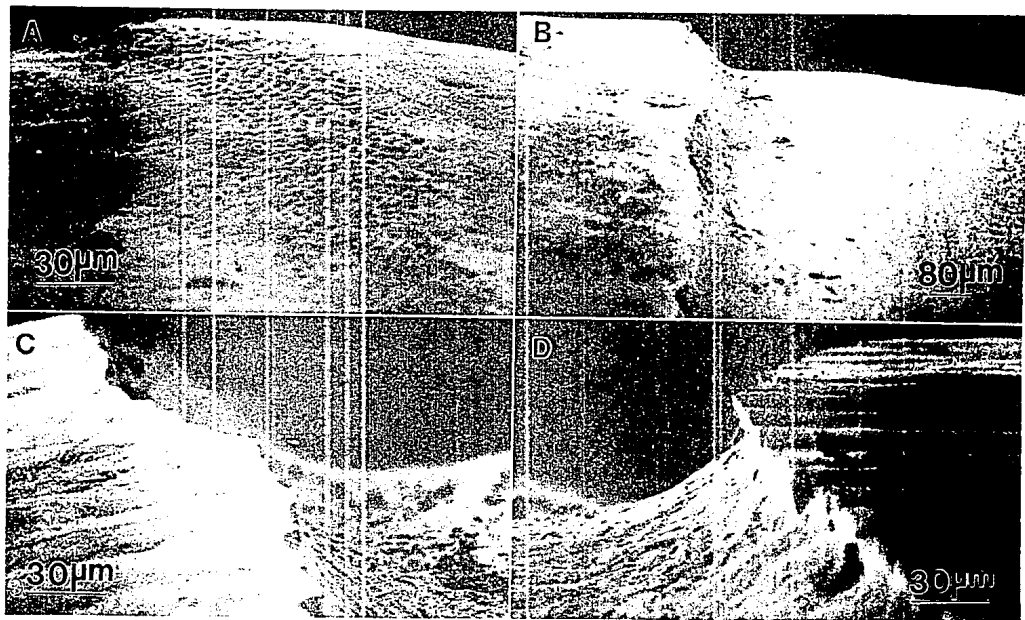


Fig.15 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de muestras atacadas con diferentes soluciones de ácido fosfórico durante 48 hrs. (A) pH=5.4, (B) pH 3.17, (C) pH 2.5. (D) Ataque a la muestra de esmalte con coca cola, pH= 2.5.

Sin embargo un ataque con pH de 3.17, mostrado en la fig. 15B, durante el mismo tiempo modifica apreciablemente la zona atacada. Esta presentó una razón de disolución de aproximadamente 0.5 nm por segundo. En la figura 15C observamos un ataque con una solución de ácido fosfórico con pH de 2.5 durante 48 hrs. lo cual nos da una velocidad de disolución de 1 nm por segundo. La figura 14D muestra el caso del ataque con coca cola, la cual discutiremos más adelante. La figura 16 muestra la superficie del esmalte después del ataque. En esta figura es evidente el ataque preferencial que se presenta: en las zonas interprismáticas (fig. 16B) y/o en el centro de algunos prismas (fig. 16C). Es claro de esta figura la existencia de un ataque no homogéneo de los prismas del esmalte. En los incisos B y C de esta figura se alcanzan a distinguir los cristales de hidroxiapatita que forman a los prismas.

A partir de los resultados de este análisis hemos seleccionado una solución con pH de 3.17 para el estudio del ataque ácido en nuestras muestras de microscopía electrónica de transmisión. Debido al espesor de las muestras de transmisión. Los tiempos de ataque que se utilizan son menores a 13 segundos.

4.2 Microscopía Electrónica de Transmisión.

Los resultados obtenidos en esta sección los podemos calificar de extraordinarios. Con la solución que seleccionamos en la selección anterior hemos podido seguir en una secuencia que podríamos llamar "paso por paso", el proceso de disolución de los cristales del esmalte durante un ataque ácido.



Fig.16 Diferentes tipos de grabado ácido observados por MEB. En (B) se muestra el caso del ataque interprismático indicado por la flecha (2) en (A); en (C) el del ataque prismático (flecha 1).

La figura 17 muestra la secuencia de los cambios morfológicos presentados por los cristales del esmalte durante el ataque con una solución de ácido fosfórico con pH de 3.17. La figura 17A presenta los cristales del esmalte al inicio del ataque donde se puede observar su uniformidad. También se observan espacios intercristalinos. La figura 17B presenta los cambios generales producidos después de 3 segundos de ataque. Obsérvese la existencia de varios huecos y zonas donde los cristales siguen presentando el contraste mostrado en la figura 17A. También observense las formas de donas creadas por el ataque. En la figura 17C la densidad de huecos se ha incrementado. Esto sucede después de 12 segundos. Finalmente en la figura 17D la densidad de huecos es aun mayor y el contraste mostrado en la figura 17A ha cambiado completamente después de 25 segundos. Aquí podríamos hablar de la disolución casi completa de la muestra de esmalte analizado. Un tiempo mayor de ataque nos conduciría a la perdida completa de la zona de interés, como se muestra en la figura 18, en la que se muestra la vista general de un prisma después de 30 segundos y en la cual podemos observar el ataque preferencial de la parte central del prisma y la vaina que lo rodea.

De los tiempos de ataque, aquellos que se encuentran entre 3 y 12 segundos son los que mayor información sobre la evolución del proceso de disolución de los cristales del esmalte nos dieron. La figura 19 muestra la misma zona del esmalte antes y después del ataque. El tiempo de exposición corresponde a 3 segundos. Obsérvese que el proceso se inicia en las zonas intercristalinas (fig. 19B) como era de esperarse. Aquí no podemos decir que el

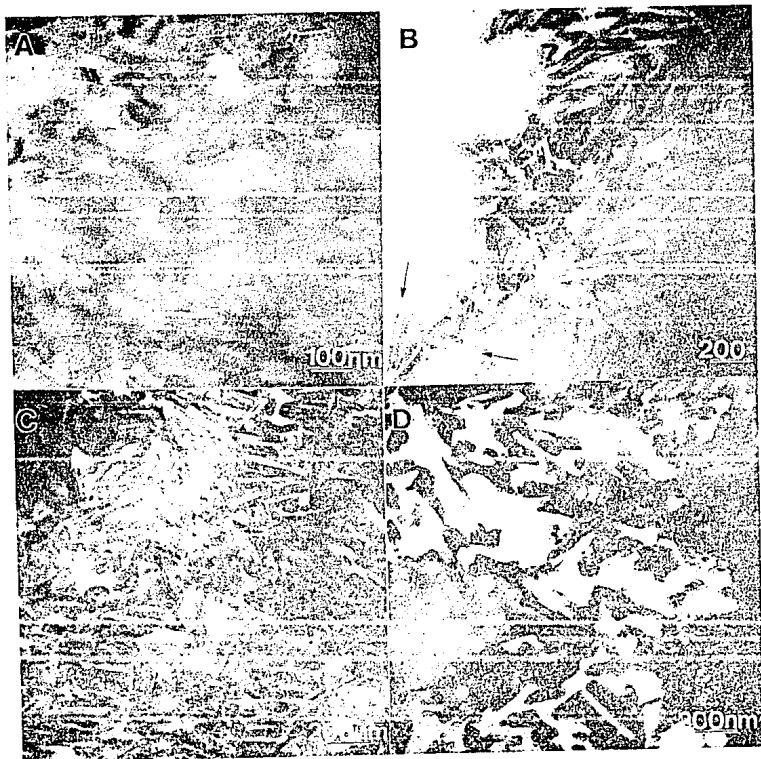


Fig. 17 Diferentes etapas del ataque ácido en los cristales del esmalte visto por MET. (A) inicio del ataque; (B) después de 3 segundos de ataque; (C) después de 12 segundos de ataque; (D) después de 25 segundos de ataque en los cristales.



Fig.18 Vista de la cabeza del prisma después de 30 seg. de ataque. La vaina y la parte central del prisma presentan ataque preferencial.

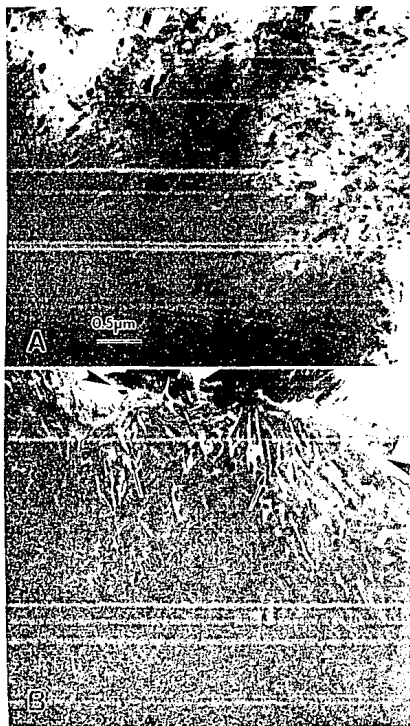


Fig. 19 Comparación entre los cristales del esmalte antes (A) y después(B) de 2 seg. de ataque ácido. Notese las formas características de los cristales ya atacados (indicados por las flechas). Las puntas de flecha indican la vaina del prisma.

material orgánico, que es el que se encuentra en las zonas intercristalinas y en las vainas de los prismas, es el primero en desaparecer puesto que el método de preparación de muestras que utilizamos no es el adecuado para preservar material orgánico y seguramente éste fue eliminado antes de su primera observación en el microscópio electrónico. Observense de nuevo las formas de donas creadas durante el ataque (indicadas por las flechas). La figura 20 muestra los cambios producidos por el ataque de 12 segundos. Esta figura ratifica el hecho de que el ataque se inicia en los espacios intercristalinos e interprismáticos. Aquí es de gran importancia analizar en detalle la forma que adquieren los cristales del esmalte después de ser atacados. La primera de ellas es que comienzan a perder su forma original y aparecen espacios intercristalinos y espacios dentro del cristal mismo (fig.21). El espacio en medio del cristal les da a los cristales una apariencia de "dona". A medida que avanza el proceso el espacio de la "dona" se aumenta y la forma que van adquiriendo los cristales es de "aguja" (fig. 20B). El contraste mostrado por la imagen de campo oscuro del esmalte atacado 12 segundos muestra la existencia de cristales completos que han resistido al ataque ácido (fig. 22). Esto nos confirma aun más la existencia de puntos preferenciales de ataque en el esmalte dental. Una de las formas resultantes importantes para nuestro estudio de la línea oscura son las "donas". Estas las podemos observar casi en todas las imagenes mostradas del esmalte atacado. Este contraste es una prueba de que la disolución de los cristales del esmalte comienza no solamente en las zonas intercristalinas sino tambien en el centro del cristal, zona donde se encuentra el defecto planar

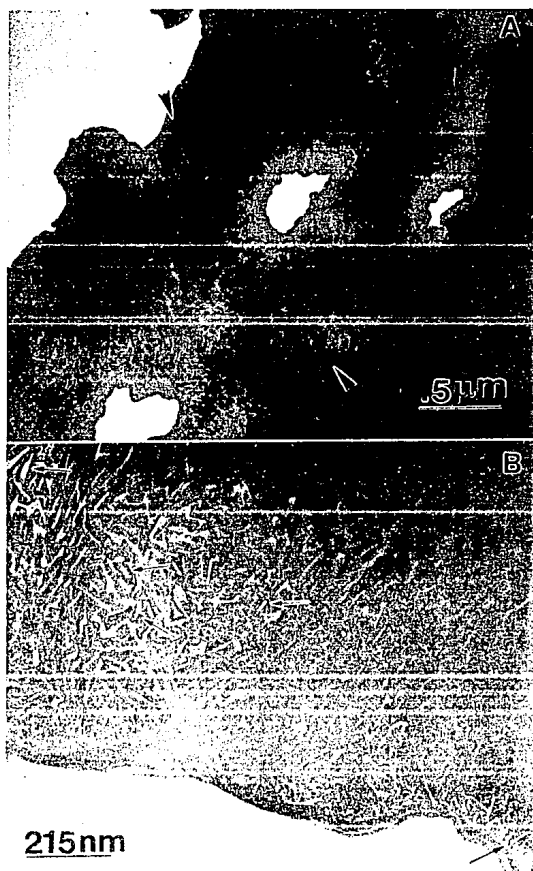


Fig.20 Imágen de la muestra del esmalte atacada por 12 segundos. Las flechas indican las formas características que adquieren los cristales después del ataque ácido. Las cabezas de flecha indican la posición de la vaina del prisma.



Fig.21 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión que comparan los cristales del esmalte antes del ataque (A) y después de 3 seg. de ataque ácido (B). Las flechas en (A) indican algunas de las líneas oscuras que se observan en los cristales. En (B) indican la forma de "dona" que adquieren los cristales después del ataque.

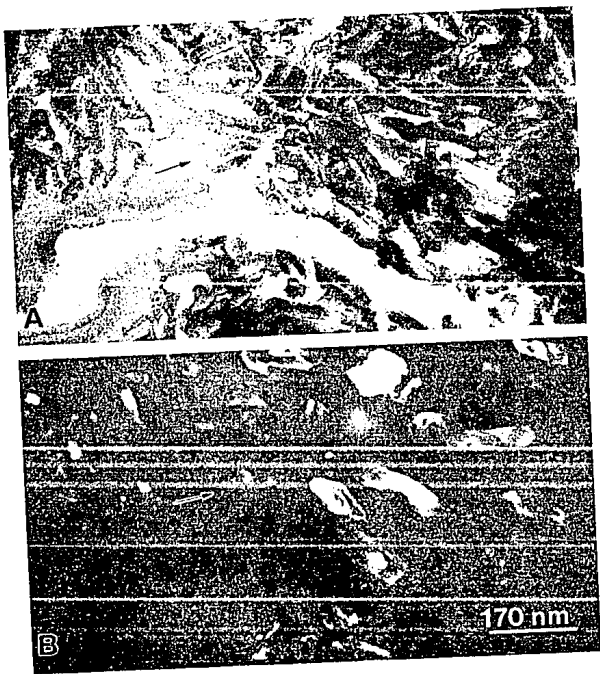


Fig.22 Imágen del campo claro (A) y campo oscuro (B) de los cristales del esmalte atacados ácidamente durante 12 seg. La imágen del campo oscuro (B) muestra la existencia de cristales completos. Las flechas indican la forma de "dona" de algunos cristales.

llamada línea oscura. En la figura 23 se muestran las imágenes de campo claro y campo oscuro de varios cristales en forma de "dona". La imagen de campo oscuro muestra que la dona es un solo cristal, el cual al inicio presentaba la línea oscura en su centro. Esto viene a demostrar una vez mas que la línea oscura representa un plano de vulnerabilidad en la estructura cristalina del esmalte.

Un estudio por difracción electrónica demostró que las agujas que se obtienen al final del proceso de ataque ácido son residuos cristalinos de hidroxiapatita. La figura 24 nos muestra el proceso de ataque ácido en diferentes tiempos y los patrones de difracción en cada uno de ellos. En la figura 24A observamos el patrón de difracción característico del esmalte. Este presenta una serie de arcos concéntricos característicos de una orientación preferencial. La figura 24B muestra el patrón de difracción de la muestra atacada durante 12 segundos y en el cual podemos observar que, aunque siguen mostrando arcos concéntricos, varios de éstos han desaparecido. La figura 24C nos muestra el patrón de difracción del esmalte atacado 30 segundos. En este caso un mayor número de arcos han desaparecido. Sin embargo las señales presentes en este caso pueden ser indexadas también a partir de la estructura de la hidroxiapatita.

4.3 Microscopía Electrónica de Alta Resolución.

Las imágenes de microscopía electrónica de alta resolución de las muestras del esmalte dental humano atacado ácidamente presentan características muy interesantes. Las cuales ya han sido



Fig.23 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de los cristales en forma de "dona" en campo claro (A) y obscuro (B).

.....

Fig. 24 Imágenes de MET y sus respectivos patrones de difracción de diferentes etapas del ataque ácido. (A) inicio del ataque; (B) después de 12 segundos de ataque; y (C) después de 30 segundos de ataque. Observe los cambios en el patrón de difracción en cada caso.

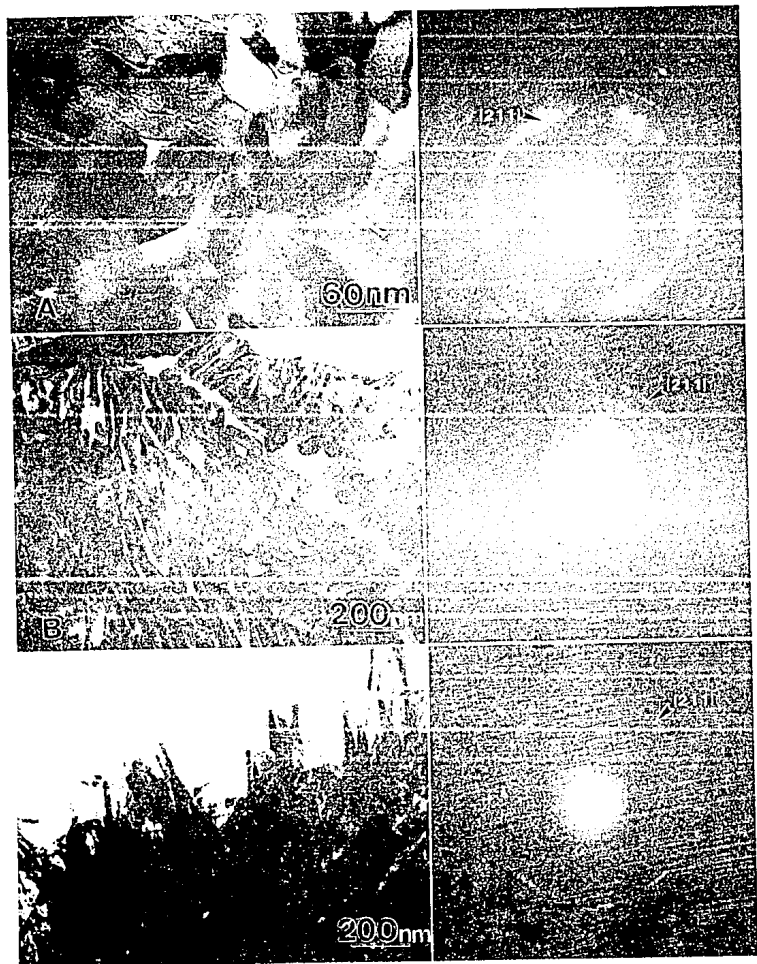


Figura 24

comentadas en trabajos anteriores.

Como mencionamos en la sección anterior uno de los contrastes del esmalte atacado que más información nos puede dar sobre la evolución del proceso de ataque en los cristales del esmalte es la forma de dona que presentan. La figura 25A muestra la imagen de campo claro de la microscopía electrónica convencional en donde se observan una densidad de cristales en forma de dona. En la figura 25B vemos la imagen de microscopía de alta resolución de una de estas donas. En la Figura 26 se muestra en mayor detalle; Primeramente se resalta el contraste característico de la estructura de la hidroxiapatita. También observamos la forma en la cual el cristal fue disuelto en su parte central.

La figura 27 muestra un hecho importante que tenemos que tomar en cuenta al momento de pensar en algún modelo que intente presentar el proceso de disolución del esmalte. La imagen corresponde a la muestra del esmalte atacada durante 12 segundos en la cual se observa la presencia de cristales no completamente disueltos. En estos podemos aun observar la línea oscura. Por lo tanto la línea oscura puede ser observada en cristales de esmalte que hayan sido parcialmente disueltos.

4.4 Ejemplo de ataque ácido: Coca Cola

Como un ejemplo de los procesos de disolución por ataque ácido ocasionado por alimentos, hemos analizado el efecto de la coca cola en el esmalte dental humano. El proceso observado fue exactamente el mismo que el reportado en las secciones anteriores de disolución por soluciones de ácido fosfórico.

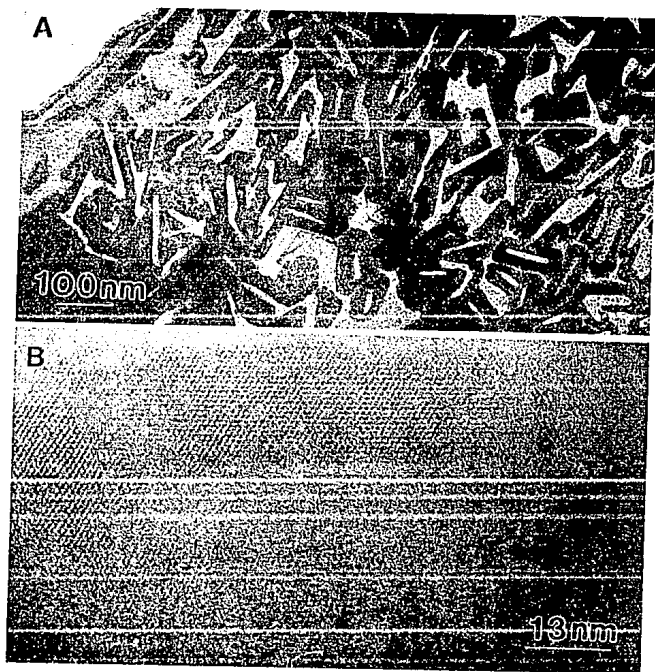


Fig.25 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión en su modo convencional (A) y en su modo de alta resolución (B) de los cristales en forma de "dona" que se presentaron después del ataque ácido.

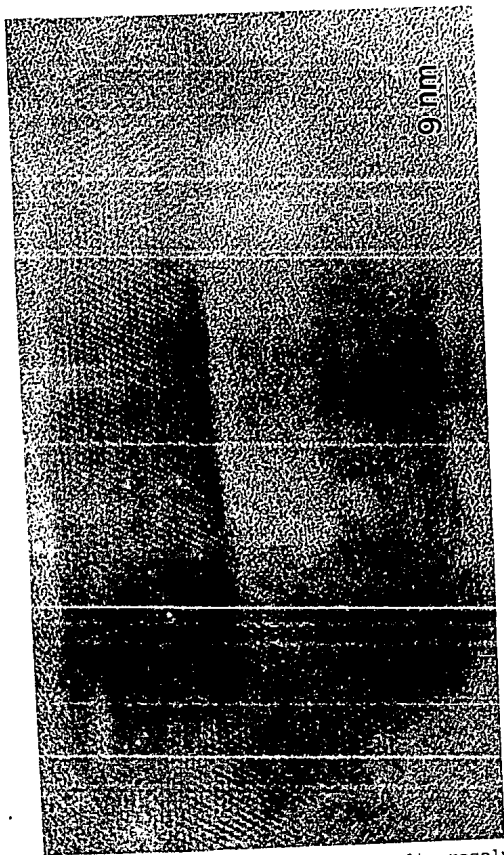


Fig.26 Imágen de microscopía electrónica de alta resolución de un cristal del esmalte en forma de dona después del ataque ácido. El contraste mostrado concuerda con el observado en hidroxiapatita en dirección $[0001]$. Las áreas claras que presenta (manchas) son producidas por el daño por radiación electrónica de transmisión.



Fig. 27 Cristales parcialmente disueltos mostrando la línea oscura (indicadas por las flechas). En B se ve una ampliificación de la zona referida en A.

Primeramente analizamos su velocidad de disolución por microscopía electrónica de barrido de la misma forma que lo hicimos con el ácido fosfórico el resultado fue impresionante. La figura 28 muestra las imágenes de microscopía de barrido de la zona atacada. A partir de estas imágenes obtenemos una velocidad de disolución de aproximadamente 1.3 nm por segundo, misma velocidad que la obtenida por la solución de ácido fosfórico con pH de 2.5 (mismo pH de la coca cola). La figura 29 muestra que el proceso de disolución del esmalte es exactamente el mismo que el comentado en las secciones anteriores. Notese la existencia de donas.

Una probable respuesta al motivo acerca del valor del pH con tal acidéz en la coca cola, es la que el agua utilizada en su elaboración no sea purificada y, por lo tanto, hay que agregar ácido al contenido de la bebida para eliminar microorganismos patógenos contenidos en el agua utilizada, atenuando el problema, y evitando infecciones gastrointestinales. Sin embargo surge un problema que es quizá más grave por ser irreversible, la disolución ocasionada al esmalte dental. Las consecuencias posteriores son ya conocidas. En ocasiones traen consigo graves problemas de salud dental sobre todo en las dietas desbalanceadas, en la falta de higiene bucal. Es menester de la empresa informar a sus consumidores sobre los efectos en cuanto a salud en general se refiere, tarea que puede realizar mediante su publicidad.

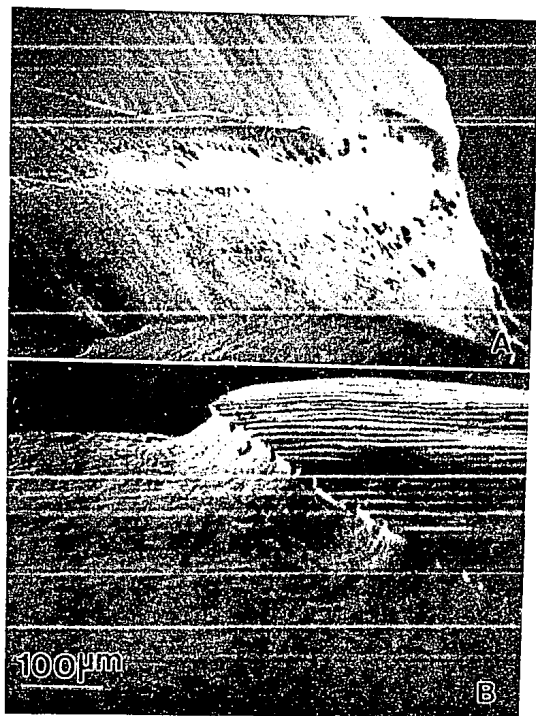


Fig. 28 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de muestra del esmalte atacada con Coca Cola en durante 48hrs. vista general; (B) perfil de disolución.



Fig. 29 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la muestra del esmalte atacado con Coca Cola. Las flechas indican la forma de dona de los cristales atacados.

DISCUSION

Los resultados del presente trabajo de tesis los podemos calificar de extraordinarios ya que nos permiten adentrarnos aun más en el conocimiento de la estructura cristalina y morfológica del esmalte. Tambien nos van a permitir obtener información adicional aunque de una manera indirecta sobre la línea oscura. El ataque ácido al que fue sometido el esmalte presenta resultados muy similares a los obtenidos en experimentos de estudio del proceso carioso. Eso significa que los mecanismos de ambos procesos son si no los mismos si muy similares. En este capítulo realizaremos los resultados que consideramos los más importantes en lo que al proceso de ataque ácido se refiere y los cuales nos daran una visión de la evolución de los cambios morfológicos que sufren los cristales de esmalte durante este ataque.

5.1 Etapas de la disolución del esmalte

Los resultados presentados en el capítulo anterior muestran que los primeros puntos de disolución por el proceso de ataque ácido son en orden de aparición los espacios interprismáticos, los espacios intercristalinos y el centro del cristal de hidroxiapatita. Es bien sabido que los espacios interprismáticos y los espacios intercristalinos están llenos de material orgánico. Tambien es conocido que durante un ataque ácido al esmalte lo primero que se disuelve es el material inorgánico dejando muchas veces el material orgánico intacto²². El hecho de que los espacios

interprismáticos sean zonas de ataque del ácido se puede explicar por el hecho de que durante el proceso de preparación de muestras todo el material orgánico presente desapareció dejando estos espacios vacíos. Por lo tanto durante el ataque, es altamente probable que el ácido se haya difundido a través de ellos y atacar la superficie del esmalte desde esos espacios. En el caso de los espacios intercristalinos, que son relativamente mucho más pequeños que los espacios interprismáticos el procedimiento de ataque es el mismo y el ácido ataca a los cristales desde estos espacios.

Con lo que respecta al ataque de los cristales del esmalte dental humano los resultados resaltan la forma de dona que estos adquieren. Este es un claro resultado de ataque preferencial en los cristales. La formación de donas en cristales del esmalte se han observado también en estudios del proceso carioso³. Y a diferencia del proceso analizado en el presente trabajo, en los estudios de esmalte con caries la disolución de los cristales es preferencial en la región prismática que en la interprismática, apoyando de nuevo el hecho de que en un proceso carioso el material inorgánico es diluido más rápidamente que el material orgánico.

La figura 30 muestra diferentes etapas en la disolución de los cristales del esmalte. El proceso de ataque se inicia en el centro del cristal siempre limitado por los planos (100), es decir la zona de la línea oscura (fig. 30A). Después de la formación del orificio central la disolución se extiende en la dirección de los planos (100) hasta obtener un tamaño de aproximadamente 7nm ,

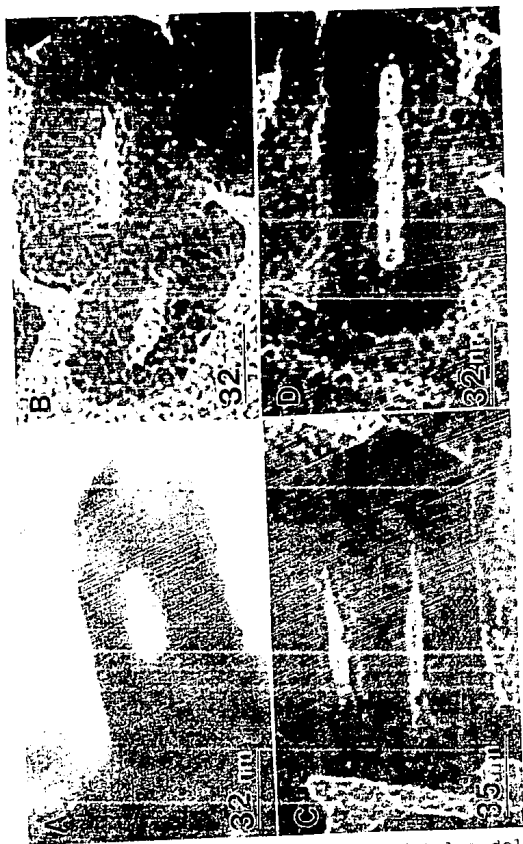


Fig. 30 Etapas de la disolución de los cristales del esmalte. Primeramente se presenta la forma de dona(A) cuyo espacio interior comienza a crecer si el ataque continúa (B). Este crecimiento puede ser en forma paralela a los planos (100) (C y D) o perpendicular a ellos.

(figs. 30 C y D), la cual corresponde a 8 veces la distancia entre planos (100). La distancia entre planos 100 es de 0.81nm.

Después la disolución se extiende hacia el extremo de los cristales de dos maneras diferentes. En una de ellas el proceso disolutivo sigue una dirección paralela a los planos (120) (figs. 30, C y D). En la otra alcanza el extremo del cristal siguiendo la dirección de los planos (100) (fig. 31 A).

En otros cristales es común observar que después de la disolución central la disolución continúa tomando cualquiera de las dos direcciones mencionadas y nos muestre una combinación de ambas. Es de esperarse que esta combinación tienda a una disolución del cristal más rápida que en el caso de una sola.

Por lo tanto podemos decir que la destrucción de los cristales del esmalte durante un proceso de ataque ácido es el resultado de la extensión de la disolución en direcciones perpendicular y paralela a los planos (100) de los cristales de hidroxiapatita.

Un resultado muy interesante del experimento reportado en este trabajo es el hecho de observar la línea oscura después de un ataque de 12 segundos en la que la mayoría de los cristales del esmalte presentan un alto grado de disolución (fig. 27). Estas imágenes podrían hacernos pensar que la línea oscura no es el punto de nucleación de la disolución del esmalte.

Sin embargo las formas de donas observadas en varias imágenes obtenidas a diferentes tiempos de ataque nos indican lo contrario:

la zona de inicio del proceso de disolución en un ataque químico es el centro del cristal y, por lo tanto, la línea oscura.

Esta aparente contradicción es fácil de resolver si pensamos en el cristal del esmalte en forma tridimensional, y por lo tanto el proceso de disolución de estos cristales también debe pensarse tridimensionalmente. Lo que sucede en este caso es que el proceso de disolución se inicia en un plano (por lo tanto bidimensional, como lo muestra la figura 32 A y debe de proseguir no solamente hacia los lados sino también en una dirección perpendicular a dicho plano (tridimensionalmente fig. 32 B). De acuerdo a esto, la figura 26 muestra el proceso de la disolución en forma tridimensional y complementa la idea mostrada por las figuras 30 y 31. A partir de analizar la figura 32 el hecho de que se observen cristallitos que presentan la línea oscura después de un ataque ácido es normal.

La evolución de la disolución continúa creando aberturas laterales en el cristal y produce la fragmentación del cristal al desaparecer partes importantes de este (fig. 32), de la forma reportada experimentalmente en este trabajo (figs. 30 y 31).

En todos los casos analizados la disolución comienza por el centro del cristal y se extiende anisotrópicamente a lo largo del eje C. Esta observación concuerda completamente con las observaciones realizadas a los cristales del esmalte con una lesión cariosa³. El hecho de que evolucione a lo largo del eje C nos indica que avanza a travez del plano que forma la línea oscura.

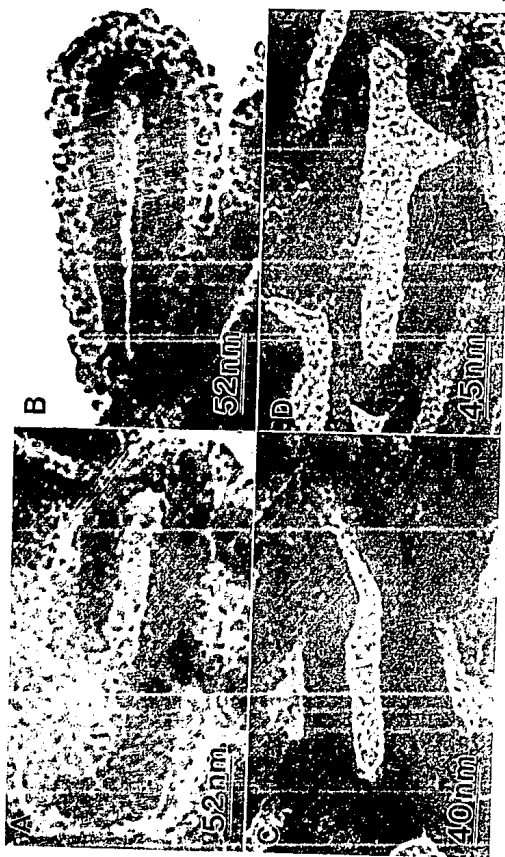


Fig. 31 Etapas de la disolución de los cristales del esmalte. Crecimiento del espacio interior de las donas en dirección perpendicular a los planos (100) (A) o paralelo a ellos (B). Conforme el ataque ácido continúa, los cristales pierden la forma de dona y en algunos casos, los espacios interiores de donas vecinas se unen (C y D).

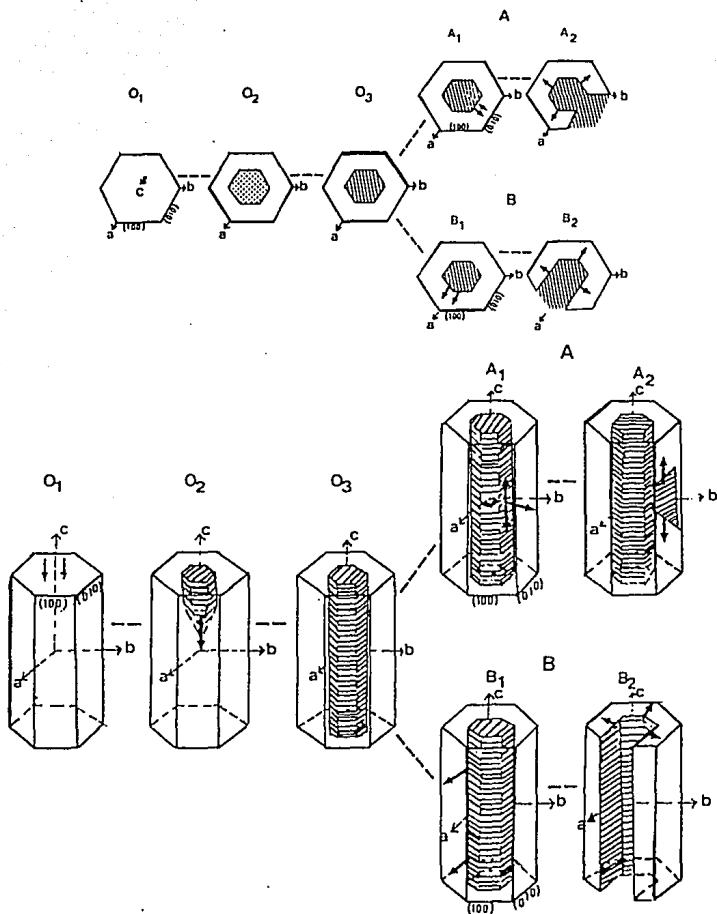


Fig. 32 Modelo de las etapas de la disolución de los cristales del esmalte durante el ataque ácido. (A) visto en la dirección $[0001]$, (B) visto en la forma tridimensional.

CONCLUSIONES

1. El estudio por microscopia electrónica del proceso de disolución del esmalte dental humano ocasionado por un ataque ácido ha mostrado que se inicia en el centro de los cristales. Esta zona corresponde a la línea oscura presente en todos los cristalitos de esmalte. Por lo tanto se concluye que durante el proceso de ataque ácido un punto de vulnerabilidad de los cristales del esmalte lo representa la línea oscura.
2. Después de la nucleación de la lesión central de los cristales del esmalte, la disolución evoluciona en forma paralela y/o perpendicular a los planos (100) de la hidroxiapatita. El mecanismo de disolución es altamente anisotrópico y, tomando en cuenta la tridimensionalidad de los cristales, es posible observar las líneas oscuras de los cristales parcialmente disueltos.
3. Las etapas de la disolución del esmalte dental humano observadas en un ataque ácido son exactamente las mismas que las reportadas en los análisis del estudio morfológico de los cristales de esmalte con lesión cariosa. Esto demuestra que el mecanismo es muy similar en ambos procesos.
4. El ejemplo del ataque con Coca Cola mostró las mismas etapas de disolución que en el caso de la solución de ácido fosfórico de pH 2.5 y por lo tanto una velocidad de disolución de aproximadamente 1nm por segundo.
5. El experimento llevado a cabo en el presente trabajo no nos permite comentar sobre el comportamiento del material orgánico durante este proceso.

BIBLIOGRAFIA

1. C.M. Alcántara Rodríguez. CARACTERIZACION DEL ESMALTE DENTAL HUMANO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION. Tesis de Licenciatura. Odontología UNAM, 1993
2. A.M. González Trejo, A. Madrigal Colín. ANALISIS ESTRUCTURAL Y QUIMICO DEL ESMALTE DENTAL HUMANO POR TECNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA. Tesis de Licenciatura. Odontología UNAM, 1994.
3. J.C. Voegel y R.M. Frank. STAGES IN THE DISSOLUTION OF HUMAN ENAMEL CRYSTALS IN DENTAL CARIES. Calcified Tissue Research. 24,19-27 (1977).
4. Ten Cate. HISTOLOGIA ORAL. Panamericana. 1986.
5. R. Zapanta LeGeros. CALCIUM PHOSPHATES IN ORAL BIOLOGY AND MEDICIN. Ed. Howard M. Myers, San Francisco California 1991.
6. E.F. Bress, J.C. Barry, J.L. Hutchinson. A STRUCTURAL BASIS FOR THE CARIES DISSOLUTION OF THE APATITE CRYSTALS OF HUMAN TOOTH ENAMEL. Ultramicroscopy 12, 367 (1984).
7. Brown. W.E.(Ed): PHYSICOCHEMICAL MECHANISM OF THE DENTAL CARIES. Journal Dental Research. 53, 155-318.
8. ETIPIATOGENIA Y PROFILAXIS DE LA CARIES DENTAL. Asociación Dental Mexicana.
9. T. George Rochow, E.George Rochow. AN INTRODUCTION TO MICROSCOPY BY MEANS OF THE LIGHT, ELECTRONS, X-RAY OR ULTRASOUND.
10. J.Reyes Gasga. MANUAL PARA LOS USUARIOS DEL LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA. UNAM 1987.
11. Staple. P.H. ADVANCES IN ORAL BIOLOGY. New York, Academic Press, Inc; vol 1.
12. Woldstenholme, C.E.W. and O'Connor (Eds.). CARIES RESISTANT TEETH. Boston Little, Brown & Company.
13. Sognnaes, R.F. CHEMESTRY AND PREVENTION OF DENTAL CARIES. Springfield, Charles Thomas.
14. Eugene P. Lazzari. BIOQUIMICA DENTAL. Interamericana, p.p.236-248.
15. Gray. J.A. KINETICS OF THE DISSOLUTION OF HUMAN DENTAL ENAMEL IN ACID. Journal of Dental Research. 41, 633-45.
16. Gray J.A. and Francis M.D. Physicalchemistry of Enamel Disolution in MECHANISM OF HARD TISSUE DESTRUCTION. (Ed. Sognnaes, F.) American Association for the Advancement of Science. pp 213-260.
17. Rosenberg J.L. QUIMICA GENERAL. 6a. Edición. McGraw Hill.

18. Fox. J.L. , Higuchi, W.I. TWO SITE MODEL OF HUMAN DENTAL ENAMEL. Journal Dental Research. 53, 939.

19. Higuchi W.I., Gray J.A., Heflerren and Patel. MECHANISM OF ENAMEL DISSOLUTION IN ACID BUFFERS. Journal of Dental Research 41, 633-45.

20. Phillips. LA CIENCIA DE LOS MATERIALES DENTALES. Ed Interamericana. 6a. Ed.

21. L.M. Silverstone. THE SIGNIFICANCE OF REMINERALIZATION IN CARIES PREVENTION. Associate Dean for Research. 157-167.

22. L.M. Silverstone. DYNAMIC FACTORS AFFECTING LESION INITIATION AND PROGRESSION IN HUMAN DENTAL ENAMEL.II. SURFACE MORPHOLOGY OF SOUND ENAMEL AND CARIESLIKE LESIONS OF ENAMEL. Oral Science Research Center. School of Dentistry.