



Especialidad en Microscopía Electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESPECIALIDAD EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA APLICADA A LAS
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EVALUACIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y
TRANSMISION ANALÍTICA DE UN ADHESIVO DENTAL DOPADO
CON NANOPARTÍCULAS DE ZnO PARA SU POTENCIAL USO EN
LA ODONTOLOGÍA**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para obtener el título de

Especialista

PRESENTA

M. en C.O. César Rodríguez Cruz

DIRECTOR DE TESINA

Dr. Jesús Ángel Arenas Alatorre
Instituto de Física

Asesor: Dr. Carlos Alvarez Gayosso
Posgrado Biomateriales Dentales

C. Universitaria Cd., Mx. Marzo 2023





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 esta 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.



Contenido

➤ RESUMEN	5
➤ INTRODUCCIÓN	6
1.- ANTECEDENTES	6
1.1 Nanociencia y nanotecnología	6
1.2.- Mecanismo de síntesis de NPs por química verde	8
1.3.- Nanopartículas de óxido de zinc (NPs-ZnO)	10
1.4.- Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	12
1.5.- Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)	13
1.6.- Esmalte dental	15
1.6.1 Propiedades físicas	16
1.6.2 Composición química	16
1.7.- Fluoruro	16
1.8.- Fluorosis dental	17
1.9.- Máquina universal de pruebas mecánicas	19
2.- JUSTIFICACIÓN	20
3.- OBJETIVOS.....	21
3.1.- Objetivo general	21
3.2.- Objetivos específicos	21
4.- HIPÓTESIS	21
5.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1.- Lugar de obtención de las muestras	22



5.2.- Estudio del diseño	22
5.3.- Selección de la muestra	22
5.3.1.- Criterios de Inclusión: premolares evaluados <i>Índice de fluorosis de Thylstrup and Ferjeskov</i> . (Figura 7).....	22
5.3.2.-Criterios de Exclusión.....	22
5.3.3.- Criterios de Eliminación	22
5.4.- Número de la muestra	22
5.5.- Descripción operacional y conceptual de las variables	23
5.5.1.- Variable independiente	23
5.5.2.- Variables dependientes.....	23
6.- METODOLOGÍA	23
6.1.- Síntesis de las NPs-ZnO por química verde.	23
6.2.- Obtención del extracto acuoso de <i>Dysphania ambrosioides</i>	23
6.3.- Síntesis de NPs-ZnO usando el procedimiento de química verde.....	25
6.4.- Caracterización de las NPs-ZnO	25
6.5.- Preparación de las nanopartículas de ZnO	26
6.6.- Recolección y preparación de los órganos dentarios	26
6.7.- Preparación de las muestras dentales para conocer la cantidad de Ca y P en SEM de bajo vacío.....	27
6.8.- Preparación del adhesivo dental.....	27
6.9.- Preparación de las muestras con el adhesivo.....	28
6.10.- Esfuerzo de adhesión por desalajo.....	28
6.11.- Preparación de las muestras dentales para la observación de la interfase adhesiva-dental.	29
7.- RESULTADOS	31
7.1.- EDS en esmalte dental con concentraciones de P y Ca	31
7.2.- Observación por LV-SEM del esmalte sano, dañado por fluorosis leve y moderado.....	32
7.3.- Observación de las electromicrografías del ZnO en el SEM	34



7.4.- Interface esmalte-adhesivo.....	35
7.5.- Nanopartículas (NPs) de ZnO en TEM.....	36
7.6.- Estadística descriptiva de los análisis EDS.....	37
7.7.- Estadística inferencial	38
8.- DISCUSIÓN	40
9.- CONCLUSIONES	42
10.- PERSPECTIVAS	42
11. – REFERENCIAS GENERALES	43
12.- REFERENCIA DE FIGURAS.....	46



➤ RESUMEN

En la presente investigación evaluamos un adhesivo dental experimental dopado con diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) con la técnica de química verde, además de conocer los elementos que componen la superficie del esmalte sano, con fluorosis leve y moderada, y finalmente realizamos el esfuerzo de adhesión en las diferentes superficies del esmalte.

Utilizamos el microscopio electrónico de transmisión (TEM) y el microscopio electrónico de barrido (SEM) para la caracterización de NPs ZnO, a su vez conocimos los elementos de los cuales se compone la superficie del esmalte sano (control), y con fluorosis leve y moderada mediante el 5rtodónt de espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (EDS rayos X), evaluamos el esfuerzo de adhesión por medio de la maquina universal de pruebas mecánicas.

La caracterización mediante el SEM mostró que el tamaño de las nanopartículas de ZnO son del orden de 5 a 30 nm., y de forma cuasiesférica, el 5rtodónt de EDS de rayos X demostró ser mayor el elemento de P y Ca en esmalte con fluorosis leve comparado con el grupo control (sano) no encontrando diferencias estadísticamente significativas. Mediante el TEM se determinó su estructura cristalina (estructura hexagonal, grupo espacial P63mc.). La resistencia de adhesión mediante la maquina universal de pruebas mecánicas demostró ser mejor la concentración de 0.025% en los tres grupos de esmalte 5rtodó mejoro en la superficie con fluorosis leve y moderada (15.15 Mpa. Y 12.75Mpa.), mientras que en esmalte sano disminuyo (9.65Mpa).



➤ INTRODUCCIÓN

La microscopía electrónica en sus diferentes modalidades, barrido (SEM, por sus siglas en inglés) y de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) son herramientas que han permitido profundizar en el conocimiento de diferentes áreas de las ciencias biológicas y de ciencia de materiales. Con los alcances de resolución de hoy en día, 0.5 nm para un SEM y 0.05 nm en un TEM, y las capacidades analíticas asociadas, como son la Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS, por sus siglas en inglés), Espectroscopia por Dispersión de Longitud de Onda (WDS, por sus siglas en inglés) y Espectroscopia por Pérdida de Energía de Electrones (EELS, por sus siglas en inglés), hacen de la técnica una herramienta muy importante desde el punto de vista de la ciencia y de su uso en medicina y el sector productivo. En particular en este trabajo se pretende mostrar el potencial del SEM y TEM, en el estudio de un adhesivo dopado con nanopartículas de ZnO para su potencial uso en el tratamiento de órganos dentarios con fluorosis para su restauración operatoria, protésica y/o ortodóntica. A continuación se presenta el marco teórico relacionado con el tema de investigación.

1.- ANTECEDENTES

1.1 Nanociencia y nanotecnología

La nanociencia surge como el estudio de los fenómenos y el manejo de materiales a escala nanométrica. La nanotecnología involucra el diseño, la caracterización y la aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a escala nanométrica¹ (Figura 1).

La nanociencia y la nanotecnología son áreas relativamente nuevas de investigación en el estudio de los materiales, permiten estudiar fenómenos que ocurren a nivel atómico y molecular. La importancia de la nanotecnología radica en



que en el mundo nanométrico los materiales pueden adquirir o realzar propiedades diferentes a las que tienen a escala macroscópica.

Las referencias iniciales a la nanotecnología fueron presentadas en 1959 por el físico norteamericano Richard Feynman en una conferencia titulada: “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”, en la cual vislumbró la posibilidad de manipular materiales a escala atómica y molecular. El término “nanotecnología” fue usado por primera vez en 1974 por Norio Taniguchi, un investigador de la Universidad de Tokio, quien señalaba así la capacidad de manejar materiales a nivel nanométrico. El rango de tamaño de mayor interés para la nanociencia y las nanotecnologías es de 1 – 100 nm, a esta escala los materiales pueden realzar sus propiedades o adquirir otras totalmente diferentes².

Los nanomateriales son aquellos materiales con unidades estructurales básicas como granos, fibras, partículas u otros componentes que al menos en una dimensión son más pequeñas de 100nm. Estos nanomateriales pueden ser ensamblados de tal manera que además de la reducción del tamaño, también se favorece una mayor superficie de contacto dando lugar a propiedades fisicoquímicas superiores (mecánicas, eléctricas, magnéticas, ópticas, catalítica, etc.) favoreciendo el desarrollo de aplicaciones en campos tan diversos como la medicina, electrónica, informática, etc³. A estas escalas, la microscopía electrónica SEM de emisión de campo y TEM, son de las pocas técnicas que nos pueden proporcionar información.

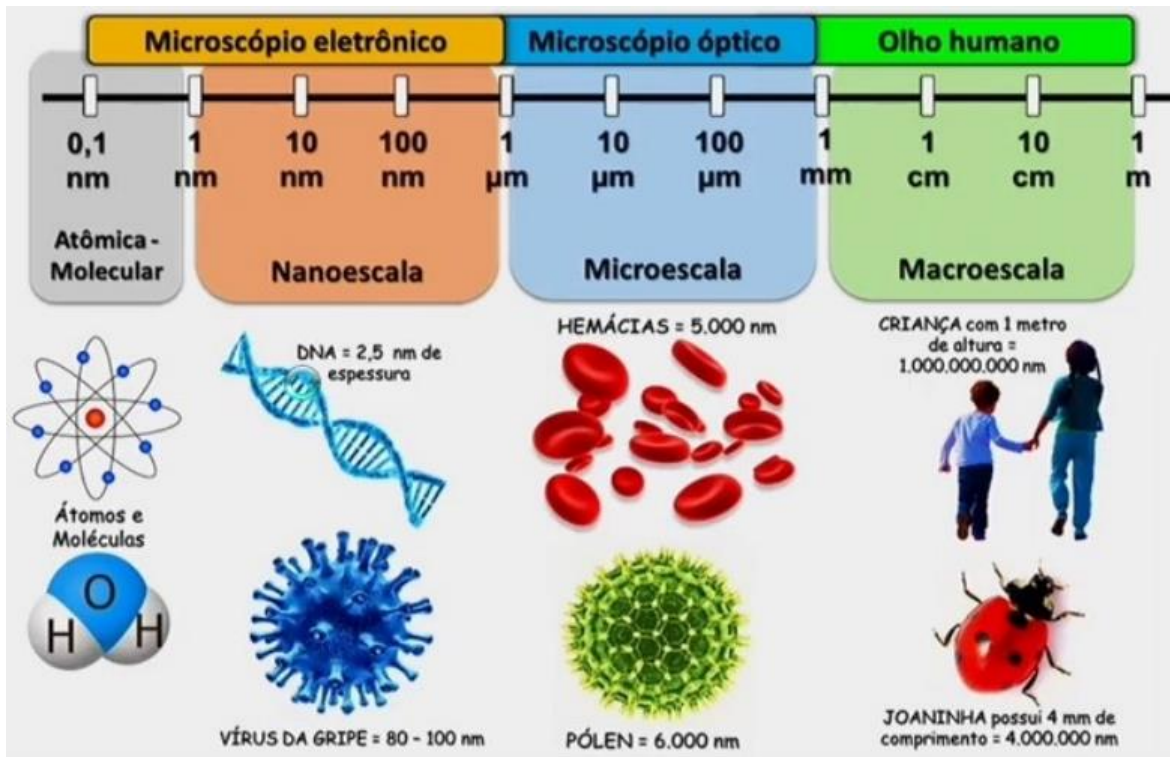


Figura. 1 Ejemplos de organismos y su tamaño algunos de tamaño nanométrico. (1)

Entre los métodos de síntesis de los nanomateriales están los métodos físicos y los químicos. Entre los primeros, están el método de pulverización catódica (“sputtering”) y el de evaporación al alto vacío. Entre los segundos tenemos el método coloidal, el de coprecipitación, reducción química y más recientemente química verde, entre otros. En particular este último método, el cual es ambientalmente favorable, fue el que se utilizó en la síntesis de las nanopartículas de ZnO. A continuación, una breve descripción de ella⁴.

1.2.- Mecanismo de síntesis de NPs por química verde

Varios metabolitos de plantas, incluyendo terpenos, polifenoles, azúcares, alcaloides, ácidos fenólicos y proteínas, juegan un papel importante en la biorreducción de iones metálicos, produciendo NPs, actuando de manera conjunta⁸⁻¹⁰.



La disociación de un protón del grupo hidroxilo de los terpenos da como resultado la formación de estructuras resonantes capaces de una mayor oxidación. Este proceso va acompañado de la reducción activa de iones metálicos, seguida de la formación de NPs¹⁰.

Los flavonoides son un gran grupo de compuestos polifenólicos que pueden quelar y reducir activamente los iones metálicos en NPs al contener varios grupos funcionales capaces de la formación de estas estructuras. Las transformaciones estructurales de los flavonoides pueden liberar un átomo de hidrógeno reactivo que puede reducir los iones metálicos para formar NPs, por lo que están involucrados en la nucleación, etapa inicial de su formación y una mayor agregación¹⁰.

Los azúcares presentes en los extractos de plantas también pueden inducir la formación de NPs. Los monosacáridos tales como la glucosa pueden actuar como agentes reductores, el grupo aldehído del azúcar se oxida en un grupo carboxilo a través de la adición de grupos hidroxilo que a su vez conduce a la reducción de iones metálicos y a la síntesis de las NPs¹⁰.

Las proteínas facilitan la formación de NPs a partir de iones metálicos debido a su alta actividad reductora y potencial para atraer iones metálicos a las regiones de una molécula responsable de la reducción, pero su actividad quelante no es excesiva. Los aminoácidos de una proteína pueden afectar en gran medida el tamaño, la morfología y la cantidad de NPs que se generan por lo que desempeñan un papel muy importante en la determinación de su forma y afectan su rendimiento¹⁰.

En general, el mecanismo de síntesis incluye tres fases principales¹⁰

(Figura 2):

1. Fase de activación: en la cual ocurren la reducción de iones metálicos y nucleación.
2. Fase de crecimiento: durante la cual las pequeñas NPs adyacentes se fusionan espontáneamente en partículas de mayor tamaño formando agregados.
3. Fase de terminación: donde se determina la forma final de las nanopartículas.

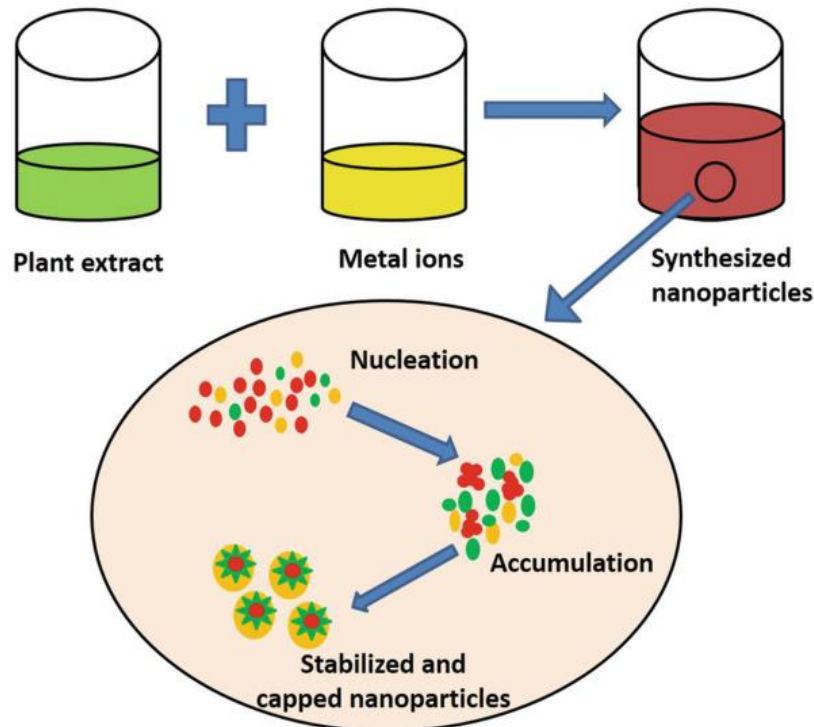
Plant extract mediated synthesis of nanoparticles (extracellular route)

Figura. 2 Mecanismo de síntesis de NPs por química verde. (2)

1.3.- Nanopartículas de óxido de zinc (NPs-ZnO)

Las NPs-ZnO son químicamente inertes, poco solubles en agua, además de que poseen alta resistencia mecánica y baja toxicidad.

El ZnO es útil como matriz para transportar y estabilizar fármacos, posee propiedades terapéuticas sobre las irritaciones y heridas superficiales por su efecto astringente y antibacterial. Para las lesiones y quemaduras en piel se aplica en polvo y en cremas sobre la parte afectada, quedando una fina capa protectora. En el proceso de cicatrización el zinc forma parte de las metaloproteinasas implicadas en la reparación celular en el sitio de la lesión por degradación de colágeno y facilitan la migración de queratinocitos. La administración de ZnO tanto oral como tópica a personas con niveles bajos de este metal en sangre y tejidos, mejora los procesos de regeneración celular y aceleran la reparación de heridas en la piel.



Posee alta absorción óptica a los rayos UVA (315-400nm) y regiones UVB (280-315nm) lo que es beneficioso en la respuesta antibacteriana y se usa como protector UV en cosméticos¹¹.

Uno de los métodos que se están investigando para sintetizar las NPs-ZnO es por medio de proceso de química verde donde se utilizan extractos de plantas como medio reductor para obtenerlas. Por ejemplo al utilizar extractos de la alga marina café *Sargassum muticum* con lo que se logró obtener NPS-ZnO en un intervalo de tamaño de 30-57nm¹², con la especie vegetal *Ocimum basilicum* se logró obtener un tamaño promedio de 14.28nm¹³, con la especie *Eichhornia crassipes* lograron sintetizar las NPs en un tamaño promedio de 32nm¹⁴ y con la especie *Aloe barbadensis* obtuvieron NPs en un rango de 25-40nm¹⁵, todas ellas de forma esférica y estructura cristalina hexagonal, con la especie *Corymbia citriodora* lograron sintetizar NPs de tamaño promedio de 64nm, de estructura cristalina hexagonal y en forma de poliedro¹⁶.

En cuanto a su actividad antibacteriana, NPs-ZnO de tamaño entre 25-40nm han tenido efecto antibacteriano contra distintas especies bacterianas como *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* y *Citrobacter freundii* a concentraciones de 0.8mM, 1.8mM, 1.2mM y 2mM respectivamente¹⁷, NPs-ZnO de tamaño menor a 50nm han inhibido el crecimiento de bacterias como *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* a la concentración de 1M¹⁸, NPs-ZnO entre 15 y 30nm han tenido efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* a la concentración de 25µg/mL¹⁹, a una concentración de 20µg/mL han inhibido el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Bacillus megateriu*, *Sarcina lutea*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*²⁰ y NPs-ZnO de 57nm han inhibido el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 25µg/mL²¹.



1.4.- Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

El Microscopio Electrónico de Barrido es un instrumento cuyo funcionamiento se basa en el barrido de la superficie de un espécimen, por medio de un haz de electrones cuyo diámetro es disminuido entre 4 nm y 200 nm. Después de que el haz de electrones interacciona con la muestra, se generan varios tipos de señales, las cuales son colectadas por un detector específico para cada una de ellas. Finalmente se produce una imagen en el monitor que puede ser almacenada digitalmente. El SEM surge de la necesidad de observar detalles muy pequeños que no son posibles de resolver con la longitud de onda de la luz visible (380 nm a 750 nm). El SEM usa electrones acelerados con una longitud de onda de 2800 veces menor que la de la luz, lo que permite obtener resoluciones de entre 3 nm y 4 nm.

La parte principal de un microscopio electrónico de barrido es la denominada columna de electrones la cual lleva alojados en su interior los siguientes elementos (figura 3):

- 1) Un cañón de electrones con un filamento que actúa como emisor o fuente de iluminación, por analogía con un sistema óptico el cual es una lámpara.
- 2) Un sistema de lentes electromagnéticas encargado de focalizar y reducir a un diámetro muy pequeño el haz de electrones producido por el filamento.
- 3) Un sistema de barrido que hace recorrer el haz de electrones ya focalizado por la superficie de la muestra.
- 4) La cámara del espécimen
- 5) Uno o varios sistemas de detección que permiten captar el resultado de la interacción del haz de electrones con la muestra y transformarlo en una señal eléctrica.
- 6) Una salida conectada a una o varias bombas que producen el vacío necesario para que el conjunto funcione adecuadamente²².

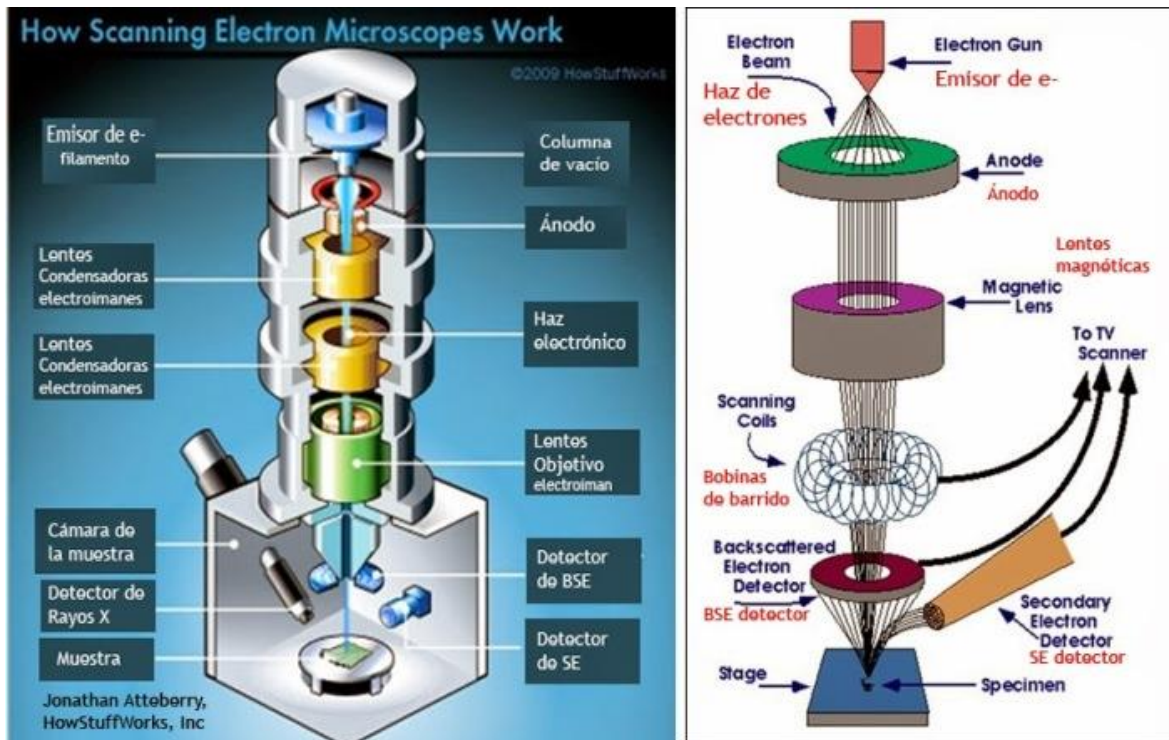


Figura. 3 Partes del microscopio electrónico de barrido (SEM) y espectrómetro. (3)

1.5.- Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)

Esta es una técnica en la que un haz de electrones es transmitido a través de un espécimen ultra delgado (~100 nm de grosor). La información que se usa es la de los electrones transmitidos; la imagen se magnifica y se enfoca por lentes magnéticas, y posteriormente se forma la imagen en una pantalla fluorescente. La resolución de los microscopios electrónicos también está determinada por el diámetro del haz de electrones. De esta manera se han desarrollado microscopios de alta resolución, cuya distancia de punto a punto puede ser de 0.19 nm, logrando magnificaciones de 8 000 000 X.

En TEM, la muestra cristalina interactúa con el haz de electrones, en su mayoría por difracción más que por absorción. La intensidad de la difracción depende de la orientación de los planos de los átomos en un cristal en relación con el haz de electrones. A ciertos ángulos, el haz de electrones es difractado fuertemente desde el eje del haz entrante, mientras que a otros ángulos el haz es en gran parte transmitido. Los TEM modernos están equipados con porta muestras que permiten



inclinarse el espécimen en un rango de ángulos que permiten obtener condiciones de difracción específicas. Por ello, se puede formar una imagen de alto contraste, bloqueando los electrones desviados fuera del eje óptico del microscopio mediante la colocación de la apertura, para permitir solamente los electrones no dispersados. Esto produce una variación en la intensidad electrónica que revela información sobre la estructura del cristal. Esta técnica, sensible a defectos en la red cristalina ampliada, es conocida como campo claro o campo luz, (Figura 4). También es posible producir una imagen de electrones desviados por un plano cristalino particular, lo cual se conoce como imagen de campo oscuro²².



Figura. 4 Microscopio electrónico de transmisión (TEM) de alta resolución campo oscuro (HAADF siglas en inglés) JEM 2010 FEG.

1.6.- Esmalte dental

El esmalte dental cubre a manera de casquete a la dentina en su porción coronaria ofreciendo protección al tejido conectivo subyacente integrado en el sistema dentino-pulpar. Es el tejido más duro del organismo debido a que estructuralmente está constituido por millones de prismas altamente mineralizados que lo recorren en todo su espesor, desde la conexión amelodentinaria a la superficie externa²³. La dureza del esmalte se debe a que posee un porcentaje muy elevado (95%) de matriz inorgánica y muy bajo (0.36 a 2%) de matriz



orgánica. Los cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) constituidos por fosfato de calcio representan el componente inorgánico del esmalte²⁴⁻²⁵.

Existen características que lo hace un tejido único, entre estas encontramos:

- ✚ Embriológicamente deriva del órgano del esmalte
- ✚ Los ameloblastos son las células que lo forman (células secretoras del esmalte) cuando terminan de formarlo involucionan y desaparecen durante la erupción dentaria por apoptosis.
- ✚ El esmalte maduro no contiene células ni prolongaciones
- ✚ Incapaz de repararse²⁶.

1.6.1 Propiedades físicas

- ✚ Dureza
- ✚ Elasticidad
- ✚ Color y transparencia
- ✚ Permeabilidad
- ✚ Radiopacidad

1.6.2 Composición química

- ✚ Matriz orgánica, (1-2%): de naturaleza proteica, amelogeninas, tuftelina, enamelinas, ameloblastinas y parvalbumina.
- ✚ Matriz inorgánica, (95%): sales minerales calcio y fosfato que se cristalizan formando hidroxiapatita entre otros.
- ✚ Agua: se localiza en la periferia del cristal constituyendo la capa de hidratación, la cantidad de agua disminuye progresivamente con la edad.

1.7.- Fluoruro

El flúor es un gas en su forma natural, sin embargo es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza, se une a metales y puede reaccionar fácilmente a los compuestos que contienen hidrógeno como el agua, amoniaco, etc., en el área de la salud tiene una mayor utilidad en el prevención de caries dental gracias a su efectividad en la remineralización del esmalte, fue postulada en la década del 40, su uso ha sido ampliamente aceptado y practicado²⁷. Con ese fin se le utiliza en



formas locales aplicadas directamente sobre la dentadura y en formas sistémicas que deben ser ingeridas. Los programas de fluorización artificial del agua de consumo humano, a la concentración de 1 ppm (1 mg/l), se ha considerado de importante beneficio en salud pública y desde que se comenzó su utilización, se reconoció su probable efecto tóxico asociado a su uso sistémico²⁸.

1.8.- Fluorosis dental

La Fluorosis dental fue definida como una patología endémica por Dean (1942) quien con sus estudios epidemiológicos encontró la relación entre la ausencia de caries y la presencia de fluoruro y al mismo tiempo se reportó una prevalencia de fluorosis del 10% lo cual se consideró normal en aquella época.

La fluorosis dental es el primer signo de sobredosis de fluoruro, afecta a la población infantil y adolescente de varias regiones del mundo se presenta en 80.9 % en población con agua con fluoruro y en un 42 % en población con agua no fluorada²⁹.

Los órganos dentarios con fluorosis tienen alterada su estructura, composición y apariencia (Figura. 5). Los niveles de fluoruro tienden a ser más altos ya que esta región es la más cercana al suministro del biofilm dental³⁰⁻³¹.

La fluorosis ocurre cuando el fluoruro interactúa con los tejidos durante la mineralización, alterando este proceso, se trata de una hipomineralización de la superficie, particularmente en el esmalte, con un incremento en la porosidad y una apariencia opaca, extendiéndose hasta la dentina en los casos más severos.



Figura.5 Fluorosis dental (4)

La causa más probable de la porosidad superficial es el retraso en la hidrólisis y remoción de las proteínas del esmalte, debido al efecto directo del fluoruro sobre los ameloblastos o a una interacción del fluoruro con las proteinasas en la matriz en formación, particularmente las amelogeninas, durante la maduración del esmalte.

El mecanismo específico por el cual el fluoruro produce los cambios que llevan a la fluorosis del esmalte no ha sido bien definido. Las etapas más sensibles a la exposición al fluoruro durante la formación del esmalte, parece ser la fase de maduración temprana. El desarrollo de la fluorosis depende en gran parte a la dosis, duración y tiempo de exposición al fluoruro. El riesgo de fluorosis es menor cuando la exposición se da solo durante la fase secretoria, pero mayor cuando la exposición ocurre durante ambas fases, secretoria y maduración.

El contenido de fluoruro en los tejidos, refleja el fluoruro biológicamente disponible en la formación dental. Estudios realizados acerca de los posibles mecanismos de depósito en el organismo, específicamente en los tejidos dentales señalan tres posibles vías de acceso para la incorporación de fluoruro en los dientes:

- ✚ Vía endógena: esta vía provee especialmente el fluoruro para ser incorporado a los tejidos duros en todas las fases de formación de la corona (fase pre-eruptiva). Esta incorporación se hace en forma de centrifuga, desde la pulpa hacia la cual el ion es transportado por la sangre.
- ✚ Vía exógena: incorporación del fluoruro a la superficie del esmalte de los dientes ya erupcionados. Es una vía que actúa en forma de centrípeta, a partir del contacto de los fluoruros con la superficie externa del esmalte.
- ✚ Vía mixta: el fluoruro puede abordar la superficie del esmalte antes y después de su erupción. Es la que se consigue mediante la fluoración; ya que puede incorporarse a la totalidad del diente desde las etapas de crecimiento y calcificación. Una vez formada la corona, puede haber una

incorporación superficial, durante la etapa pre-eruptiva y una complementaria. Se dice que la principal incorporación de fluoruro se da durante la etapa eruptiva, esta incorporación del fluoruro en el esmalte sano es débil.

1.9.- Máquina universal de pruebas mecánicas

- ✚ Es un instrumento utilizado para exámenes a tracción y compresión. Este es un soporte para ensayos hasta 1 kN con una columna regulable en altura para alojar muestras de hasta 530 mm de longitud y posibilitar el alargamiento de muestras más pequeñas. Para esto se utiliza un dinamómetro que es un instrumento utilizado para medir fuerzas. El esfuerzo se da cuando se aplica una fuerza sobre un material, esto opone una resistencia a la fuerza externa. La fuerza se distribuye en una superficie. El esfuerzo es la fuerza por unidad de superficie. Por consiguiente, para una fuerza determinada, cuanto menor sea la superficie sobre la que actúa, mayor será la magnitud de la tensión³² (Figura 6).
- ✚ Se denomina resistencia al esfuerzo cuando se produce la rotura de un material, si la fractura se debe a la tracción se le llama resistencia a la tracción, si se debe a la compresión, se llama resistencia a la compresión. La adhesión entre dos materiales suele medirse durante la tracción o el cizallamiento, y se expresa como la fuerza necesaria para romper dicha unión o adhesión. Dependiendo del sistema, la unión puede ser química, mecánica o mixta. Los adhesivos que unen las resinas al esmalte tienen un esfuerzo adhesivo de 700 a 3.500 lbs/in² o 5-24 MPa, esta unión se debe a la difusión del adhesivo sobre la capa superficial del esmalte grabado.



Figura. 6 Máquina universal de pruebas mecánicas (Instron)



2.- JUSTIFICACIÓN

La fluorosis dental es una alteración de los dientes, causada por la ingestión crónica de fluoruro durante su desarrollo³³. Además es un problema endémico de salud pública que afecta a la población infantil y adolescente de varias regiones del mundo.

Actualmente la población no solo demanda tratamientos restaurativos, sino tratamientos que mejoren su estética, como lo es el uso de tratamientos de carillas de porcelana, resinas compuestas, o coronas completas de porcelana, el éxito de este tipo de tratamientos depende de la unión adecuada al esmalte o bien a la dentina³⁴, así como también evitar una caries secundaria por contracción de la resina y/o formación de placa dentobacteriana por una superficie muy rugosa. El uso de nanopartículas en la odontología ha sido muy estudiado en cuanto al efecto antibacterial y la fuerza de adhesión, la mayoría de estos estudios están enfocados en dientes sanos, por esta razón el presente estudio se basará en dientes con fluorosis leve y moderada.

En la actualidad, han sido recomendadas diferentes técnicas de acondicionamiento para el diente con esmalte fluorótico, entre los que destacan extender el acondicionamiento con ácido fosfórico³⁵, y la combinación del grabado ácido y la microabrasión en esmalte fluorótico³⁶⁻³⁷, también han surgido nuevos sistemas de primer autograbantes y resinas que eficientizan la colocación de resinas en el esmalte y dentina. Haciendo una revisión en la literatura, no encontramos trabajos en donde se realice una comparación del acondicionamiento del esmalte con **microabrasión** y **grabado total** en órganos dentarios con fluorosis leve y moderada previo a la utilización de un sistema de **adhesión dopado con nanopartículas de ZnO**, por lo que consideramos necesario evaluar el comportamiento de los mismos ya que algunos estados de la República Mexicana existe una gran prevalencia de personas con este grado de severidad de fluorosis que buscan atención odontológica estética.



3.- OBJETIVOS

3.1.- Objetivo general

Evaluar, determinar y comparar el efecto de las concentraciones de calcio y fosforo en esmalte fluorotico, utilizando un adhesivo experimental dopado con nanopartículas ZnO, Microscopia electrónica analítica (TEM, SEM y EDS) y la microtensión.

3.2.- Objetivos específicos

- Evaluar las concentraciones de calcio y fosforo en el esmalte dental sano y con fluorosis mediante espectroscopia por dispersión de energía de Rayos X (EDS) acoplado a un SEM.
- Determinar la fase cristalina de las nanopartículas ZnO mediante el microscopio electrónico de transmisión (TEM).
- Comparar las concentraciones de calcio y fósforo en dientes sanos, con fluorosis leve y moderada después del acondicionamiento del esmalte.
- Evaluar la resistencia de adhesión a la microtensión de un adhesivo modificado con NPs de ZnO de diferentes concentraciones en dientes sanos, con fluorosis leve y moderada con la maquina universal de pruebas mecánicas.
- Comparar la resistencia de adhesión de los tratamientos realizados en los diferentes dientes con esmalte sano, fluorosis leve y moderada.

4.- HIPÓTESIS

Ha (1): Si la cantidad de calcio y fósforo en el esmalte dental comparados entre dientes sanos, con fluorosis leve y moderada son mayores, entonces la resistencia de adhesión a la microtensión será mayor.

Ha (2): Si las concentraciones de nanopartículas de ZnO en el adhesivo son mayores entonces la resistencia de adhesión será mayor.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Lugar de obtención de las muestras

San Luis Potosí, México.

5.2.- Estudio del diseño

Estudio experimental *in vitro*.

5.3.- Selección de la muestra

5.3.1.- Criterios de Inclusión: premolares evaluados índice de fluorosis de Thylstrup and Ferjeskov. (Figura 7).



Figura. 7 dientes sano, leve y moderado de izquierda a derecha.

5.3.2.-Criterios de Exclusión

- Premolares que estén fracturados de la corona.
- Premolares que presenten caries.
- Premolares que presenten obturación.
- Premolares que presenten hipoplasias que se confundan con fluorosis dental.
- Premolares que presenten tratamiento de blanqueamiento dental.

5.3.3.- Criterios de Eliminación

- Imposibilidad de evaluar las variables de interés en el estudio.

5.4.- Número de la muestra

- Premolares para la evaluación a la resistencia
 - 10 Sanos
 - 10 con Fluorosis leve
 - 10 con Fluorosis moderada
- Premolares para la observación al SEM para el analisis de EDS rayos X
 - 6 Sanos
 - 6 con fluorosis leve
 - 6 con fluorosis moderada



5.5.- Descripción operacional y conceptual de las variables

5.5.1.- Variable independiente

- **Fluorosis Dental:**
 - **Variable:** cualitativa ordinal.
 - **Operacional:** medido con el índice de fluorosis de Thylstrup and Ferjescov.

5.5.2.- Variables dependientes

- **Concentración de fósforo y calcio.**
 - **Variable:** cuantitativa de razón.
 - **Operacional:** mediante EDS acoplado al SEM.
- **Cristalografía de nanopartículas de ZnO**
 - **Variable** cualitativa nominal.
 - **Operacional:** medido con microscopio electrónico de transmisión (TEM) en el modo de Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM) y su análisis con ayuda del software Digital Micrograph.
- **Resistencia al desalajo:**
 - **Variable:** cuantitativa de razón.
 - **Operacional:** con la máquina universal de pruebas mecánicas.

6.- METODOLOGÍA

6.1.- Síntesis de las NPs-ZnO por química verde.

Para este proceso de química verde se ocupó la especie vegetal *Dysphania ambrosioides* conocida comúnmente como epazote.

6.2.- Obtención del extracto acuoso de *Dysphania ambrosioides*

Para obtener el extracto acuoso de la especie vegetal que sirve como medio de reacción previo a la síntesis de las NPs-ZnO se sigue el procedimiento siguiente³⁸.

La especie *Dysphania ambrosioides* se lava con agua desionizada usando un sonicador, este proceso se hace por 20min. Después del lavado, la planta se seca en una campana de extracción por 3 semanas, transcurrido el tiempo, el material seco se tritura finamente con ayuda de un mortero o manualmente y se conserva en un recipiente.

Se toman 20g del material seco triturado, se colocan en 200ml de agua desionizada y se dejan macerar durante 2.5h a temperatura ambiente sin agitar, transcurrido el tiempo, la mezcla se pone en agitación por 2h a 40°C y 50rpm (Figura 8).

Una vez terminado el proceso anterior, el extracto se filtra usando papel filtro Whatman No. 1 y se conserva en un frasco ámbar. El extracto debe ser utilizado enseguida de su obtención o máximo 24h después.

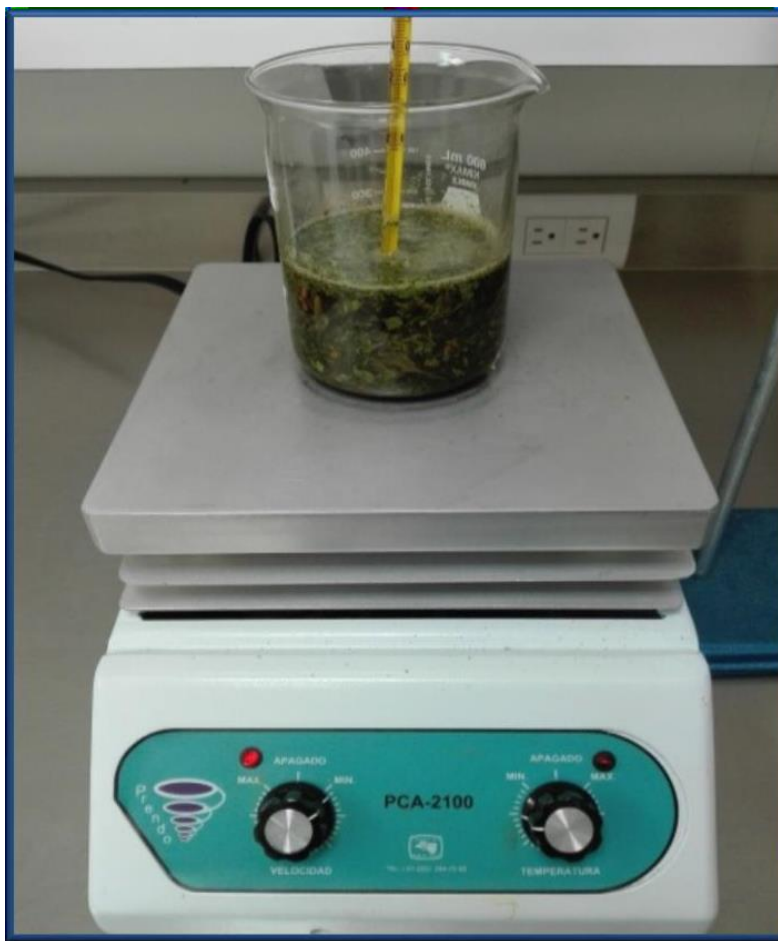


Figura. 8 Obtención del extracto acuoso de *Dysphania ambrosioides*

6.3.- Síntesis de NPs-ZnO usando el procedimiento de química verde

Para la síntesis se usan 100mL de extracto, se calienta hasta 45°C con agitación constante, una vez que se alcanza la temperatura se agregan 3.5g Zn (NO₃)₂•6H₂O y se colocan en agitación a 60°C durante 2h a 1500rpm. La reacción se monitorea visualmente para observar cambios de coloración en la solución o formación de un precipitado. Acabado el tiempo, la solución se deja enfriar a temperatura ambiente y el precipitado que se forma se separa mediante centrifugación a 1800rpm por 10min, se retira el sobrenadante y el precipitado se lava por triplicado con agua desionizada y un poco de metanol, una vez lavado, se deja secar a temperatura ambiente o en un horno de aire caliente a 50°C durante 6h, después del secado, el precipitado se somete a calcinación durante 2h a 80°C hasta obtener un sólido color blanco pálido.

6.4.- Caracterización de las NPs-ZnO

Se caracterizan las NPs sintetizadas utilizando las técnicas de; SEM, TEM, EDS.

- ❖ Para SEM: La muestra se monta en un portamuestras de aluminio con ayuda de cinta de carbón conductora.

Se utiliza un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo, modelo JSM7800F con resolución de 0.7nm, equipado con detectores de electrones secundarios, retrodispersados, y con un espectrómetro EDS marca OXFORD.

- ❖ Para TEM: Se utiliza un microscopio electrónico de transmisión modelo JEM 2010 FEG; con resolución de 0.19nm, equipado con EDS marca NORAN, el equipo cuenta con los modos de operación de campo oscuro anular a gran ángulo (HAADF), TEM convencional, (HRTEM) y STEM (Figura 9).



6.5.- Preparación de las nanopartículas de ZnO

Las partículas son de tamaño < 100 nm., 2 miligramos de polvo de nanopartículas son molidas en un mortero de agata y posteriormente dispersadas en alcohol en un equipo de baño ultrasónico durante 10 min., posteriormente se toma una gota de la suspensión la cual es depositada sobre una rejilla de cobre de 300 mesh, con soporte de fomvar y carbón amorfo, posteriormente se observa en el TEM.

6.6.- Recolección y preparación de los órganos dentarios

Los premolares extraídos, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% durante diez minutos y se colocaron en recipientes con agua destilada.

Se llevaron a un ultrasónico durante 15 min., después se eliminó el excedente de tejido con escariador, posteriormente se diagnosticó el grado de fluorosis y se acrilizan (Figura 10).

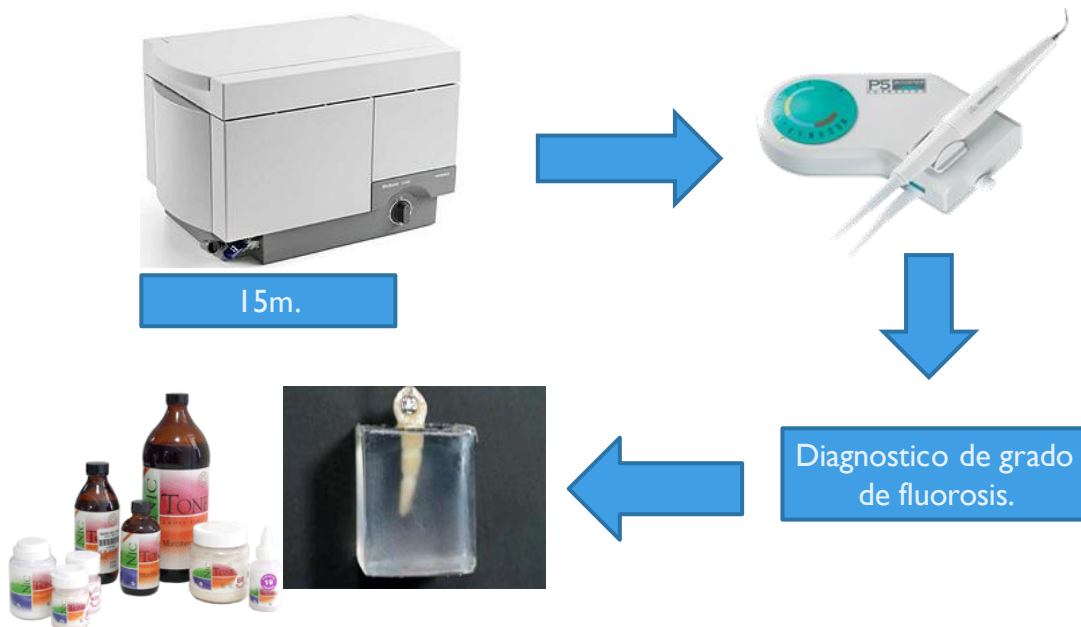


Figura. 10 Limpieza del órgano dentario y acrilado.



6.7.- Preparación de las muestras dentales para conocer la cantidad de Ca y P en SEM de bajo vacío

1. Las muestras se analizaron en un SEM de bajo vacío (LV-SEM) modelo Jeol JSM5600. La muestra debe estar seca (No necesario para e LV-SEM).
2. Se tomó la muestra cortando la corona del diente por la parte vestibular sin dañar el esmalte con un micrótomo.
3. La muestra se montó en un porta-muestras de Aluminio por medio de un pegamento o cinta conductora de carbón de doble cara.
4. Se utilizó la técnica de EDS, para estimar las concentraciones en peso (% wt ó element %) y atómico (%at) de calcio y fósforo.

6.8.- Preparación del adhesivo dental

Se mezcló BisGMA con TEGDMA hasta lograr baja viscosidad. Se añadió una mezcla de Camforoquinona-dimetil p-toluidina a la mezcla de monómeros hasta lograr una viscosidad homogénea. Se dividió en cuatro partes iguales las NPs óxido de zinc (ZnO). Se agregó la primera cuarta parte al adhesivo hasta lograr una pasta homogénea y completamente húmeda. Se repitió el mismo procedimiento con las otras tres cuartas partes. Se almacenaron en recipientes de color negro y se etiquetaron con la fecha de preparación, (Tabla 1).

Las mezclas de adhesivo control y experimental se preparan conforme a la siguiente composición en peso:

	0%	0.1%	0.3%	0.5%
	G			
NPsZnO	0.00	0.10	0.30	0.50
UDMA	7.95			
TEGDMA	1.95			
CQ	0.05			
DMPT	0.05			

Tabla 1. Preparación del adhesivo contenido y concentración de NPs de ZnO.

6.9.- Preparación de las muestras con el adhesivo.

El esmalte se acondicionó con pasta profiláctica durante 20 s. Se enjuagaron durante 10 s., se aplicó Ac. Fosfórico durante 30 s., y se aplicó adhesivo con NPs de ZnO, se fotocuraron durante 10s., se aplicó la resina compuesta y se fotocuraron durante 30s a $500\text{mW}/\text{cm}^2$, finalmente se almacenaron 24 h. para posteriormente hacer la prueba al desalojo (Figura 11).

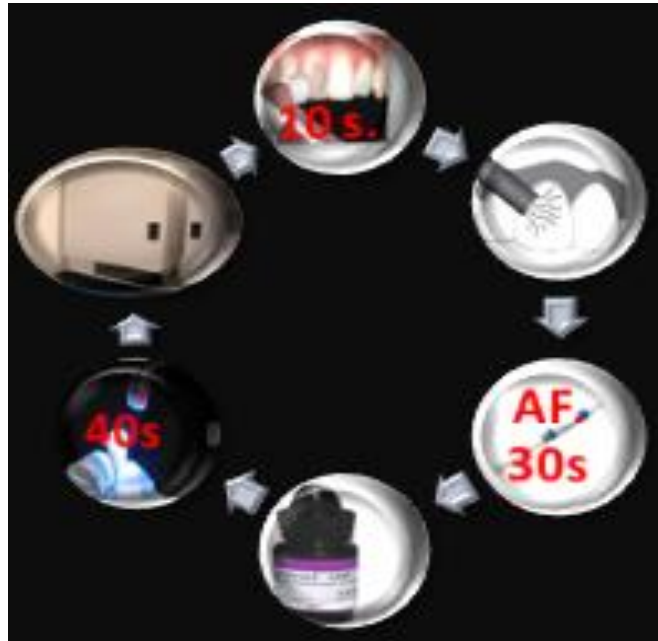


Figura. 11 Pasos para el acondicionamiento del esmalte y almacenamiento del espécimen.

6.10.- Esfuerzo de adhesión por desalojo

Obtención del esfuerzo máximo (resistencia) de desalojo. R:

Se embebió el diente en acrílico (23 mm de ancho, 15 mm de altura) cuidando de dejar al descubierto el esmalte donde se adhirió un cilindro de resina con el adhesivo control y experimental (5mm diámetro, 3 mm altura). Las muestras se sometieron a una prueba de desprendimiento donde se aplicó una fuerza en modo compresión con una velocidad de cruceta de 1.0 mm/min. La resistencia al desalojo (R) se calculó en Mega Pascales (MPa) con la siguiente ecuación:

$$R = (4F)/(3.1416D^2)$$



Figura. 12 La prueba de esfuerzo de adhesión al desalojo se llevó a cabo con una maquina universal de pruebas mecánicas (Instron) y una carga al punto de fractura de 1.0 mm/min.

Donde F es la fuerza máxima y D el diámetro del cilindro de resina control o experimental de la muestra (Figura 12).

6.11.- Preparación de las muestras dentales para la observación de la interfase adhesiva-dental.

- 1.- Se cortaron las muestras longitudinalmente con un micrótopo con disco de diamante a 1500 revoluciones a una velocidad de 0.5mm.
- 2.- Se pulieron con una lija de grano 4000 hasta que la superficie se observó brillante y lisa.

- 3.- Las muestras se sometieron al sonicador (Bransonic S2) durante tres minutos por tres veces, finalmente se secaron con un compresor portátil (Workforce).
- 4.- Las muestras se cubrieron con oro con ayuda de un decapador iónico “sputtering” HUMMER VI-A (ANATECH LTD.) para ello se utilizó una presión 40-60 millorr. Posteriormente se aplicó una corriente de 1.5 Amperes para generar el plasma que se obtiene en color magenta durante 2 min., y en ese momento ocurre el bombardeo de oro. Una vez ocurrido esto se eliminó la corriente y después el vacío, las muestras se colocaron en una caja Petri hasta su observación.
- 5.- Finalmente se observaron en el microscopio electrónico de barrido (SEM) JSM7800 F (Figura 13).

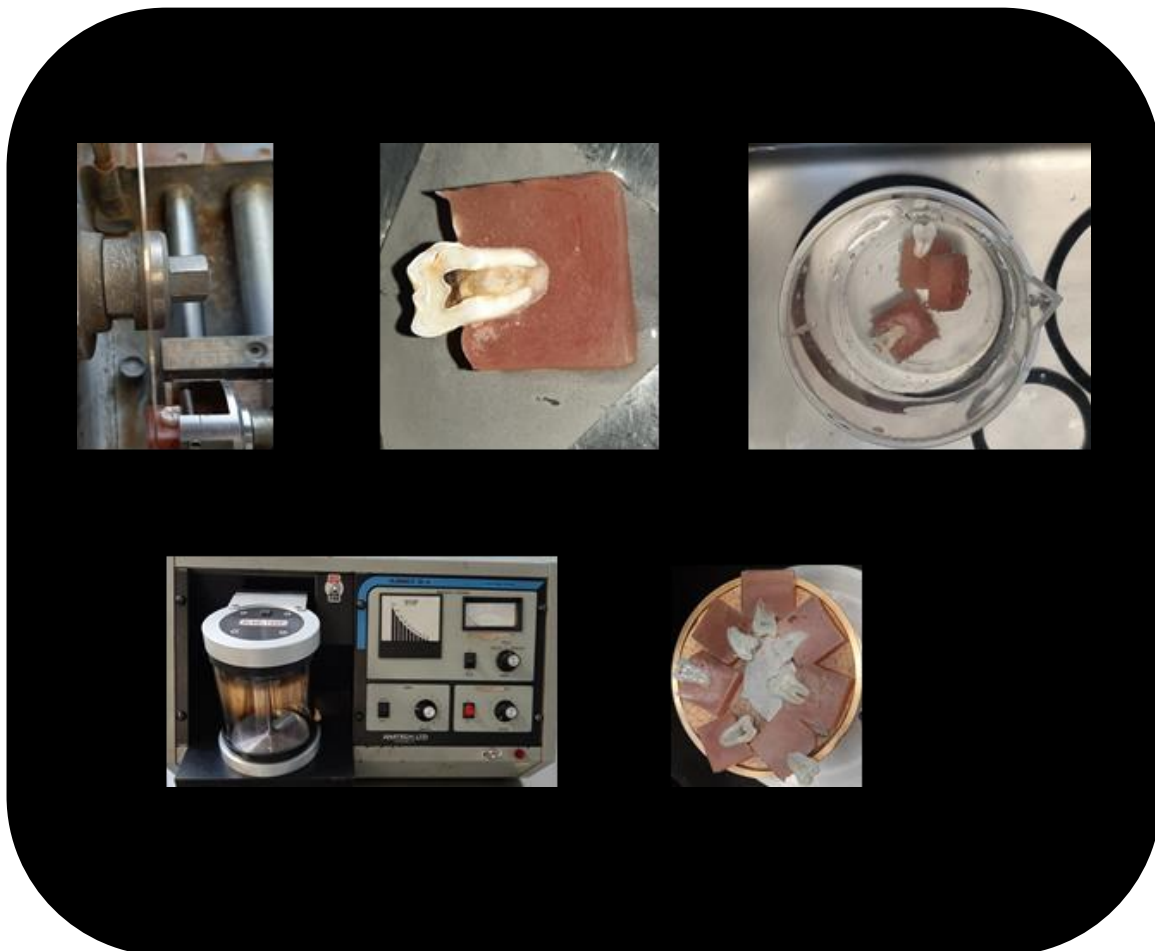


Figura 13. Procedimiento del bombardeo (sputtering) de oro



7.- RESULTADOS

7.1.- EDS en esmalte dental con concentraciones de P y Ca

Los resultados de EDS arrojan resultados donde el elemento más común en cualquier esmalte es el calcio (Ca) seguido del fósforo (P) tabla 2.

Muestras	Sanos				Leves				moderados			
	Atom %		Element %		Atom %		Element %		Atom %		Element %	
	P	Ca	P	Ca	P	Ca	P	Ca	P	Ca	P	Ca
1	35.9 4	59.6 7	30.6 8	65.9 0	35.9 8	60.0 3	30.6 6	66.2 0	40.5 9	52.8 5	35.3 9	59.6 3
2	9.01 8	12.3 8	8.35 8	14.8 6	33.7 9	66.2 1	28.2 8	71.7 2	28.9 7	71.0 3	23.9 6	76.0 3
3	0.27	0.33	0.63	0.99	42.9 5	57.0 5	36.7 8	63.2 2	12.1 0	87.9 0	9.62	90.3 8
4	0.20	0.28	0.48	0.86	44.8 5	55.1 5	38.5 9	61.4 1	6.27	8.10	11.2 3	18.7 9
5	7.11	9.30	12.4 4	21.0 6	9.59	12.8 2	15.2 5	26.3 7	6.78	8.39	11.9 8	19.1 5
6	7.41	9.22	12.7 5	20.5 2	-	-	-	-	4.41	5.38	8.58	13.5 2

Tabla 2. Porcentajes de la concentración de Calcio (Ca) y Fósforo (P) detectados mediante EDS.

7.2.- Observación por LV-SEM del esmalte sano, dañado por fluorosis leve y moderado.

Figura 14, se muestra una micrografía obtenida a un menor aumento 50X, del esmalte de un diente con esmalte sano. La imagen se obtuvo con electrones retrodispersados por LV-SEM, a 12 Pa en la cámara del microscopio. Se aprecia un cráter en el esmalte y perikymatas enameli.

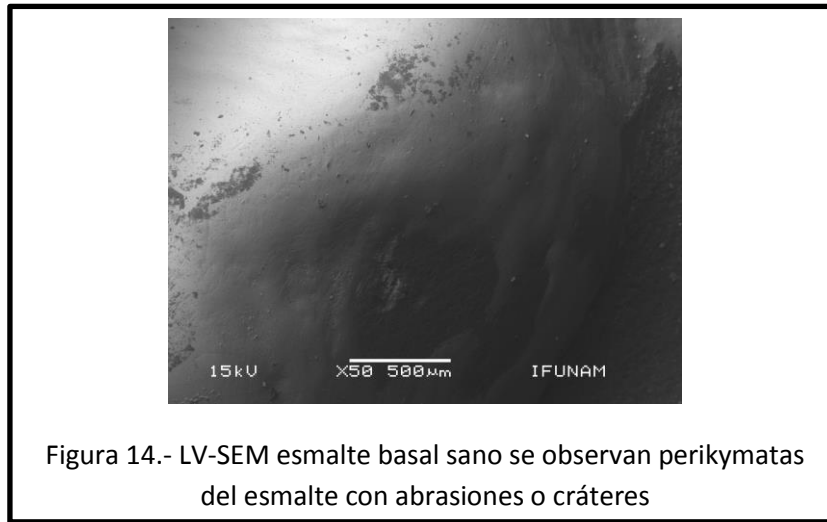


Figura 15, se muestra una micrografía obtenida a un menor aumento 1000X, del esmalte de un diente con esmalte sano. La imagen se obtuvo con electrones retrodispersados con LV-SEM, a 12 Pa en la cámara del microscopio. Se observan líneas de Retzius y posibles perlas del esmalte.

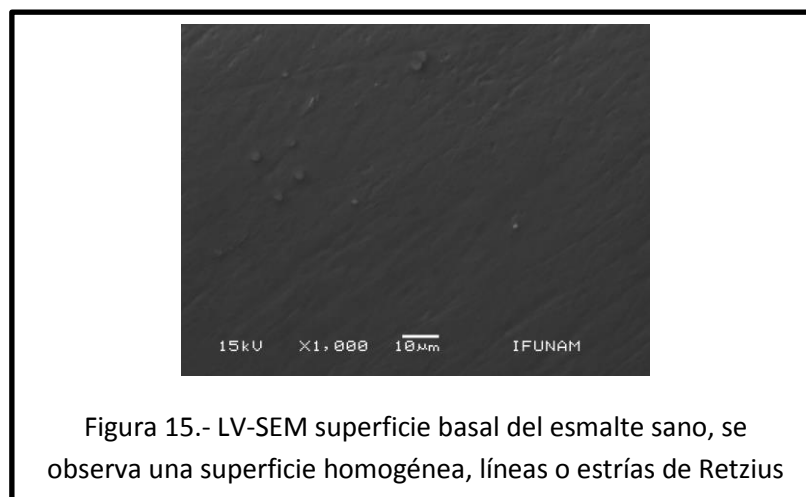


Figura 16, se muestra una imagen obtenida a 1000X, del esmalte de un diente que sufre fluorosis leve. La imagen se obtuvo con electrones retrodispersados por LV-SEM, a 12 Pa en la cámara del microscopio. Se aprecia sobre un cráter en el esmalte, tejido orgánico con posibles proteínas, una mayor rugosidad en la parte más superficial. Las zonas mayormente contrastadas significan que el esmalte del diente está más expuesto, con respecto a la parte central, donde el menor contraste significa que existe mayor presencia de material orgánico.

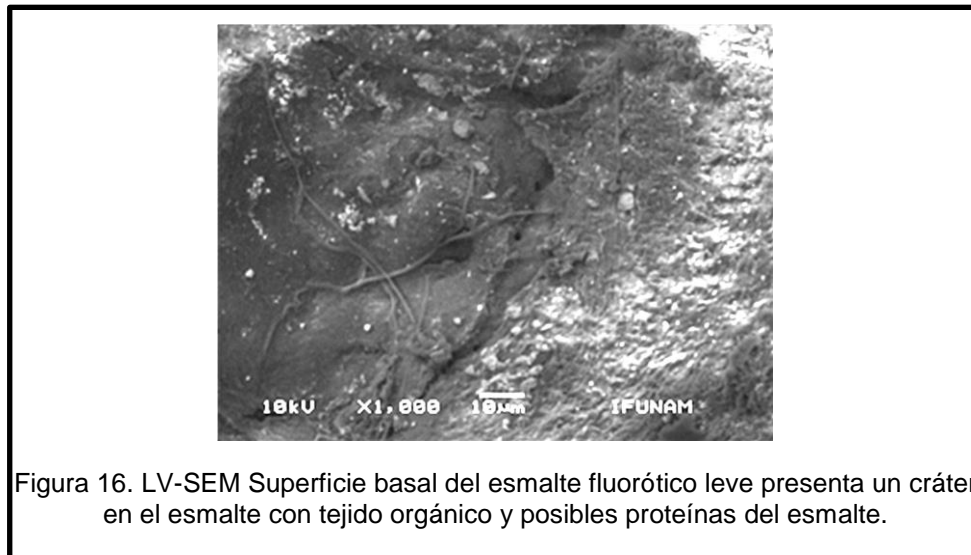
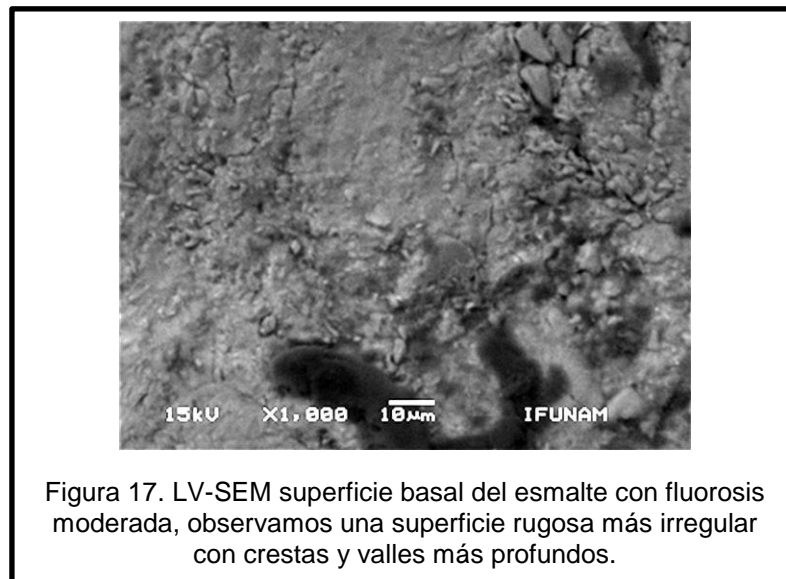


Figura 17, se muestra una imagen obtenida a 1000X, del esmalte de un diente que sufre fluorosis moderada. La imagen se obtuvo con electrones retrodispersados por LV-SEM, a 12 Pa en la cámara del microscopio. Se observa un esmalte rugoso.



7.3.- Observación de las electromicrografías del ZnO en el SEM

Mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM) Jeol 7800, se logró observar por medio de los electrones retrodispersos las NPs de ZnO a un aumento de 35000X (Figura 19). En este caso se observa dos tipos de estructuras, unas en forma de nanoalambre y unas cuasiesféricas menores a 100nm de diámetro. El voltaje utilizado fue de 1.5 KV.

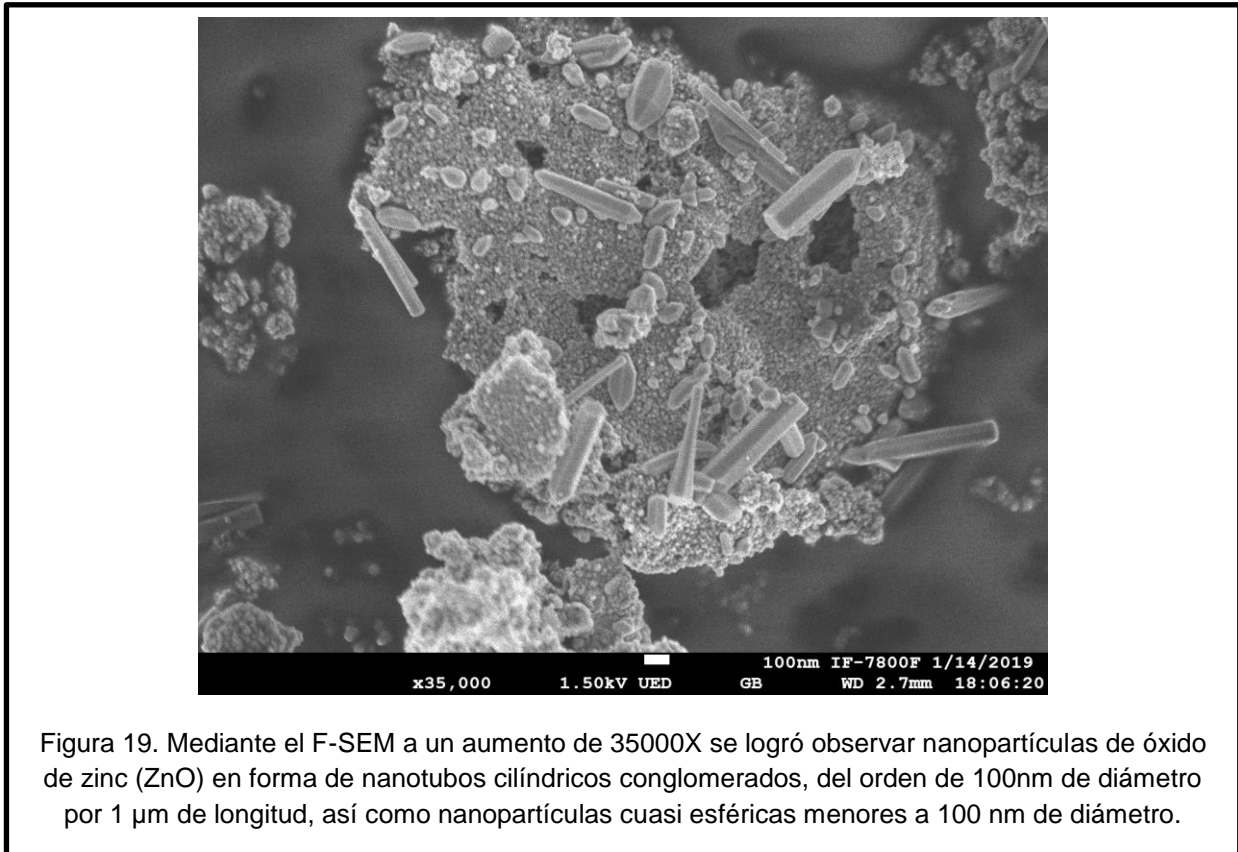
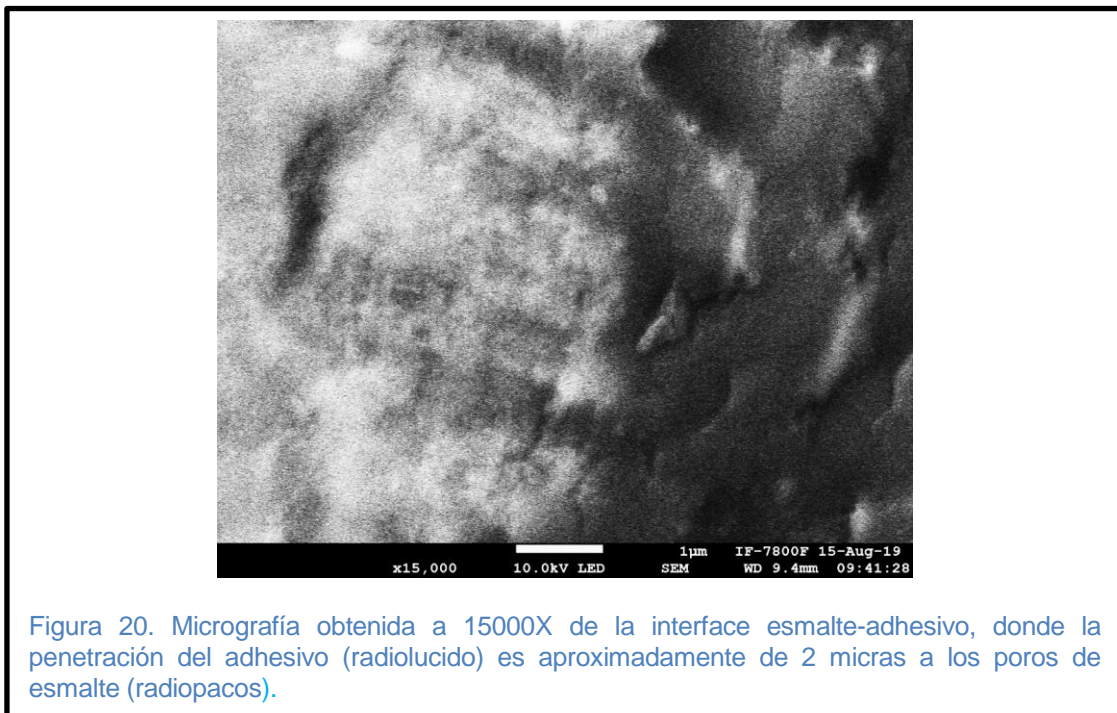


Figura 19. Mediante el F-SEM a un aumento de 35000X se logró observar nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) en forma de nanotubos cilíndricos conglomerados, del orden de 100nm de diámetro por 1 μ m de longitud, así como nanopartículas cuasi esféricas menores a 100 nm de diámetro.

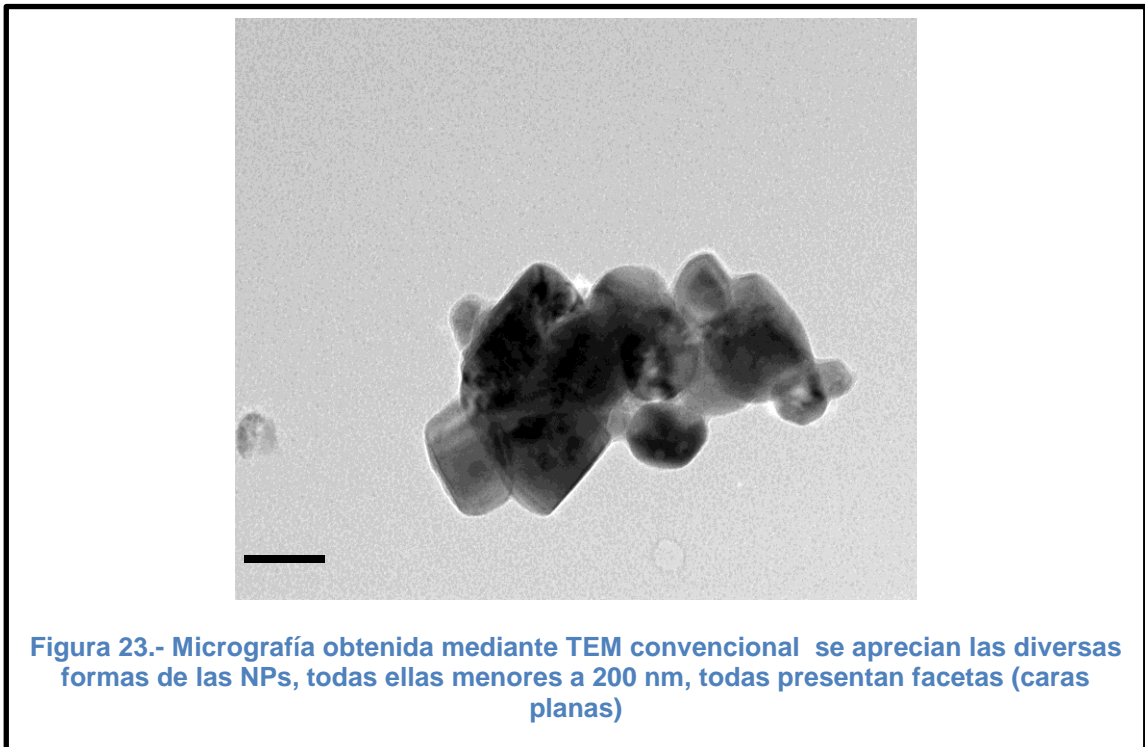
7.4.- Interface esmalte-adhesivo

Figura 20. Corte longitudinal de un diente, preparado con un baño de carbón para su observación, La imagen se obtuvo con electrones retrodispersados por LV-SEM, a 12 Pa, en la cámara del microscopio. La zona con mayor contraste es el esmalte y la zona con menor contraste es el adhesivo. Se logra observar la penetración del esmalte.



7.5.- Nanopartículas (NPs) de ZnO en TEM

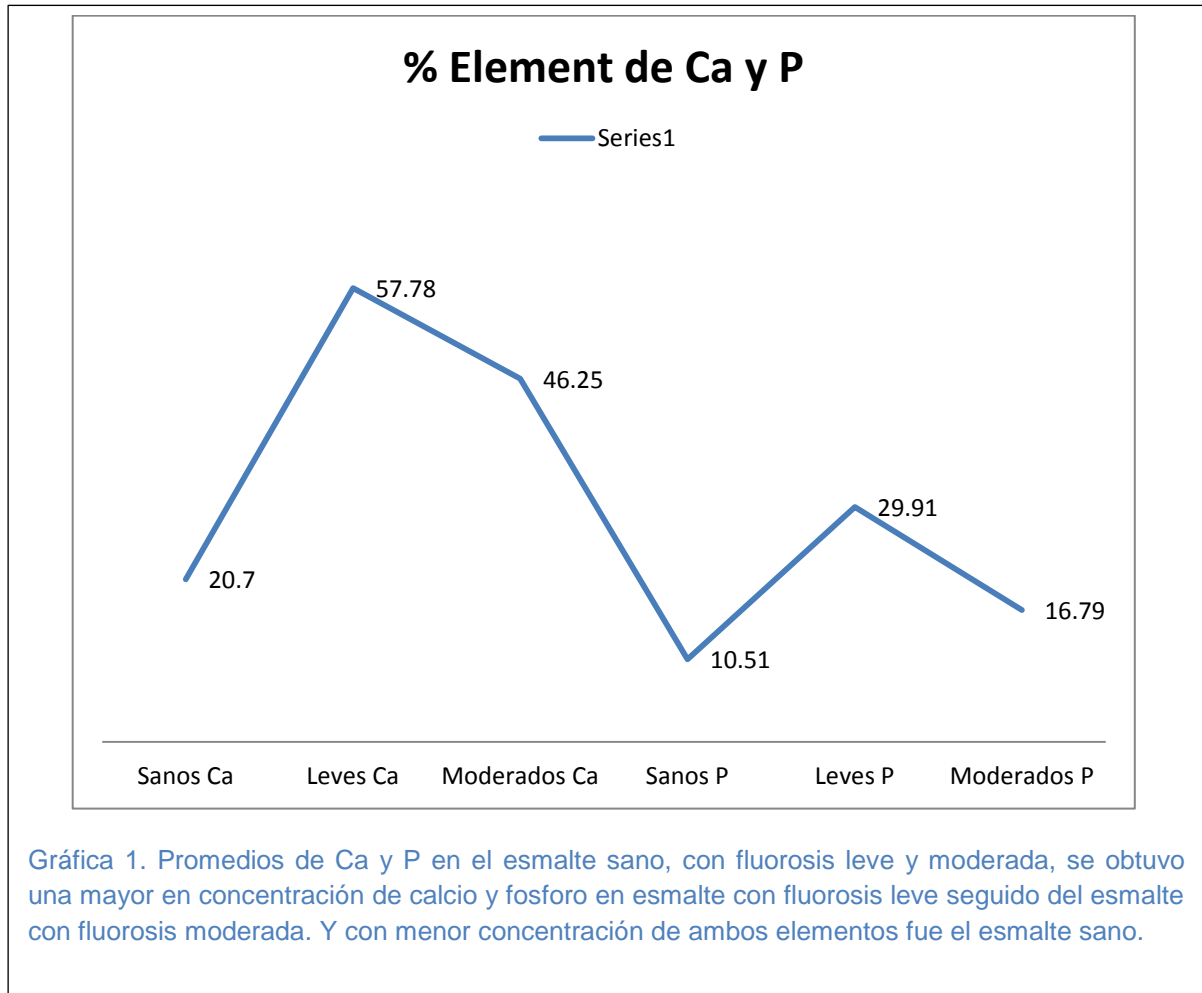
Mediante el microscopio electrónico de transmisión (TEM), logramos observar las NPs de ZnO (Figura 23), a 200,000X. Las partículas que se observan presentan caras planas y son menores a 200nm, tiene una tendencia a tomar formas cuasiesféricas.





7.6.- Estadística descriptiva de los análisis EDS.

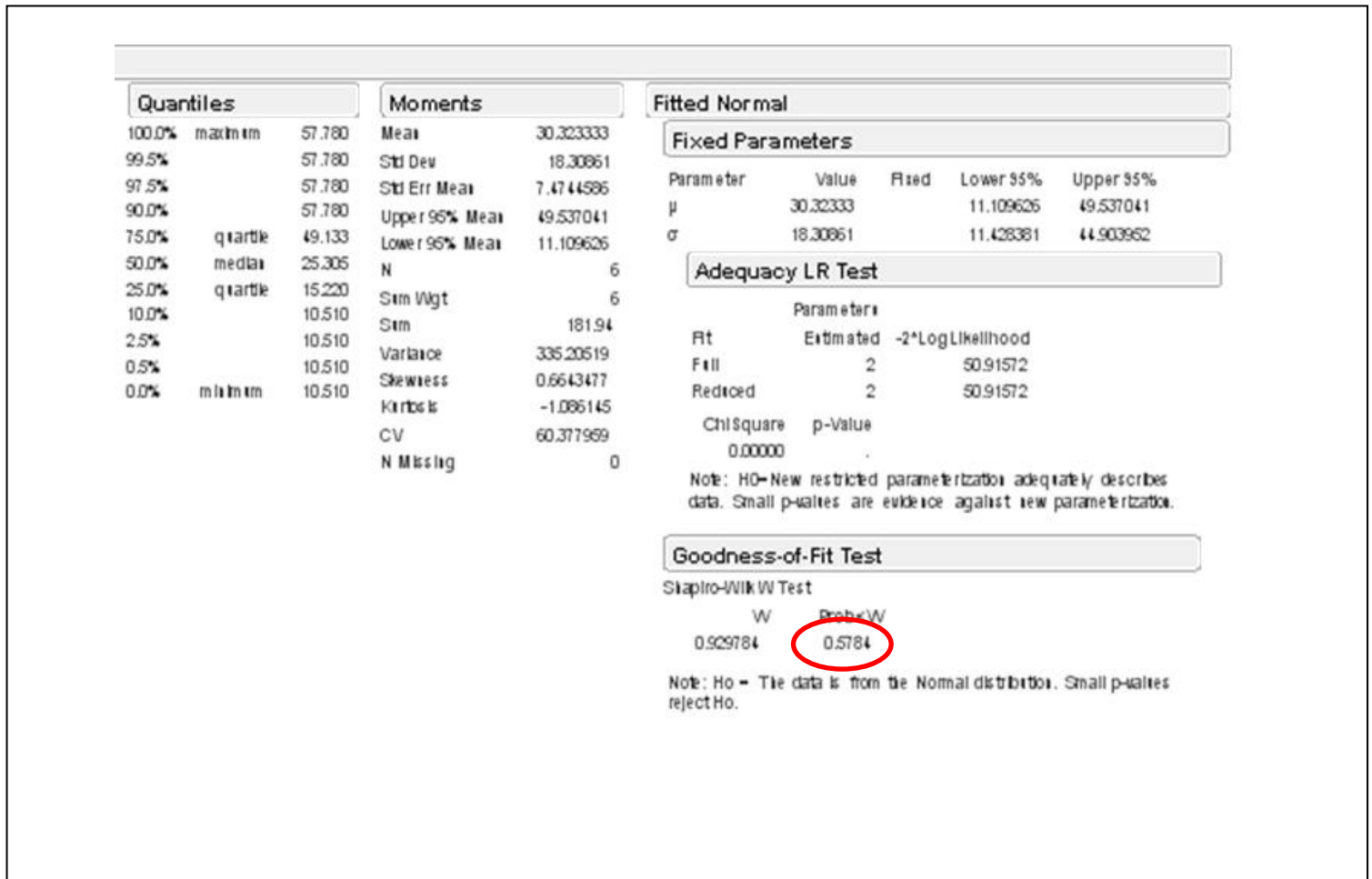
Mediante el programa de Excel se obtuvieron los promedios de las concentraciones de porcentaje en Elemento de calcio (Ca) y Fosforo (P) en los tres superficies de esmaltes sanos, leves y moderados, Gráfica 1.





7.7.- Estadística inferencial

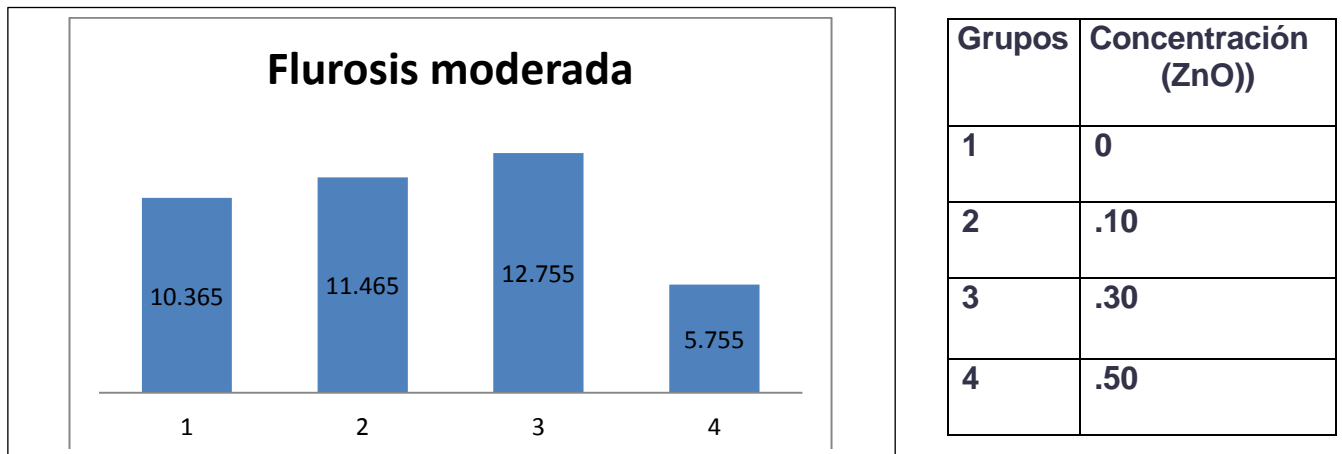
Se utilizó un paquete estadístico de JMP en el cual observamos que no existen diferencias estadísticamente significativas entre promedios de los tres grupos estudiados de los elementos evaluados por EDS en (Ca y P) de acuerdo a la prueba de Shapiro Wilk con intervalo de confianza de 95% y una P a >0.05 Gráfica 2.



Gráfica 2 No existen diferencias estadísticamente significativas con la prueba de ajuste de bondad de Shapiro wilk.

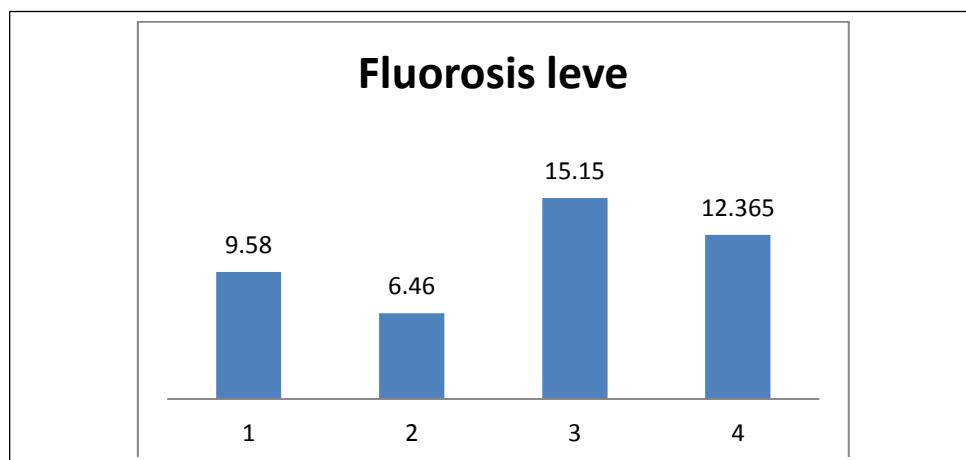
7.8.- Resultados de la resistencia de adhesión

Los resultados de la resistencia a la adhesión en el caso del esmalte con **fluorosis moderada**, se obtuvo un esfuerzo mayor en el grupo 3 con una concentración de 0.30 % de nanopartículas de ZnO, (Gráfica 3).



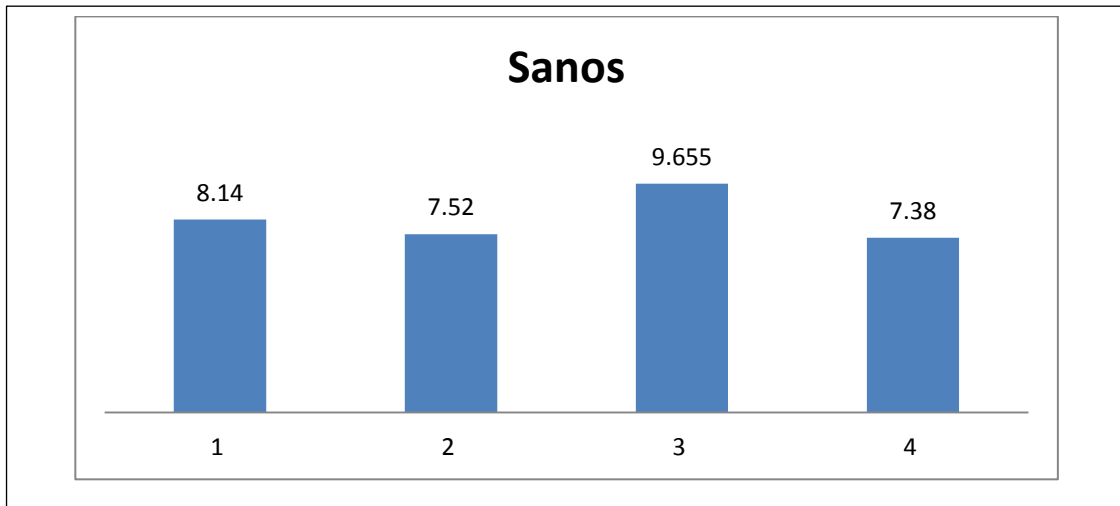
Gráfica 3. Promedios a la resistencia del esmalte con fluorosis moderada medido en N/mm^2 .

Los resultados en la resistencia de adhesión en esmalte con **fluorosis leve** se obtuvo un esfuerzo mayor en el grupo 3 con una concentración de 0.30 % de nanopartículas de ZnO, por otro lado la de menor resistencia fue la concentración de 0.10 % de Np de ZnO (Gráfica 4).



Gráfica 4. Promedios de resistencia al esmalte con fluorosis leve medido en N/mm^2 .

Los resultados en la resistencia de adhesión en **esmalte sano** fue mayor en el grupo 3 con una concentración de 0.30 % de nanopartículas de ZnO por el contrario el de menor esfuerzo fueron los del grupo 2 y 4 (Gráfica 5).



Gráfica 5. Promedios de la fuerza de adhesión a la resistencia de esmalte sano medido en N/mm^2 .

8.- DISCUSIÓN

En el presente estudio decidimos utilizar el EDS para evaluar de manera puntual los elementos presentes en las muestras dentales estudiadas, con una resolución de hasta 1000ppm y correlacionar dicha composición química elemental con las estructuras topográficas observadas en la superficie del esmalte analizado con electrones secundarios y/o retrodispersados (en el caso de LV-SEM), en dientes sanos y con fluorosis²². Existen pocos estudios relacionados con el rastreo de elementos en dientes con fluorosis por medio de EDS, la utilización de un LV-SEM presenta ventajas que pueden ayudar a disminuir sesgos en la información debido a que no se manipula la muestras a tal grado que se pueda perder información de los elementos que la componen, además de acortar tiempos de preparación de las muestras dentarias para que sean evaluadas por medio del SEM.

Los especímenes se mantuvieron en agua destilada, para minimizar la influencia de iones sobre el proceso de remineralización del esmalte³⁸.



En nuestro estudio la evaluación a la concentración del rastreo de elementos de Ca y P, de los cuales están formados los cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) en su matriz inorgánica de **esmalte sano** fueron promedios muy similares en peso de Ca (32.9%) y P (16.88%), (Batzewska y col. 2018), y Ca (37.8%) P (18.3%) (Neves y col 2018). Se han realizado pocos estudios para la evaluación de esmalte con fluorosis que ocupen EDS, sin embargo, algunos estudios coinciden en los promedios de P y Ca en esmalte sano^{39,40}.

La utilización de nanopartículas de ZnO ha demostrado tener un buen efecto antibacterial y antibiofil a ciertos microorganismos que se encuentran en la cavidad bucal causantes de caries y enfermedad periodontal entre ellos el *Streptococos mutans*, *Rotia mucilginosa*, *Rotia dentocariosa*, además de una buena unión química con la matriz orgánica del adhesivo^{41,42}.

Existen estudios donde modifican tres adhesivos comerciales con nanopartículas Ag obteniendo resultados promedios de (19.0±5.4, 20.0±4.0 and 19.0±3.5 Mpa) en fuerza de adhesión a la microtensión en esmalte con fluorosis⁴³ mientras que en nuestro estudio se obtuvieron los mejores valores en fluorosis leve y moderada (12.75 y 15.15Mpa) y en esmalte sanos un promedio de (9.65 Mpa) siendo la mejor concentración de NPs ZnO de 0.3%, algunos reportes mencionan que las mejores concentraciones se obtiene entre 1% y 5% ya que las concentraciones mayores a 5% hasta 10% reducen la fuerza de adhesión⁴⁴, sin embargo en nuestro estudio la concentración fue menor y con mejores resultados.

Las NPs ZnO utilizadas en este estudio fueron sintetizadas por medio de química verde, ya que este método tiene un bajo costo y además de un bajo impacto ambiental. Se utilizó el extracto de *Dysphania ambrosioides* (epasote), entre los compuestos presentes en la especie vegetal son los carbohidratos, aminoácidos, proteínas, flavonoides, flavonas, flavonoles como kaempferol, quercetina e isorhamnetina, los fitoesteroles avenasterol y espinasterol, saponinas, alcaloides, vitaminas, monoterpenos como β -mirceno, cis- β ocimeno, geraniol, limoneno, α terpineno, α -terpinoleno, *p*-cimeno, carvacrol, timol, α - terpineol, carvona, pinocarvona, piperitona, ascaridol y chanopanona, los sesquiterpenos β -cariofileno y γ -curcumeno además de α -caroteno y β -caroteno⁴⁵⁻⁴⁶.

La mayoría de estas moléculas poseen grupos funcionales hidroxilo (OH), estos grupos participan en el proceso de reducción y transformación del $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ a ZnO, la oxidación de grupos OH a grupos carboxilo están involucrados en la estabilización de las NPs además de controlar su forma caroteno⁴⁵⁻⁴⁶.

Los compuestos como las proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, así como metabolitos secundarios, tales como flavonoides, alcaloides, polifenoles, terpenos, compuestos heterocíclicos y polisacáridos también aportan a la



reducción de la sal metálica además de rodear y estabilizar a las NPs sintetizadas⁴⁷.

El ZnO es un óxido metálico bactericida seguro porque no es tóxico para las células animales a bajas concentraciones pero es muy tóxico para las bacterias, esto lo hace un material idóneo para su aplicación clínica como se está ya aplicando incorporándolo a materiales dentales por su probada capacidad antimicrobiana y su mayor biocompatibilidad que otras NPs como son las de plata que generan toxicidad en las células humanas⁴⁸.

9.- CONCLUSIONES

Los resultados del EDS obtenidos del microscopio electrónico de barrido de bajo vacío (SEM), permitió describir la diferencia que existe de calcio y fósforo entre dientes sanos y con fluorosis en estado basal sin tener que desecar las muestras y perder información además de observar por medio de electrones secundarios la topografía de la superficie del esmalte.

No hubo diferencia estadísticamente significativa en la concentración de Ca y P en los diferentes grupos, sin embargo la resistencia de adhesión al esfuerzo demostró ser mayor en los dientes con fluorosis leve, por lo tanto se acepta la hipótesis (1). Por medio del SEM pudimos observar que las NPs-ZnO sintetizadas son del orden de 5-200nm., y de forma cuasiesférica. Además presentaron una buena fuerza de unión al adhesivo dental experimental dopado con nanopartículas de ZnO al momento de ejercer la fuerza, sin embargo se rechaza la hipótesis (2) debido a que la concentración con mejores resultados en todos los grupos fue de 0.30%.

10.- PERSPECTIVAS

- Aumentar la muestra de estudio para una mejor estadística
- Analizar el efecto antibacterial de las NPs por medio de halos de inhibición mezclados con el adhesivo.
- Analizar mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión la interacción a nivel ultraestructural de bacteria-NPs.
- Evaluar las NPs en otras actividades biológicas como citotoxicidad de células normales o cancerígenas.



11. – REFERENCIAS GENERALES

- 1) The royal society, (2004). Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. UK: The Royal Society, pp. 7.
- 2) Quintili, M. (2012). Nanociencia y Nanotecnología un mundo pequeño. *Centro de Estudios en Diseño y Comunicación*. 42, pp. 125-155.
- 3) Zhang, L. & Webster, T.J. (2009). Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today*. 4, pp. 66-80.
- 4) Mendoza Uribe, G. & Rodríguez López, J. (2007). La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles Latinoamericanos*. 29, pp. 161-185.
- 5) Lárez-Velásquez, C., Koteich-Khatib, S., *et al.* (2015). Nanopartículas: Fundamentos y Aplicaciones. 1 ed. Mérida, Venezuela: Universidad de Los Andes, pp. 1-29.
- 6) Ouahid Hessissen, A., (2016). Tesis grado, Nanotecnología y sus potenciales aplicaciones en microbiología. España: Universidad de Sevilla, pp. 6.
- 7) Anastas, P. T. & Warner, J. C. (1998). Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press: New York, pp.30.
- 8) Salinas Estevané, P. & Sánchez Cervantes, E. (2012). La química verde en la síntesis de nanoestructuras. *Ingenierías*. 54(15), pp. 7-16.
- 9) Hebbalalu, D., lalley, J. *et al.* (2013). Greener Techniques for the Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts, Enzymes, Bacteria, Biodegradable Polymers, and Microwaves. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. 1(7), pp. 703–712.
- 10) Makarov, V.V., Love, A.J. *et al.* (2014). “Green” Nanotechnologies: Synthesis of TEMal Nanoparticles Using Plants. *Acta naturae*. 1(20), pp. 35-44.
- 11) Treviño, S., Aguila-Rosas, J. *et al.*, (2014). Estudios preliminares de caracterización y acción cicatrizante de nanomatrices de ZnO con extracto de *Plantago major* en la piel de rata. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, pp.45(4).
- 12) Azizi, S., Ahmad, B. *et al.*, (2014). Green biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using brown marine macroalga *Sargassum muticum* aqueous extract. *Materials Letters*. 166, pp. 275-277.
- 13) Abdul Salam, H., Sivaraj, R. *et al.*, (2014). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from *Ocimum basilicum* L var *purpurascens* Benth- Lamiaceae leaf extract. *Materials Letters*. 131(1), pp. 16-18.
- 14) Vanathi, P., Rajiv, P., *et al.*, (2014). Biosynthesis and characterization of phytomediated zinc oxide nanoparticles: A green chemistry approach. *Materials Letters*. 134, pp. 13-15.
- 15) Sangeetha, G., Rajeshwari, S. *et al.*, (2011). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by aloe barbadensis miller leaf extract: Structure and optical properties. *Materials Research Bulletin*. 46, pp. 2560-2566.



- 16) Yuhong Zheng, Li Fu, *et al.*, (2015). Green biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using *Corymbia citriodora* leaf extract and their photocatalytic activity. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 8(2), pp. 59-63.
- 17) Sangeetha, G., Rajeshwari, S. *et al.*, (2012). Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. *Progress in Natural Science: Materials International*. 22(6), pp. 693-700.
- 18) Tayel, A.A & El-tras, W.F. (2011). Antibacterial action of Zinc Oxide nanoparticles against foodborne pathogens. *Journal of Food Safety*. 31(1), pp. 211–218.
- 19) Elumalai, K. & Velmurugan, S. (2015). Green synthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from the leaf extract of *Azadirachta indica* (L). *Applied Surface Science*. 345, pp. 329–336.
- 20) Yousef, J.M & Danial, E.N. (2012). In *Vitro* Antibacterial Activity and Minimum Inhibitory Concentration of Zinc Oxide and Nano-particle Zinc oxide Against Pathogenic Strains. *Journal of Health Sciences*. 2(4), pp. 38-42.
- 21) Jayaseelan, C., Abdul Rahuman, A. *et al.*, (2012). Novel microbial route to synthesize ZnO nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and their activity against pathogenic bacteria and fungi. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 90, pp. 78-84.
- 22) Vante N., (2002) Electroquímica y electrocatalisis “tecnicas de investigacion aplicada a sistemas electroquimicos in situ y ex situ” Vol. 11 b. , pp 17-73.
- 23) Lees, S., & Jr, R. F. (1972). Anisotropy in hard dental tissues. *J. of Biomechanics* , pp.557-566.
- 24) Lazzari, E. (1978). *Bioquímica dental*. Interamericana.
- 25) Uribe-Echevarria. (1990). *Operatoria Dental, ciencia y práctica*. Avances médico-dentales
- 26) Shimada, Y., & Tagami, J. (2003). Effects of regional enamel and prism orientation on resin bonding. *Operat. Dent* , pp. 20-27.
- 27) Gomez de Ferraris, M. E., & Campos Muñoz, A. (2002). *Histología y embriología bucodental*. Madrid: Panamericana
- 28) Everett, E., McHenry, M., Reynolds, N., Eggertsson, H., Sullivan, J., & K. C. (2002). Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. *Journal Dental Research* , pp.794-798.
- 29) Vieira, A. H. (2003). How does fluoride concentration in the tooth affect apatite crystal size? *Journal Dental Research*, pp. 909-913.
- 30) Clark, D. (1994). Trends in prevalence of dental fluorosis in North America. Community. *Dent Oral Epidemiol*, pp. 148-152.
- 31) Ermis, R., De Munck, J., Cardoso, M., & Coutinho, E. (2007). Bonding to ground versus unground enamel in flourosed teeth. *Dental Materials*, pp. 1250-1255.
- 32) Craig, R., O Brien, W., & Powers, J. (1999). *Materiales Dentales*. España: Mosby.
- 33) Noble, J., Karaiskos, N., & Wiltshire, W. (2008). in vivo bonding of orthodontic brackets to fluorosed enamel using an adhesion promotor. *Angle Orthodontist*, pp. 357-360.



- 34) Fejerskov, O., Larsen, M., A, R., & Baelum, V. (1994). Dental Tissue effects of fluoride. . *Adv Dent Res*, pp. 15-31.
- 35) Adanir, N., Türkkahraman, H., & Güngör, A. (2009). Effects of adhesion promoters on the shear bond strengths of orthodontic brackets to fluorosed enamel. *European Journal of Orthodontics*, pp. 276-280.
- 36) Ateyah, N., & Akpata, E. (2000). Factors affecting shear bond strength of composite resin to fluorosed human enamel. *Operative Dentistry*, pp. 216-222.
- 37) Opinya, G., & Pameijer, C. (1986). Tensile bond strength of fluorosed Kenyan teeth using the acid etch technique . *International Dental Journal*, pp. 225-29.
- 38) Fejerskov O, Josephsen K, Nyvad B (1984) Surface ultrastructure of unerupted mature human enamel. *Caries Res*, pp. 18:302–314.
- 39) Neves M., Pires F., Silikas N., Francis E., (2018) Micro- CT and FE-SEM enamel analyses of calcium- based agent application after bleaching. *Clini Oral Invest* 22: pp.961-970.
- 40) Batczewska E., Klimek L., Palatynska A., (2009) SEM analysis of dental enamel morphological structures on the basis of their replicas in patients with systemic calcium deficiency. *Cent. Eur. J. Biol.* 4(2), pp.190-195.
- 41) Khanst, A., Al- Khedhairi A., Musarrat A., J.(2013) Biocidal effect of copper and zinc oxide nanoparticles on human oral microbiome and biofilm formation. *Mater Lett*;97: pp.67–70.
- 42) Shams K., Ahamed J., Abdulaiz A. (2014) Anti-biofilm and antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against the oral opportunistic pathogens *Rothia dentocariosa* and *Rothia mucilaginosa* *Eur j Oral Sci* 122: pp. 397–403.
- 43) Torres-mendez F., Martinez-Castañon GA., Torres-Gallegos I.,(2017) Effects of silver nanoparticles on the bonding of three adhesive systems to fluorotic enamel. *Dental Material Journal*, pp. 1-9.
- 44) Akhavan A, Sodagar A, Mojtahedzadeh F, Sodagar K (2013) Investigating the effect of incorporating nanosilver/ nanohydroxyapatite particles on the shear bond strength of orthodontic adhesives. *Acta Odontol Scand.*; 71: pp. 1038-1042.
- 45) Carrillo-López, L.M., Zavaleta-Mancera, H.A., *et al.*, (2014). Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Chenopodium ambrosioides*. *Journal of Nanomaterials*. 2014, pp. 1-9.
- 46) Carrillo-López, L.M., Soto-Hernández, R.M., *et al.*, (2016). Study of the Performance of the Organic Extracts of *Chenopodium ambrosioides* for Ag Nanoparticle Synthesis. *Journal of Nanomaterials*. (2016), pp. 1-13.
- 47) Priyanka, S., Yu-jin, K. *et al.*, (2016). Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in Biotechnology*. 34(7), pp. 588-599.
- 48) Al-Mosawi, R.M., Al-Badr, R. M., *et al.*, (2017), The Study Effects of Dental Composite Resin as Antibacterial Agent Which Contain Nanoparticles of Zinc Oxide on the Bacteria Associated with Oral Infection. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*. 16(1), pp. 49-55.



12.- REFERENCIA DE FIGURAS

- 1) http://allchemy.iq.usp.br/oqsp/OQSP-2020-2-Nanoquimica-Giuseppe_Cunha
- 2) Ankamwar, B., Kirtiwar, S., Shukla, A.C. (2020). Plant-Mediated Green Synthesis of Nanoparticles. In: Patra, J., Shukla, A., Das, G. (eds) Advances in Pharmaceutical Biotechnology. Springer, Singapore.
- 3) <https://nanocienciainforma.wordpress.com/microscopio-de-efecto-tunel-scanning-tunneling-microscope-stm/>
- 4) <https://www.ortodonciavina.cl/wp-content/uploads/2015/07/fluor2.jpg>