



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERIA EN MATERIALES

INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM

“MORFOLOGÍA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS GRANOS
NANOMETRICOS DEL ESMALTE DENTAL HUMANO, ANALIZADO POR
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA”

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERIA EN MATERIALES

PRESENTA:
FIS. GUILLERMO RODRIGO DEL VALLE GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ REYES GASGA (INSTITUTO DE FÍSICA UNAM)

COMITÉ TUTOR:
DR. ARTURO RODRÍGUEZ GÓMEZ (INSTITUTO DE FÍSICA UNAM)
DR. ANTONIO ENRIQUEZ SALAS REYES (FACULTAD DE QUÍMICA)

Instituto de física Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México,
Agosto del 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.

Dedicatorias

A mis padres, Samuel y Reyna por todo su amor y apoyo incondicional, les dedico todo mi esfuerzo, en reconocimiento a todo el sacrificio que han hecho por sacarnos adelante y por demostrarme que la base es el trabajo y la constancia.

A mi hermano Leonardo por ser mi mayor ejemplo.

A mis abuelos Roberto, Lucia y Martha por guiarme y apoyarme en todos los aspectos de mi vida.

A mi novia, Karina por sus consejos, amor y carisma.

Agradecimientos

Al Dr. José Reyes Gasga por aceptarme amablemente en su equipo de trabajo y guiarme durante todo mi camino de tesis, por todo el aprendizaje obtenido en sus cursos y horas en su cubículo.

Al Dr. Arturo Rodríguez Gómez por ser parte de mi comité tutor y por el tiempo dedicado en correcciones y observaciones en mi tema de tesis.

Al Dr. Antonio Enrique Salas Reyes por ser parte de mi comité tutor y por el tiempo dedicado en correcciones y observaciones en mi tema de tesis.

Al Técnico Pablo López Arriaga por el tiempo que me dedico para ayudarme en el laboratorio.

Al I.Q. Samuel Tehuacanero Núñez enseñarme y apoyarme en tantas cosas relacionadas con el uso del microscopio, por ayudarme a obtener los resultados reflejados en esta tesis.

Al Técnico Antonio Morales Espino por el apoyo en la caracterización por difracción de rayos X de las muestras.

Al Técnico Diego Quiterio Vargas por enseñarme con paciencia a realizar la preparación de las muestras en el laboratorio central de microscopia.

Al proyecto DGAPA-UNAM PAPIIT No. 100932 cuyo título es “Análisis de la morfología y la estructura atómica de los granos y de los cristales del esmalte dental humano”

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría (CVU: 1014612).

Al instituto de investigación en materiales por haberme formado como científico de materiales.

Al Instituto de Física por complementar mi formación como físico.

Índice

Índice de Figuras	iv
Índice de tablas	vii
Resumen.....	8
Abstract	9
Introducción	10
Planteamiento del problema	14
Objetivos	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos	15
Hipótesis	16
CAPÍTULO 1. Esmalte.....	18
1.1. Diente.....	18
1.2. Esmalte observado con un microscopio óptico	25
1.3. Esmalte observado con un microscopio electrónico de barrido (SEM)	26
1.4. Orientación de los prismas.....	28
1.5. Prismas del esmalte dental humano a diferentes escalas.....	29
1.6. Hidroxiapatita.....	31
1.7. Referencias bibliográficas del capítulo 1	33
CAPÍTULO 2. Técnicas de caracterización.....	35
2.1. Microscopía de luz.....	35
2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	38

2.3. Microscopia electrónica de transmisión	42
2.4. Difracción de rayos X	45
2.5. Espectroscopia de rayos X por dispersión de energía	49
Referencias Bibliográficas del capítulo 2.....	54
CAPÍTULO 3. Procedimiento experimental	55
3.1. Dientes.....	55
3.2. Preparación de muestras volumétricas.....	56
3.3. Preparación de muestras en polvo	62
Referencia Bibliográfica del capítulo 3.....	69
CAPÍTULO 4. Resultados	70
4.1. Difracción de rayos X	70
4.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	75
4.3. Espectroscopia de rayos X por dispersión de energía (EDS)	78
4.4. Espectroscopia de rayos X por dispersión de energía (EDS lineal)	95
4.5. Mapeos químicos elementales en la muestra en polvo.....	100
4.6. EDS-Line scan en los nano cristales cristales del esmalte dental humano ..	102
Referencias Bibliográficas del capítulo 4.....	105
CAPÍTULO 5. Discusión.....	106
Referencias Bibliográficas del capítulo 5.....	111
Conclusiones.....	112

Índice de Figuras

Figura I.1. Estructura y anatomía del diente humano (figura tomada de la referencia [3]).....	19
Figura I.2. Componentes del diente dental humano (figura tomada de la referencia [3]).	20
Figura I.3. Imagen de microscopia de luz mostrando el detalle de los prismas en corte longitudinal, su orientación es perpendicular a la superficie.....	26
Figura I.4. Imagen de microscopia de luz mostrando el detalle del prisma en su corte en sección transversal.....	27
Figura I.5. Prismas dispuestos paralelamente en un corte longitudinal observados con SEM, 800X.....	27
Figura I.6. Prismas dispuestos con un corte transversalmente observados con SEM 500X. (figura tomada de la referencia [4]).....	28
Figura I.7. Arreglo de los prismas del esmalte dental humano a diferentes escalas..	30
Figura I.8 Arreglo de los prismas del esmalte dental humano a diferentes escalas...	30
Figura II.1 Trayectoria de un rayo de luz en un microscopio de luz. Se presenta el principio de la magnificación de la imagen del objeto a través del sistema de lente....	36
Figura II.2. Principios de magnificación en un microscopio de luz.....	36
Figura II.3. a) Stereo microscope, b) Axiovert 25 zeiss.....	37
Figura II.4. Diagrama esquemático del funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido (SEM).....	38
Figura II.5. Prismas del esmalte dental humano en el modo de electrones secundarios en el microscopio electrónico de barrido (SEM).....	39
Figura II.6. Prismas del esmalte dental humano en el modo de electrones retro dispersados en el microscopio electrónico de barrido (SEM).....	40
Figura II.7. Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7800F.....	41
Figura II.8. Diagrama esquemático de un microscopio electrónico de transmisión...	43
Figura II.9. Polvo de esmalte dental humano en el modo de campo claro de microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	44
Figura II.10. Patrón de difracción de anillos de esmalte dental humano por microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	44
Figura II.11. Microscopio electrónico de transmisión JEOL modelo 2010F.....	45
Figura II.12 Diagrama esquemático de un instrumento de rayos X.....	46
Figura II.13. Ejemplo de espectro de intensidad correspondiente a polvo de esmalte dental con un difractómetro de rayos X.....	47
Figura II.14. Representación esquemática de la ley de Bragg.....	48
Figura II.15. Difractómetro bruker AXS D8.....	49
Figura II.16. Señales $k\alpha$ y $k\beta$ producidas en la espectroscopia de rayos X.....	50
Figura II.17. Esquema de la espectroscopia de rayos X.....	51
Figura II.18. a) EDS puntual en el centro de un prisma de esmalte dental humano b) Espectro elemental obtenido de la imagen a).....	52
Figura II.19. EDS lineal correspondiente a un prisma de esmalte dental humano.....	52

Figura II.20. Mapeo elemental EDS de nano/microestructuras híbridas Ag- Fe_3O_4 para los elementos carbono, oxígeno, hierro y plata [11].....	53
Figura III.1 Baño ultrasónico de la marca BRANSON modelo 1510.....	56
Figura III.2. Mezcla del monómero NICTONE y polímero Quarz R2.....	56
Figura III.3. Piezas dentales preparadas con la Mezcla del monómero NICTONE y polímero QuarzR2V.....	57
Figura III.4. Cortadora Isomet 1000 precision saw.....	58
Figura III.5. Corte longitudinal de una pieza dental molar	58
Figura III.6. Material para llevar a cabo el pulido mecánico del diente.....	59
Figura III.7. Pulido espejo usando alúminas con un tamaño de grano 1 μm y paño mojado	60
Figura III.8. Ataque químico a la muestra para revelar su estructura.....	61
Figura III.9. Muestra transversal(izquierda) y muestra longitudinal preparadas para ser observadas en el microscopio electrónico de barrido (SEM).....	62
Figura III.10. Obtención de polvo de esmalte usando la pieza de mano.....	63
Figura III.11. Equipo de tamizado usado	64
Figura III.12 Proceso de trituración en el mortero de ágata	64
Figura III.13. El polvo de esmalte obtenido.....	65
Figura III.14. Proceso de centrifugado	66
Figura III.15. Centrifugadora Eppendorf 4835.....	67
Figura III.16. El método de la jeringa.....	68
Figura IV.1 Resultados del proceso de centrifugado de las muestras del esmalte dental humano en polvo diluidas en, a) H_2O , b) $NaClO$	70
Figura IV.2. Difractogramas de rayos x de las muestras del esmalte dental humano en polvo presentados en la figura IV.1. a) H_2O , b) $NaClO$	71
Figura IV.3 Difractogramas de las muestras volumétricas del esmalte dental humano. a) dirección transversal, b) dirección longitudinal.....	73
Figura IV.4. Imágenes SEM en el modo electrones secundarios a diferentes ampliaciones de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal. a)10,000x, b)30,000x, c)50,000x y d)100,000x.....	76
Figura IV.5. Imágenes SEM en el modo electrones secundarios a diferentes ampliaciones de la muestra del esmalte dental humano en la dirección longitudinal. a)10,000, b)20,000x, c)50,000x y d)100,000x.....	77
Figura IV.6. Imágenes SEM de la muestra en polvo del esmalte dental humano en el modo electrones secundarios a diferentes ampliaciones. a)10,000, b)15,000x, c)100,000x y d)140,000x.....	78
Figura IV.7. Imágenes de SEM a 2,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal y espectros de EDS en el modo puntual obtenidos en la interfase y en el centro del prisma.....	80
Figura IV.8. Mapeos químico elemental de EDS a 2,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal.....	81
Figura IV.9. Imágenes de SEM a 2,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal y los espectros de EDS en el modo puntual obtenidos en la interfase y en el centro del prisma.....	83
Figura IV.10. Mapeos químico elemental de EDS a 2,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal. El objeto tipo mariposa indica la misma posición en todas las imágenes.....	84

Figura IV.11. Imágenes de SEM a 10,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal y los espectros de EDS en el modo puntual obtenidos en la interfase y en el centro del prisma.....	85
Figura IV.12 Mapeos químico elemental de EDS a 10,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal. El objeto tipo mariposa indica la misma posición en todas las imágenes.....	87
Figura IV.13. Imágenes de SEM a 10,000x de la muestra en dirección transversal..	88
Figura IV.14. Mapeos químico elemental de EDS a 10,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal. El objeto tipo mariposa indica la misma posición en todas las imágenes.....	89
Figura IV.15 Imágenes de SEM a 20,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal y los espectros de EDS en el modo puntual obtenidos en la interfase y en el centro del prisma.....	90
Figura IV.16. Mapeos químico elemental de EDS a 20,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal.....	92
Figura IV.17. Imágenes de SEM a 20,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal y los espectros de EDS en el modo puntual obtenidos en la interfase y en el centro del prisma.....	93
Figura IV.18. Mapeos químico elemental de EDS a 20,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal. El objeto tipo mariposa indica la misma posición en todas las imágenes.....	94
Figura IV.19. EDS-Lineal en la muestra longitudinal del esmalte dental humano. La longitud de la línea analizada es de 3 micras.....	96
Figura IV.20. EDS-Lineal individual de los elementos registrados en la muestra longitudinal del esmalte dental humano.....	97
Figura IV.21. EDS-Lineal en la muestra transversal del esmalte dental humano. La longitud de la línea analizada es de 5 micras.....	98
Figura IV.22. EDS-Lineal individual de los elementos registrados en la muestra transversal del esmalte dental humano.....	99
Figura IV.23. Mapeos químico elemental de EDS a 45,000x de la muestra en polvo del Esmalte dental humano.....	101
Figura IV.24. Mapeos químico elemental de EDS a 85,000x de la muestra en polvo del esmalte dental humano.....	102
Figura IV.25. imágenes de SEM a 100,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal y los espectros de EDS-Lineal a lo largo del cristal del esmalte.....	103
Figura V.1. Mapeos químicos obtenida por tomografía atómica en los granos nanométricos del esmalte dental humano fluorado. a) Mg en magenta, b) Na en verde, c) F en púrpura, d) C en forma de carbonilo (COH) en verde azulado. Las barras de escala de 20nm.....	110

Índice de Tablas

Tabla IV.1. Resultados del EDS puntual en peso porcentual obtenidos de la figura IV.8.	81
Tabla IV.2. Resultados en peso porcentual del EDS obtenido de la figura IV.10.....	83
Tabla IV.3. Resultados en peso porcentual del EDS puntual obtenido de la figura IV.12	86
Tabla IV.4. Resultados en peso porcentual del EDS puntual obtenido de la figura IV.14	88
Tabla IV.5. Resultados del EDS puntual obtenido de la figura IV.16.....	91
Tabla IV.6. Resultados del EDS puntual obtenido de la figura IV.18.....	93
Tabla IV.7. Concentraciones por elemento obtenidos del análisis de EDS en el modo lineal (EDS-lineal) a lo largo de las líneas 1 y 2 dentro de los cristales del esmalte dental humano correspondientes a la figura IV.26.....	104
Tabla IV.8. Concentraciones de Ca y P obtenidos del análisis de EDS en el modo puntual a lo largo de las líneas en el centro de los cristales del esmalte dental humano.	104
Tabla V.1. Resumen de resultados de SEM-EDS de las concentraciones de los elementos registrados en el esmalte dental humano a diferentes ampliaciones. ...	107

Resumen

El esmalte dental humano es junto con la dentina un componente importante del diente humano. Debido a que es una parte visible del cuerpo humano y muy importante para la salud bucal, su estructura y sus enfermedades han sido estudiados desde tiempos inmemorables. En el área de la estructura, a pesar de que su composición química guarda una relación estrecha con la hidroxiapatita (HAP, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), su celda unitaria cristalográfica no ha sido obtenida. Grandes avances se han presentado en esta dirección, pero hasta el día de hoy no ha sido reportada la celda unitaria del esmalte dental humano.

Es bien sabido que al realizar el análisis químico del esmalte dental humano por diferentes técnicas se obtienen los elementos mayoritarios de calcio (*Ca*), fósforo (*P*), oxígeno (*O*), e hidrógeno (*H*), que son los elementos que conforman la HAP, también se detectan, además, elementos minoritarios como el carbono (*C*), sodio (*Na*), magnesio (*Mg*), cloro (*Cl*), flúor (*F*), etc. Esto hace un poco complejo el obtener la celda unitaria que representa el cristal nanométrico del esmalte.

En este trabajo de tesis se analizó la estructura y composición química del esmalte dental humano a diferentes escalas, desde la milimétrica hasta la nanométrica poniendo principal atención en la localización de los elementos dentro de la estructura del esmalte dental humano.

Las técnicas de análisis usadas fueron la microscopia de luz (ML), la microscopia electrónica de barrido (SEM), la espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS), la microscopia electrónica de transmisión (TEM y HRTEM), así como el análisis por la difracción de rayos x (XRD).

Los resultados indicaron que el carbono se encuentra principalmente dentro de los cristales mientras que el sodio y el magnesio se encuentran en la interfase de los cristales.

Abstract

Human dental enamel is, together with dentin, an important component of the human tooth. Because it is a visible part of the human body and very important for oral health, its structure and diseases have been studied since an immemorial time. In the field of structure, despite the fact that its chemical composition is closely related to hydroxyapatite (HAP, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), its crystallographic unit cell has not been obtained. Great advances have been made in this direction, but to this day it has not been reported.

It is well known that when carrying out the chemical analysis of human dental enamel through different analytical techniques, in addition to the main elements of calcium (*Ca*), phosphorus (*P*), oxygen (*O*), and hydrogen (*H*), which are the elements of HAP, are also detected minor elements such as carbon (*C*), sodium (*Na*), magnesium (*Mg*), chlorine (*Cl*), fluorine (*F*), etc. All this makes it a little bit complex to obtain the crystallographic unit cell for the nanometric crystal of the human tooth enamel.

In this work, the structure and chemical composition of human tooth enamel was analyzed at different scales, from the millimeter to the nanometer, paying special attention to the site localization of the elements within the structure of human dental enamel.

The analysis techniques used in this work were light microscopy (ML), scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS), transmission electron microscopy (TEM and HRTEM), as well as analysis by x-ray diffraction (XRD).

The results indicated that carbon is found mainly within the crystals while sodium and magnesium are found at the crystal interface.

Introducción

A nivel micrométrico, la estructura del esmalte dental humano está constituido de unas estructuras sinusoidales que van de la superficie a la unión amelodentinaria conocidas como “prismas”, tal como se muestra en la figura 1. En dirección transversal, la cual corresponde a la dirección normal a la superficie del esmalte, estos prismas tienen una forma característica llamada “cabeza de cerradura” o “escamas”, y miden 5 μm , aproximadamente.

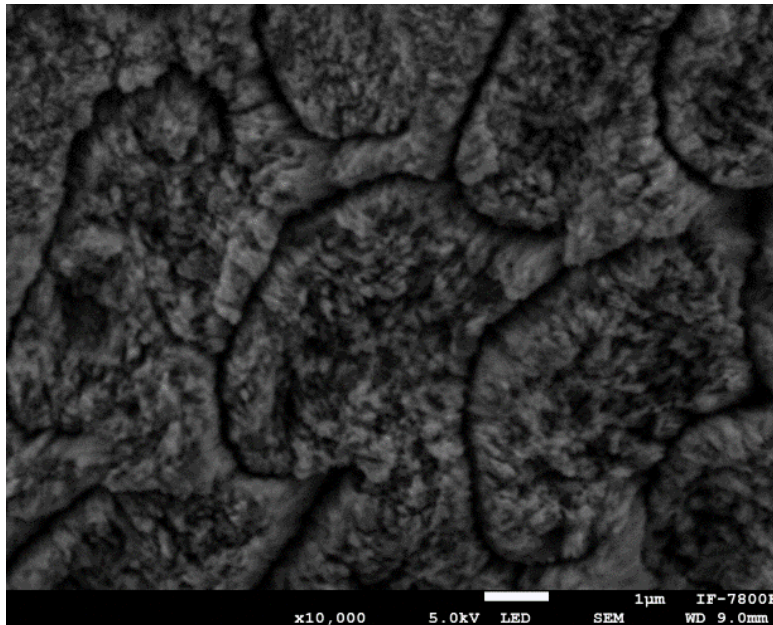


Figura 1. Prismas del esmalte dental humano observadas en sección transversal.

El esmalte dental humano está constituido químicamente por material orgánico (1-2 %), material inorgánico (95%), principalmente hidroxapatita cristalina (HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), y agua (3-5 %) [1]. Sin embargo, hasta ahora no se ha reportado la celda unitaria del esmalte dental que nos permita explicar el análisis químico observado en los nano cristales del esmalte, pues también se registran elementos adicionales a los correspondientes a la HAP, tales como C, Mg, Na, F etc.

La forma que presentan los prismas dependerá claramente del tipo de corte que se haga al diente. En sección transversal (la superficie del esmalte) se observará la figura de la “cerradura”, tal y como se observa en la figura 1. En la sección longitudinal (la dirección normal a la longitud del prisma y en la cual se observa, dependiendo de

la ampliación de la imagen, los prismas, la unión amelodentinaria y la dentina en el mismo cuadro) los prismas se observan como líneas o franjas sinuosas que van desde la superficie del esmalte hasta la unión amelodentinaria, tal y como se muestra en la figura 2. Ambas orientaciones de los 2 cortes, tanto longitudinal como transversal se pueden observar fácilmente en la figura 3.

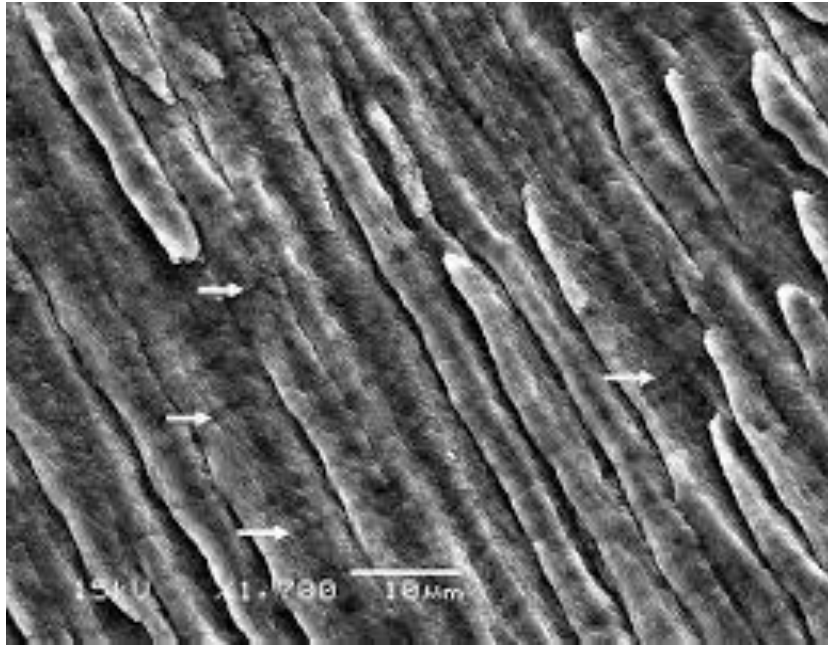


Figura 2. Líneas sinuosas correspondiente a los prismas del esmalte dental humano observados en la sección longitudinal.

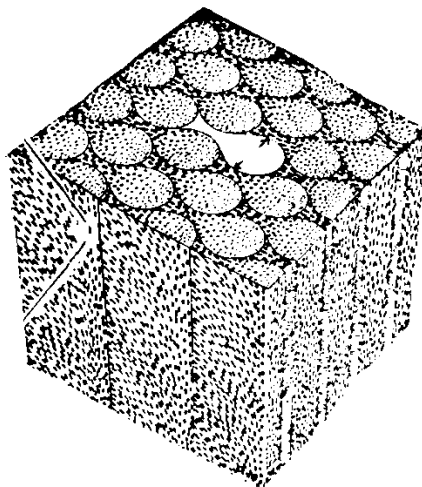


Figura 3. Estructura del esmalte dental humano.

Los prismas, a su vez, a escala nanométrica están constituidos de nanocristales que en promedio miden 50x100x500nm. En la figura 4 se presentan los estos cristales nanométricos al ser observados por microscopia electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM).

Cabe comentar que uno de los principales problemas en la odontología, es que el diente humano sufre de caries y el paciente llega hasta perder el diente, por eso es muy importante el conocer y estudiar la estructura y composición química del diente. Cabe mencionar que la salud bucal no ha mejorado en los últimos 25 años, y las condiciones orales siguen siendo un importante desafío para la salud pública en el mundo. Debido a los cambios demográficos, incluyendo el crecimiento y el envejecimiento de la población, la carga acumulada de afecciones bucodentales aumentó drásticamente entre 1990 y 2015 [2].

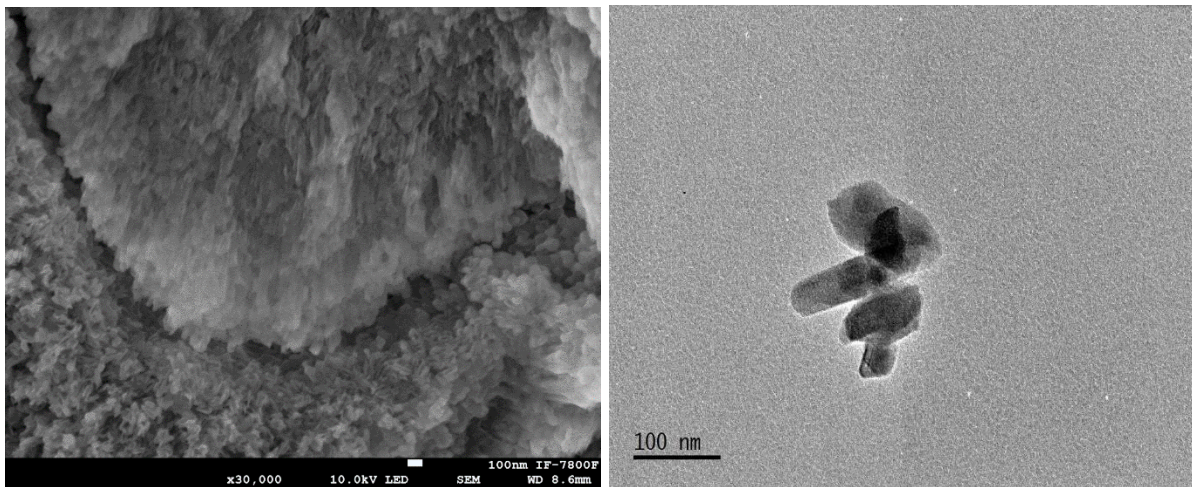


Figura 4. Imágenes de los nanocristales que conforman los prismas del esmalte dental. A) SEM (la flecha indica uno de los nanocristales del esmalte). B) TEM.

Según el análisis más reciente disponible, el costo económico global de las enfermedades dentales es de \$544 mil millones, con \$357 mil millones en costos directos de tratamiento y \$187 mil millones en pérdidas de productividad para la economía. Si asumimos que el 45% de esta carga económica se puede atribuir a la caries, la estimación resultante es una carga económica global de caries de \$245 mil

millones. Esto incluye una cantidad estimado de \$161 mil millones en costos de tratamiento directo para la caries y un estimado de \$84 mil millones en pérdidas indirectas de productividad por caries [3].

De acuerdo con cifras obtenidas del estudio aplicado a América Latina con indicadores de caries, CPOD, provenientes de la OMS, (Oral Health Country 2005), la presencia de las enfermedades dentales se distribuye con el siguiente porcentaje: América Central 4.2 (excepto Cuba), América Central, incluyendo Cuba, 3.8, América del Sur, 3.6, y América del Norte 2.5. [4].

Planteamiento del problema

Las enfermedades dentales y bucales que afectan a la población a nivel mundial incluyen desde la caries hasta el cáncer oral, lo que implica no sólo un enorme gasto en salud, sino además uno de los trastornos crónicos que ponen en riesgo a más del 90% de la población mundial, según la Federación Dental Internacional (FDI). A pesar de la notable disminución general de los casos de caries dental durante los últimos 30 años, según la OMS, su prevalencia sigue siendo inadmisiblemente alta en muchos países desarrollados. Incluso en países donde el promedio de los índices CPO es bajo, como China o Nigeria, una importante proporción de los niños presentan niveles relativamente altos de caries dental. [5].

Por otro lado, la estructura y composición química del esmalte dental humano aún tiene varias incógnitas al saber humano en general, y a la ciencia de materiales en particular. En medio de esto, la microscopía electrónica y otras técnicas de análisis están jugando un papel muy importante en la solución de tales incógnitas [6]. El estudio de los tejidos del diente humano como lo es el esmalte desde un punto de vista estructural es de suma importancia para la ciencia odontológica. Al tener en claro la morfología y composición química a diferentes escalas del esmalte, nos dará la posibilidad de comprender mejor el funcionamiento del diente humano, y desarrollar mejores herramientas para prevenir y atacar problemas dentales como la caries dental.

Al realizar el análisis químico del esmalte dental humano por diferentes técnicas de análisis se obtienen los elementos mayoritarios de calcio (*Ca*), fósforo (*P*), oxígeno (*O*), e hidrógeno (*H*), que son los elementos que conforman la HAP, también se detectan, además, elementos minoritarios como el carbono (*C*), sodio (*Na*), magnesio (*Mg*), cloro (*Cl*), flúor (*F*), etc. Esto hace un poco complejo el obtener finalmente la celda unitaria que representa el cristal nanométrico del esmalte dental humano.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la composición química del esmalte dental humano a escala milimétrica, micrométrica y nanométrica, e identificar lo más preciso posible el sitio donde se localizan los elementos dentro de la estructura del esmalte dental a escala milimétrica, micrométrica y nanométrica.

Objetivos específicos

- Determinar la composición química del esmalte dental humano a escala milimétrica: Caracterizar todas las muestras por difracción de rayos X.
- Determinar la composición química, morfología y distribución de los elementos a escala micrométrica: Caracterizar todas las muestras por microscopía electrónica de barrido y por espectroscopia de rayos X de energía dispersiva respectivamente (SEM y SEM-EDS).
- Determinar la composición química, morfología y distribución de los elementos a escala nanométrica: Caracterizar todas las muestras por microscopía electrónica de barrido y por espectroscopia de rayos X de energía dispersiva respectivamente (SEM y SEM-EDS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM y HRTEM).

Hipótesis

Aunque los elementos mayoritarios del esmalte dental humano son los correspondientes a la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), la distribución de los elementos químicos adicionales (C, Na, y Mg) se encuentran localizados en diferentes zonas del esmalte dental humano.

Metodología

- Conseguir las piezas dentales.
- Preparar 4 muestras.
 1. Una muestra de 3mmx3mm de esmalte en la dirección transversal.
 2. Una muestra de esmalte de 3mm de espesor en dirección longitudinal.
 3. Una muestra de polvo de esmalte diluida en cloro comercial (NaClO)
 4. Una muestra de polvo de esmalte diluida en agua destilada (H_2O)
- Someter las muestras 3 y 4 (NaClO) 4(H_2O) respectivamente, a un proceso de centrifugación para obtener diferentes fases por densidad.
- Caracterizar por difracción de rayos X las muestras 1 y 2, así como las diferentes fases obtenidas de las muestras 3 y 4.
- Caracterizar las muestras 1 y 2, así como las obtenidas por las diferentes fases de las muestras 3 y 4 por microscopia electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS), microscopia electrónica de transmisión (TEM y HRTEM)

Referencias

- 1.-Gómez ME, Campos A (2.002): “Esmalte”. En *Histología y Embriología Bucodental*. 2ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. Capítulo10, pág 271-315. I.S.B.N.: 84-7903-716-4.
- 2.- Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, et al. Prevalencia, incidencia y años de vida ajustados por discapacidad a nivel mundial, regional y nacional para afecciones bucales en 195 países, 1990–2015: un análisis sistemático de la carga mundial de enfermedades, lesiones y factores de riesgo. *Revista de Investigación Dental*. 2017;96(4):380-387. doi: 10.1177/0022034517693566
- 3.- Righolt AJ, Jevdjevic M, Marcenes W, Listl S. Global-, regional-, and country-level economic impacts of dental diseases in 2015. *J Dent Res*. 2018;97(5):501-507.
- 4.- FEDERACIÓN DENTAL INTERNACIONAL (FDI). Abril 2023. <https://www.fdiworldddental.org/>
- 5.- Informe sobre el problema mundial de las enfermedades bucodentales. En: Organización Mundial de la Salud [en línea] [consultado el 10/06/2019]. Disponible en www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/es/
- 6.- Fawcett, DW (1.995): “Los dientes”. En *Tratado de histología*. 12ª Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid. España. Capítulo 24, pág 633-648. I.S.B.N.: 84-486-0107-6.

CAPÍTULO 1. Esmalte

En este capítulo se comentará sobre la estructura del diente, con especial énfasis en la estructura del esmalte dental humano. La estructura se comentará desde el punto de vista histológico. También se comentará la información cristalográfica y química de los cristales de HAP.

1.1. Diente

Los dientes son estructuras duras que se utilizan para triturar y masticar los alimentos. Estos tienen su propia estructura única que les permite despedazar los alimentos [1]. Algunos animales tienen la capacidad de reemplazar sus dientes a lo largo de su vida, ya que los dientes pueden perderse debido a una lesión o enfermedad. Los seres humanos tienen dos juegos de dientes: los dientes de leche que se aflojan y se caen antes de la edad adulta, y los dientes permanentes que permanecen en su lugar durante toda la vida adulta. Sin embargo, no se recuperan una vez perdidos.

Los dientes están compuestos por cuatro tejidos dentales (figura I.1). Tres de ellos son el esmalte, la dentina y el cemento, éstos son tejidos duros, siendo el esmalte el tejido más duro del cuerpo humano. El cuarto tejido, la pulpa, se localiza en el centro del diente y contiene nervios, vasos sanguíneos y tejido conectivo. Este es un tejido blando o no calcificado [2].

La estructura de un diente humano incluye, por lo tanto, los siguientes tejidos:

- **Esmalte:** es la cubierta exterior dura y calcificada que se utiliza para masticar los alimentos. El esmalte dental humano consiste principalmente en una matriz de hidroxiapatita (HAP), un mineral hecho de fosfato de calcio cristalino que es creado por las células del cuerpo durante el desarrollo de los dientes. La HAP también se encuentra en algunas rocas y en la matriz de minerales/proteínas que forman las duras capas externas de nuestros huesos.

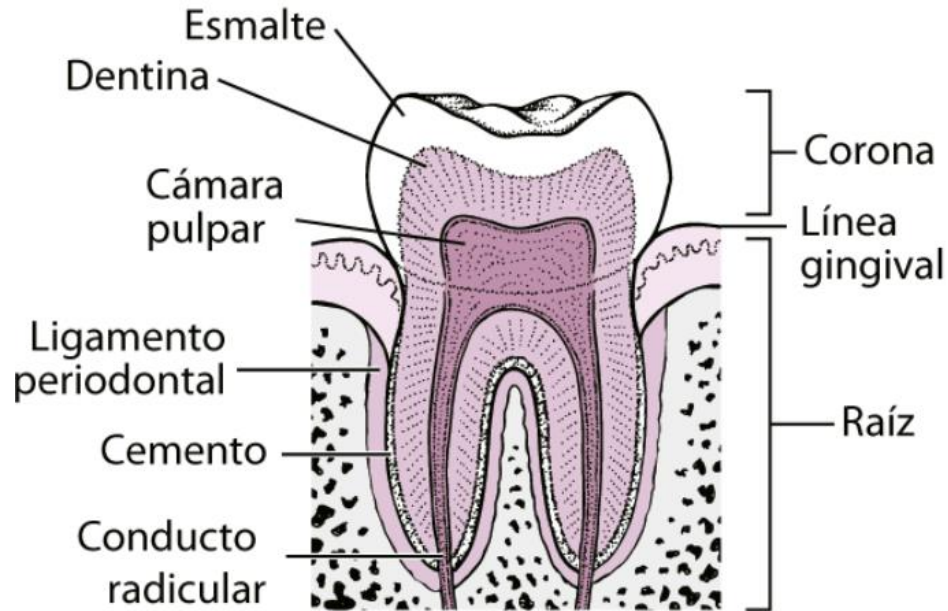


Figura I.1. Estructura y anatomía del diente humano (figura tomada de la referencia [3]).

- **Dentina:** un material más blando que el esmalte que sirve como última línea de defensa para la pulpa del diente en caso de que el esmalte se rompa o se disuelva.
- **Cemento:** un tejido similar al hueso que incluye tanto HAP como proteínas conectivas. Este tejido une el diente a los ligamentos periodontales, que mantienen el diente firmemente estable en su lugar dentro de la mandíbula.
- **Pulpa:** contiene vasos sanguíneos y nervios necesarios para mantener el diente sano y alertar al organismo de lesiones e infecciones dentales peligrosas.

El “cuerpo” del diente se divide en las siguientes regiones (figura I.2):

La raíz: que consta de dentina y pulpa, con una cubierta de cemento que ancla el diente a la mandíbula. La raíz es especialmente vulnerable a lesiones e infecciones porque carece de esmalte protector que recubre la dentina y la propia raíz.

El cuello: que es el lugar donde el cemento de la raíz se encuentra con el esmalte de la corona del diente. La raíz tiene una fina capa de esmalte y una gruesa capa de dentina que protege la raíz.

La corona: consiste en una superficie de esmalte grueso que se usa para cortar y moler alimentos. Una gruesa capa de dentina se encuentra debajo del esmalte, entre este y la pulpa del diente [2].

1.1.1 Esmalte

El esmalte es llamado también tejido o sustancia adamantina, cubre a manera de casquete a la dentina en su porción coronaria ofreciendo protección al tejido conectivo subyacente integrado en el isosistema dentino-pulpar. El material más duro en el cuerpo humano es el esmalte, esto es debido a que el esmalte está compuesto por millones de prismas altamente mineralizados que van desde la unión amelodentinaria hasta la superficie del diente.[4].

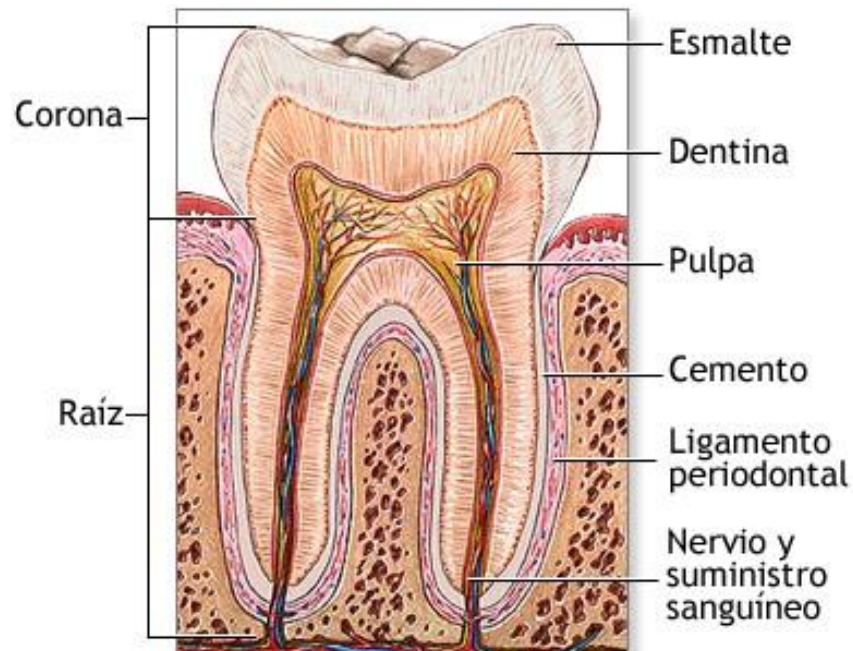


Figura I.2. Componentes del diente dental humano (figura tomada de la referencia [3]).

Las características que hacen al esmalte dental humano un tejido único son:

- 1.- Es de naturaleza ectodérmica, se origina por el tejido formado por varias capas de células unidas entre sí, que recubre la superficie libre de la boca.
- 2.- La matriz orgánica del esmalte dental, en su mayoría son proteínas no colágenas con agregado de polisacáridos.
- 3.- Los cristales nanométricos del esmalte se encuentran empaquetados en los prismas los cuales tienen cabeza de cerradura. Estos cristales son solubles en ácidos y debido a esto existen problemas de caries dental.
- 4.- El esmalte completamente maduro, no contiene células de ningún tipo, y se presenta como un material altamente mineralizado.
- 5.- Frente a cualquier agente o patógeno que dañe el esmalte, este es incapaz de repararse por sí mismo [4].

1.1.2 Propiedades físicas del esmalte dental humano

Dureza: La dureza es la resistencia que un material opone al ser sometido a presiones, rayaduras o incluso a ser penetrado. Dicha característica está relacionada con propiedades elásticas y plásticas del material. “Los valores promedios de dureza del esmalte en dientes permanentes se encuentran entre 3,1 y 4,7 Giga pascales (GPa)” [4].

Elasticidad: La elasticidad del esmalte es baja, debido a la cantidad de agua y material orgánico que posee, y por lo tanto, es un material frágil que tiende a presentar micro y macro fracturas. “El valor promedio medido del módulo de Young, son de 87.5 ± 2.2 GPa y 72.7 ± 4.5 GPa, cuando los esfuerzos son realizados en dirección paralela y perpendicular al eje de los prismas” [4].

Color y transparencia: El color del esmalte varía entre un color blanco y amarillo, dependiendo del espesor del esmalte y que tan mineralizado se encuentra este en esa zona. Por lo tanto, el color amarillo del esmalte corresponde al color de la dentina.

Permeabilidad: La permeabilidad es extremadamente baja y se ha demostrado que el esmalte puede actuar como una membrana semi permeable, permitiendo únicamente el paso del agua y algunos minerales presentes en la boca.

1.1.3 Composición química del esmalte

El esmalte está constituido principalmente por una matriz inorgánica de HAP (95%), agua (3-5%) y en su minoría por una matriz orgánica (1-2 %).[4].

1.1.3.1 Matriz orgánica

A diferencia de los huesos, la matriz orgánica del esmalte dental humano está constituida de proteínas no colágenas. “Además de las proteínas no colagenas, en la matriz del esmalte existen: proteínas que son solubles e insolubles, así como glucosaminoglicanos, proteoglicanos y diversas clases de lípidos, enzimas y pequeños porcentajes de condroitín 4-sulfato y condroitín 6-sulfato” [6]. Las proteínas promueven, entre otros procesos, el proceso de remineralización, producen minerales para poder formar más cristales, controlan el crecimiento, tamaño y morfología de los cristales, y funcionan como soporte físico el cual proporciona protección en la fase mineral de crecimiento de los cristales [7].

Durante las fases tempranas en el desarrollo del esmalte dental humano. Los ameloblastos producen la mayor cantidad de matriz orgánica y después, ya cuando el esmalte es maduro, la cantidad de material orgánico decrece mientras que la cantidad de material inorgánico crece [8].

1.1.3.2 Matriz inorgánica

La matriz inorgánica es esta constituida en su mayor porcentaje por el fosfato de calcio en forma de HAP cristalina. Sin embargo, a diferencia de los de otros tejidos con este mismo fosfato como los huesos, están constituidos por sales minerales cálcicas básicamente de fosfato y carbonato. Dichas sales, de acuerdo con estudios realizados

con difracción de rayos X, muestran una organización apatítica de HAP. Estas sales se depositan en la matriz del esmalte, dando origen a un proceso de cristalización que transforma la masa mineral en cristales de HAP.

En el esmalte, a diferencia de lo que ocurre en la dentina y el tejido óseo, no parece existir fosfato cálcico amorfo. Existen también sales minerales de calcio como carbonatos y sulfatos, y oligoelementos como potasio, magnesio, hierro, flúor, manganeso, cobre, etc. Los iones flúor pueden sustituir a los grupos hidroxilos en el cristal de HAP y convertirlo en un cristal de fluorhidroxiapatita que lo vuelve resistente (menos soluble) a la acción de los ácidos y, por ende, más resistentes.

Agua: El agua es el tercer componente de la composición química del esmalte. Se localiza en la periferia del cristal constituyendo la denominada capa de hidratación, o capa de agua adsorbida [4].

1.1.3.3 Estructura histológica del esmalte

La estructura histológica del esmalte está constituida a escala milimétrica por prismas del esmalte con forma de “cabeza de cerradura”, y a su vez estos prismas están constituidos por cristales de HAP. El conjunto de prismas del esmalte forma el esmalte prismático, que constituye la mayor parte de esta matriz extracelular mineralizada. En la periferia de la corona y en la conexión amelodentinaria, existe el denominado esmalte aprismático, en el que la sustancia adamantina mineralizada no constituye ni configura prismas. [4].

1.1.3.4 Esmalte prismático

Los prismas son estructuras longitudinales de 5 μm de espesor en promedio, que se dirigen desde la conexión amelodentinaria hasta la superficie del esmalte. El diámetro de los prismas es menor en su punto de origen y aumenta gradualmente a medida que se acerca a la superficie libre. El número de prismas varía en relación con el tamaño de la corona estimándose entre 5 y 12 millones. [4].

1.2 Esmalte observado con un microscopio óptico

Al estudiar la morfología de los prismas con el microscopio de luz (también llamado microscopio óptico, MO), dependiendo de la incidencia de los cortes, éstos se observan como bandas delgadas o varillas adamantinas irregularmente paralelas en cortes longitudinales (figura I.3) y en las imágenes también en sección longitudinal, pero a menor amplificación, se observa con una morfología sinusoidal (figura I.4). [4].

1.3 Esmalte observado con un microscopio electrónico de barrido (SEM)

La aplicación de un microscopio electrónico de barrido (SEM) para estudiar la morfología de los prismas ha permitido resolver muchos interrogantes acerca de la forma de estos. Con dicha técnica y en cortes longitudinales se observan como bastones irregularmente paralelos (figura I.5). En los cortes transversales los prismas se presentan como secciones irregularmente hexagonales, ovoides o en escamas de pescado (figura I.6). [4].

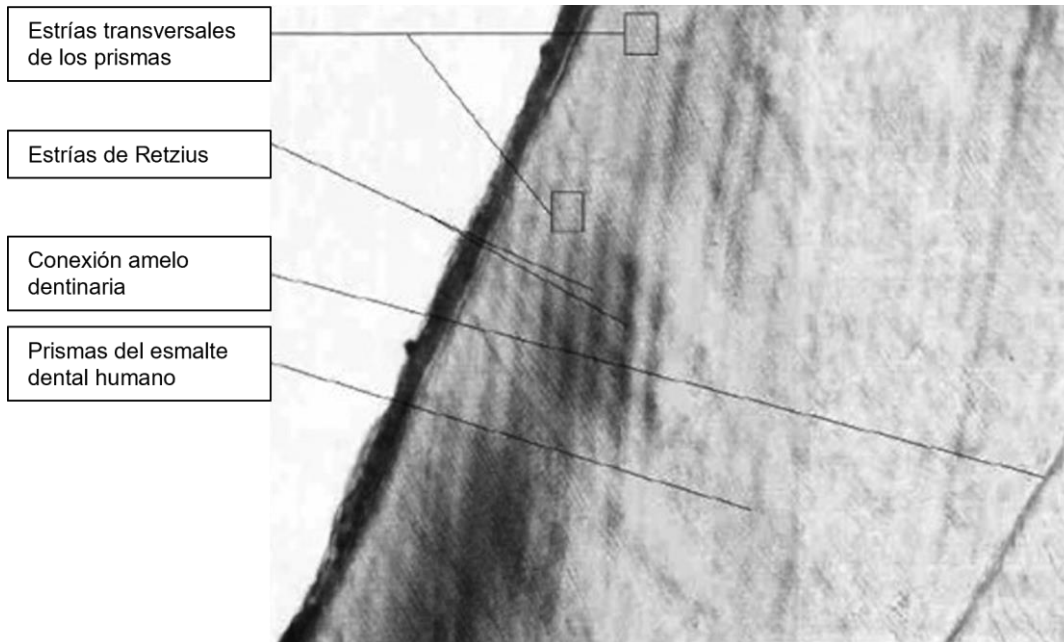


Figura I.3 Imagen de microscopía de luz mostrando el detalle de los prismas en corte longitudinal, su orientación es perpendicular a la superficie. Técnica por desgaste 60x. (figura tomada de la referencia [4]).



Figura I.4 Imagen de microscopia de luz mostrando el detalle del prisma en su corte en sección transversal 60x. (figura tomada de la referencia [4]).

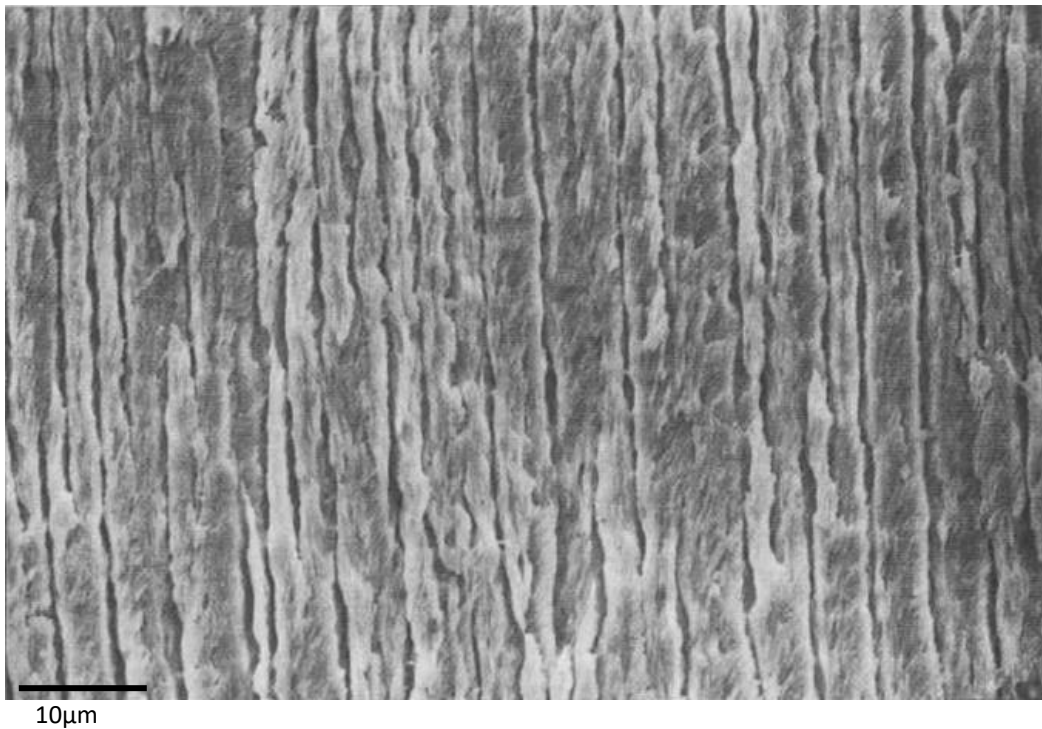
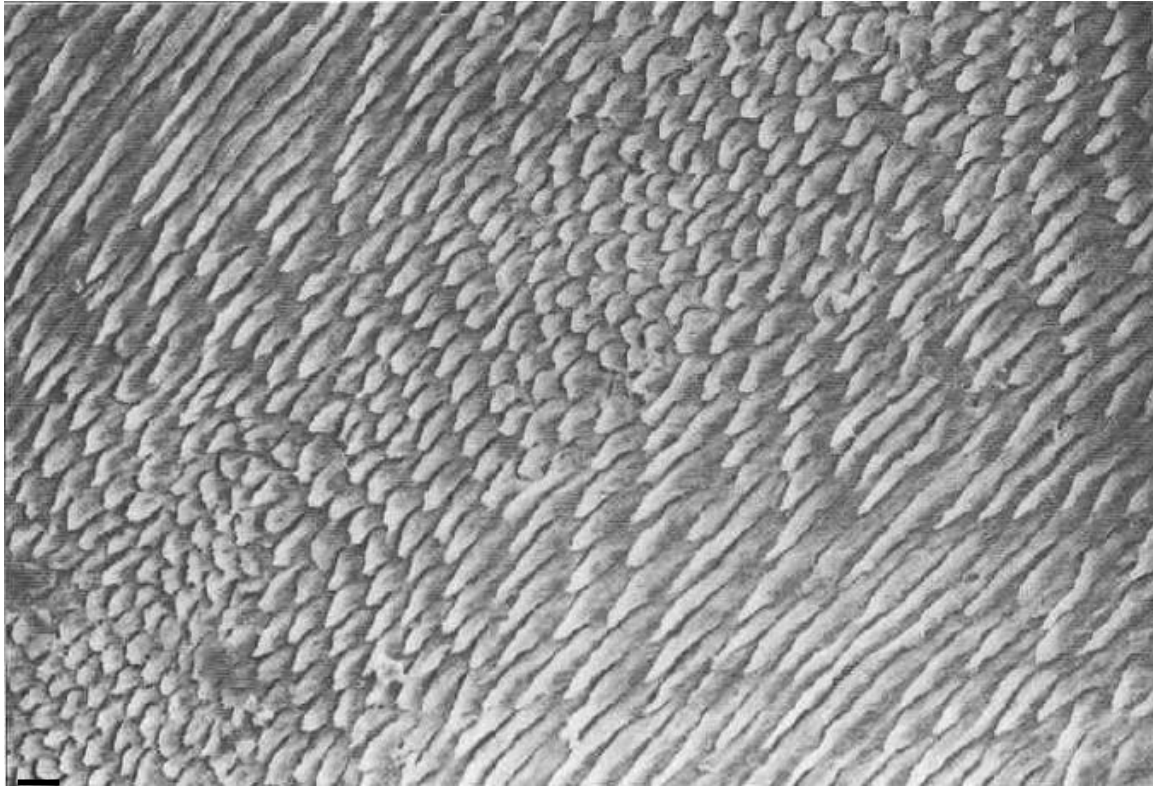


Figura I.5. Prismas dispuestos paralelamente en un corte longitudinal observados con SEM, 800X. (figura tomada de la referencia [4]).



10 μ m
Figura I.6. Prismas dispuestos con un corte transversalmente observados con SEM 500X. (figura tomada de la referencia [4]).

1.4 Orientación de los prismas

La orientación de los prismas en el seno del esmalte dental humano es bastante compleja, pues no siguen una trayectoria rectilínea a través del esmalte, sino que, en algunas zonas, por su recorrido sinuoso, experimentan entrecruzamientos (figura I.7) [4]. Los prismas tienden a mantenerse en hileras dispuestas circunferencialmente alrededor del eje mayor del diente y se orientan de forma perpendicular a la superficie del diente y mientras más se acercan a la superficie externa del diente se inclinan ligeramente.

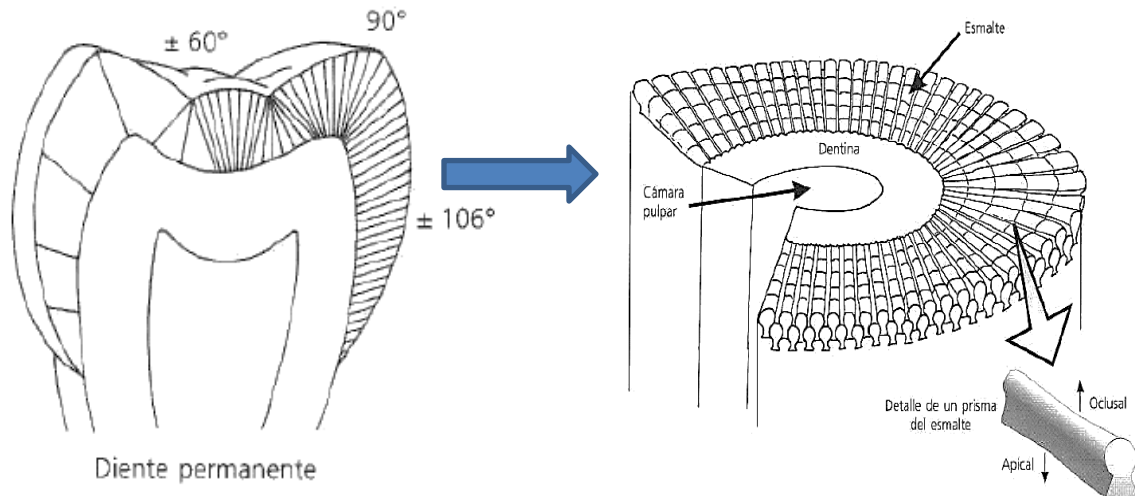
1.5 Prismas del esmalte dental humano a diferentes escalas

Los cristales del esmalte son más grandes comparado con los existentes en la dentina y el tejido óseo. Los cristales del esmalte tienen una longitud de 100 a 1,000 nm, ancho de 30 a 70 nm y altura de 10 a 40 nm. En relación con la morfología de los cristales del esmalte se ha admitido clásicamente desde Nylen, que éstos presentan una morfología de hexágonos alargados cuando se seccionan perpendicularmente al eje longitudinal del cristal (figura 1.7) y una morfología rectangular cuando se seccionan paralelamente a los ejes longitudinales. Warshansky afirma que los hexágonos que se observan no son todos iguales y que los lados de los extremos distales son, en ocasiones, semejantes o desiguales [4].

1.6 Hidroxiapatita

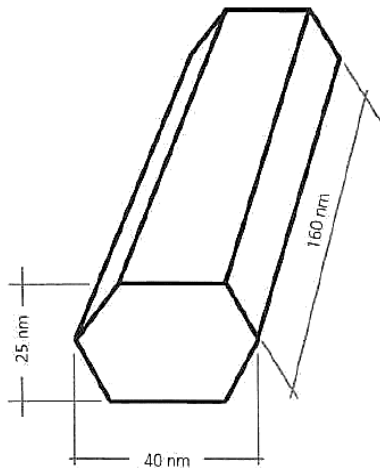
Los cristales del esmalte son más grandes comparado con los existentes en la dentina y el tejido óseo. Los cristales del esmalte tienen una longitud de 100 a 1,000 nm, ancho de 30 a 70 nm y altura de 10 a 40 nm. En relación con la morfología de los cristales del esmalte se ha admitido clásicamente desde Nylen, que éstos presentan una morfología de hexágonos elongados cuando se seccionan perpendicularmente al eje longitudinal del cristal (figura 1.7) y una morfología rectangular cuando se seccionan paralelamente a los ejes longitudinales. Warshansky afirma que los hexágonos que se observan no son todos iguales y que los lados de los extremos distales son, en ocasiones, semejantes o desiguales [4].

La hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], HAP] es un mineral natural. También es uno de los fosfatos de calcio (CaPs) más investigados. La hidroxiapatita es un componente inorgánico importante en el tejido duro y se puede encontrar en aproximadamente el 60 % de los huesos, el 97 % del esmalte dental y el 70 % de la dentina dental. [12,13].

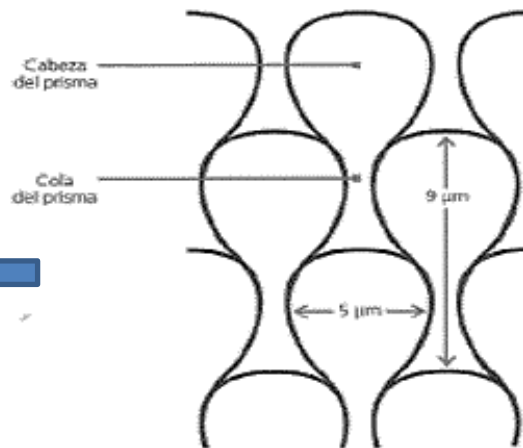


A) Disposición de los prismas del esmalte en el diente humano. Los grados indicados son medidos con respecto a la superficie del esmalte.

B) Disposición de los prismas con respecto a la superficie de la unión amelo dentinaria. Escala milimétrica.



D) Diagrama del cristal del esmalte dental humano. Escala nanométrica



C) Diagrama del arreglo de los prismas en la superficie del esmalte. Escala micrométrica.

Figura I.7. El arreglo de los prismas del esmalte dental humano a diferentes escalas (A-C) y las dimensiones del cristal del esmalte dental humano (D).

Este fosfato de calcio, que se puede obtener de forma sintética, presenta características de biocompatibilidad, no toxicidad, estabilidad química, osteoconducción y bioactividad; tales propiedades hacen al material muy práctico para usos médicos. La HA se puede usar como reemplazo de partes pequeñas de hueso, relleno de cavidades en odontología, recubrimiento de superficies de metales para implantes, refuerzo en materiales compuestos y como liberador de medicamentos, entre otros. Para una aplicación determinada se requieren diferentes características de la HA, como pueden ser su capacidad de reabsorción o bioactividad [14].

El estudio de la HAP se ha realizado desde hace varias décadas. Aaron y Posner (1958) propusieron su estructura cristalina a partir del análisis de un monocristal [15]. Este fosfato cristaliza en el sistema hexagonal, grupo de simetría P63/m, con valores de $a = b = 9,432 \text{ \AA}$ y $c = 6,88 \text{ \AA}$ (ver figura 1.8) El carácter iónico de la HA la hace una cerámica dura, refractaria, con punto de fusión mayor que $1500 \text{ }^\circ\text{C}$. La relación ideal Ca/P es 10:6 (1,67), su densidad calculada es de $3,219 \text{ g/cm}^3$ y sus propiedades mecánicas varían de acuerdo con el proceso de fabricación la HA policristalina tiene un módulo elástico alto, 40-117 Gpa.

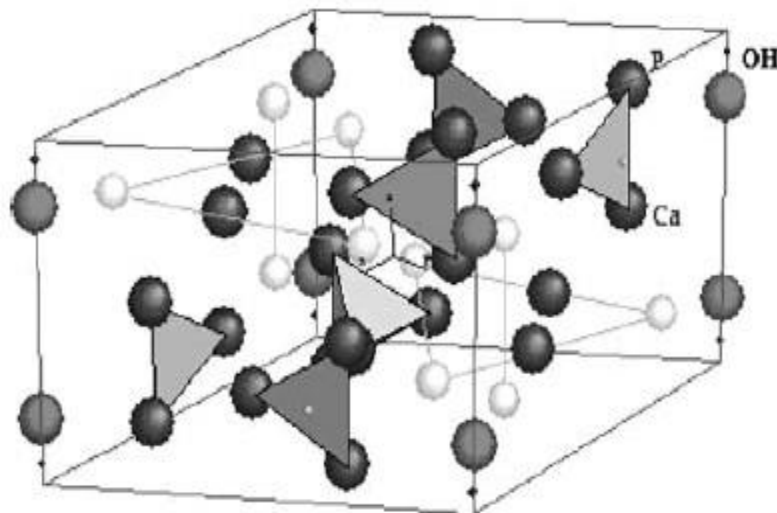


Figura 1.8. Estructura de una HAP, departamento de química, Universidad del estado de Moscú [17].

Referencias bibliográficas del capítulo 1

1. Rouvière H, Delmas A. *Anatomía humana descriptiva, topográfica y funcional*. Tomo 1. 10a edición. Editorial Masson, 1999. Pág. 390.
2. Fejerskov O, Thylstrup A (1.989): "Esmalte dentario". En *Embriología e histología oral humana*. Mjör IA, Fejerskov O. 1ª Ed. Editorial Salvat. Barcelona, España. Cap 3, pág 43-82. I.S.B.N.: 84-345-2758-8.
3. Garn SM, Lewis AB, Blizzard RM. *Endocrine factors in dental development*. J Dent Res. 1965;44:Suppl:243-258.
4. Gómez ME, Campos A (2.002): "Esmalte". En *Histología y Embriología Bucodental*. 2ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. Capítulo 10, pág 271-315. I.S.B.N.: 84-7903-716-4.
5. Gwinnett J (1.992): "Structure and composition of enamel". *Oper Dent*, Suppl 5: 10-17.
6. Davis WL (1.988) "Esmalte". En *Histología y Embriología Bucal*. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. México. Capítulo 7, pág 96-116. I.S.B.N.: 968-25-1357-X.
7. Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, Kirkham J (1.998): "The developing enamel matrix: nature and function". *Eur J Oral Sci*, 106 (suppl 1): 282-91.
8. Gwinnett J (1.992): "Structure and composition of enamel". *Oper Dent*, Suppl 5: 10-17.
9. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W (2.005) "Aparato digestivo I: cavidad oral y estructuras asociadas". En *Histología. Texto y atlas Color con Biología Celular y Molecular*. 4ª Ed. Ed Médica Panamericana. Madrid, España. Cap 15, pág 436-475. I.S.B.N.: 84-7903-806-3.
10. Eisenmann DR (1.986): "Estructura del esmalte". En *Histología oral. Desarrollo, estructura y función*. Ten Cate A R. 2ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. Capítulo 12, pág 252-73. I.S.B.N.: 84-7903-063-1.
11. Fawcett, DW (1.995): "Los dientes". En *Tratado de histología*. 12ª Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid. España. Capítulo 24, pág 633-648. I.S.B.N.: 84-486-0107-6.
12. Olszta, M. J.; Cheng, X.; Jee, S. S.; Kumar, R.; Kim, Y.-Y.; Kaufman, M. J.; Douglas, E. P.; Gower, L. B. *Bone structure and formation: A new*

perspective. Mater. Sci. Eng., R 2007, 58, 77– 116, DOI: 10.1016/j.mser.2007.05.001

13. Goldberg, M.; Kulkarni, A. B.; Young, M.; Boskey, A. *Dentin: structure, composition and mineralization. Front. Biosci., Elite Ed.* 2011, E3, 711– 735, DOI: 10.2741/e281
14. RATNER, B. y HOFFMAN, A. *Ciencia de los biomateriales: una introducción a los materiales en medicina. Prensa Académica.* 1996. 473 págs
15. IVANOVA TI; FRANK-KAMENETSKAYA, OV; KOL'TSOV, AB and UGOLKOV, VL *Estructura cristalina de hidroxiapatita carbonatada deficiente en calcio. Descomposición térmica. Revista de Química del Estado Sólido* 160, (2001) 340-349.
16. WILLIAMS, RAD y ELLIOT JC *Bioquímica dental básica y aplicada. El Manual Moderno. México. ISBN 0-443-03144-4. pag. 316.*
17. PUTLAYEV, Valery. *Calcium phosphates. Departamento de Química de la Universidad de Moscú. www.hsms.msu.ru/pdf/bio-dresden.ppt*

CAPÍTULO 2. Técnicas de caracterización

En este capítulo se comentará los conceptos básicos de las técnicas usadas para el estudio de la estructura y la composición química del esmalte dental humano a diferentes escalas. Por lo tanto, se presentan las técnicas de microscopia de luz, la difracción de rayos X (DRX), la microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM) y la espectroscopia por división de energía de los rayos x característicos (EDS).

2.1 Microscopia de luz

La microscopía de luz o microscopía óptica es una de las primeras técnicas al alcance para examinar la microestructura de los materiales. La formación de imágenes en un microscopio de luz se puede ilustrar mediante la trayectoria de un rayo de luz, como se presenta en la Figura II.2. El principio de funcionamiento es la refracción de la luz a través de lentes de vidrio. Una lente, es un sistema refractor que desvía (converge) la luz hacia un punto llamado foco. Un espécimen (objeto) se coloca en la posición A generalmente a dos distancias focales de la lente objetiva. Los rayos de luz del objeto primero, llegan a la lente del objetivo (la lente objetiva) y luego se enfocan en la posición B (el plano focal) para después formar una imagen invertida ampliada en el plano imagen. Después, los rayos de luz de la imagen formada por la lente objetiva llegan a la segunda lente (la lente proyectora) para formar una imagen ampliada final de un objeto en C, donde se coloca un sistema colector de imagen (una pantalla, una cámara fotográfica o una cámara CCD). [1].

En la figura II.1 se ilustra la trayectoria de la luz desde el objeto hasta generar la imagen real en C. Esta es una imagen real, se forma en una pantalla y se puede adquirir en una fotografía. Cuando examinamos la microestructura del objeto, la trayectoria de la luz en un microscopio ha pasado a través del ocular, como se muestra en la figura II.2. La imagen está invertida con respecto al objeto. [2].

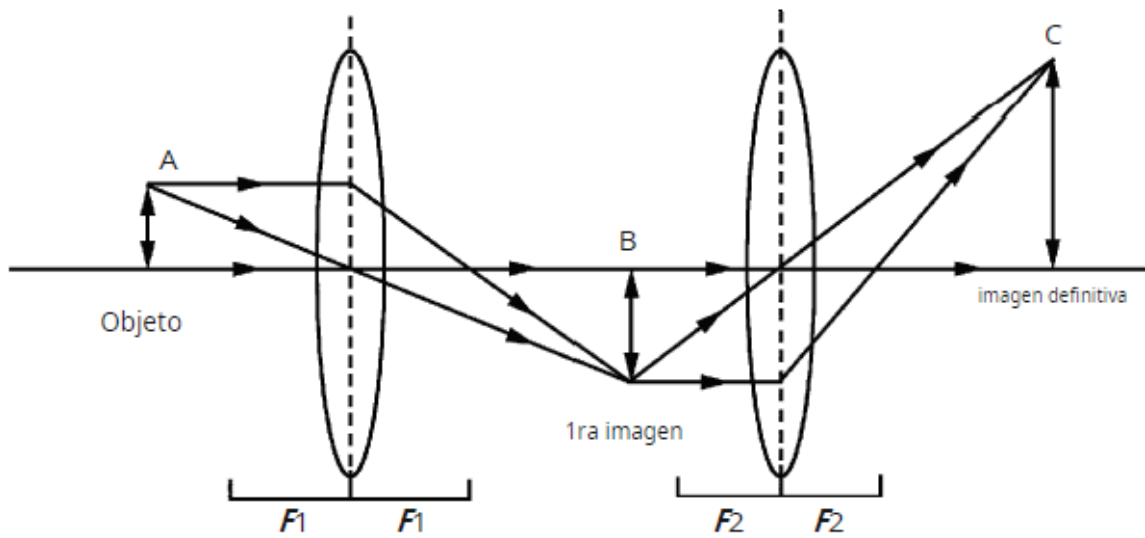


Figura II. 1. Trayectoria de un rayo de luz en un microscopio de luz. Se presenta el principio de la magnificación de la imagen del objeto a través del sistema de lentes.

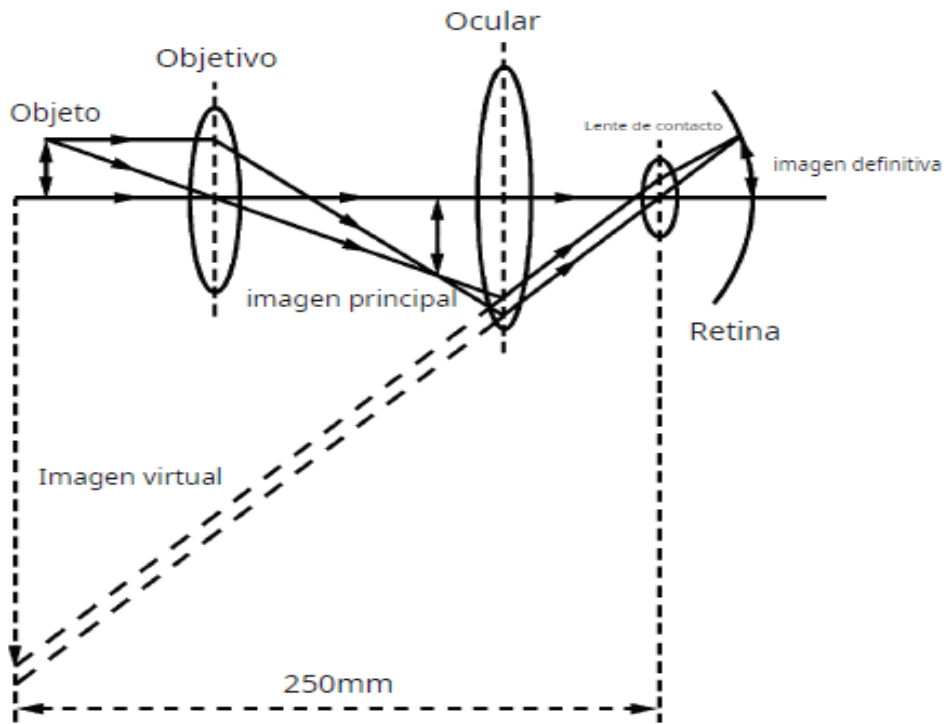


Figura II.2. Principios de magnificación en un microscopio de luz.

Los equipos que se usaron para la caracterización en la estructura del esmalte en microscopia óptica fueron los siguientes.

Stereo microscope zeiss, ver figura II.3a, se usó para seleccionar los dientes adecuados, poder separar la dentina del esmalte y caracterizar la morfología del diente.

Un Light microscope zeiss axiovert 25 como el que se muestra en la figura II.3b, el cual cuenta con las opciones de campo claro, campo oscuro y campo polarizado.

Este microscopio se usó para determinar la estructura del esmalte antes y después del ataque químico con ácido fosfórico.

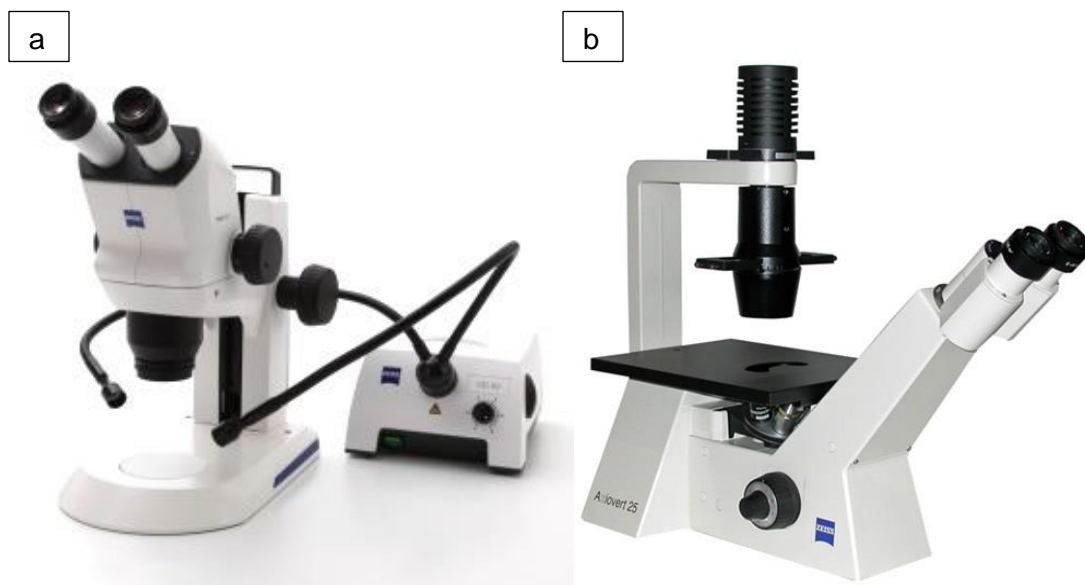


Figura II.3 a) Stereo microscope, b) Axiovert 25 zeiss

2.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) se usa para analizar la morfología y estructura de los materiales a nivel micrométrico y a nivel nanométrico, con su uso se puede caracterizar el tamaño de partícula, su estado de agregación o la morfología de la

muestra. El SEM cuenta con un haz de electrones y lentes electrostáticas (el cañón de electrones) y lentes electromagnéticas (la columna del microscopio) respectivamente. El cañón de electrones produce un haz muy fino de electrones acelerados (con energía de hasta 40 kV) producidos con filamento termoiónico de tungsteno (W), hexaboruro de lantano (LaB₆) o de emisión de campo pasa a través de dos lentes, condensadora y objetiva. El haz de electrones es barrido a lo largo de la muestra por medio de unas bobinas de barrido, mientras que un detector forma las imágenes en el modo de electrones secundarios o en el modo de electrones retrodispersados emitidos por cada punto de la superficie (figura II.4). El resultado es una imagen de la superficie de la muestra (electrones secundarios) o una imagen de composición de la composición química (electrones retrodispersados) amplificada de la muestra [3].

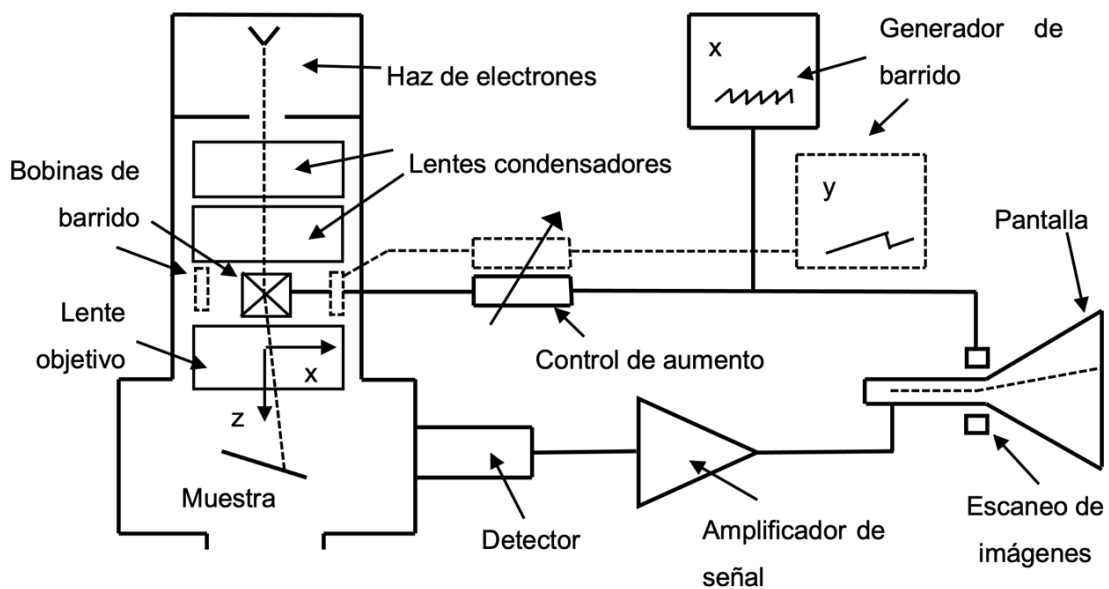


Figura II.4 Diagrama esquemático del funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido (SEM).

Las imágenes para determinar la morfología y estructura con alta resolución son generadas mediante el uso de electrones secundarios los cuales, son producidos por mecanismos de dispersión inelástica en la superficie del material.

El número de electrones secundarios que se emiten de la muestra, dependen del ángulo de incidencia del haz sobre la superficie y de la forma de la superficie local. Regiones con ángulos pronunciados tal como crestas y cúmulos entre otras, exhiben un incremento en la emisión de electrones secundarios y se traducen en zonas brillantes en una imagen. Este efecto, llamado efecto de borde, indica que cambios abruptos en la superficie son delineados por líneas brillantes haciendo que las imágenes de electrones secundarios muestren una calidad 3D.

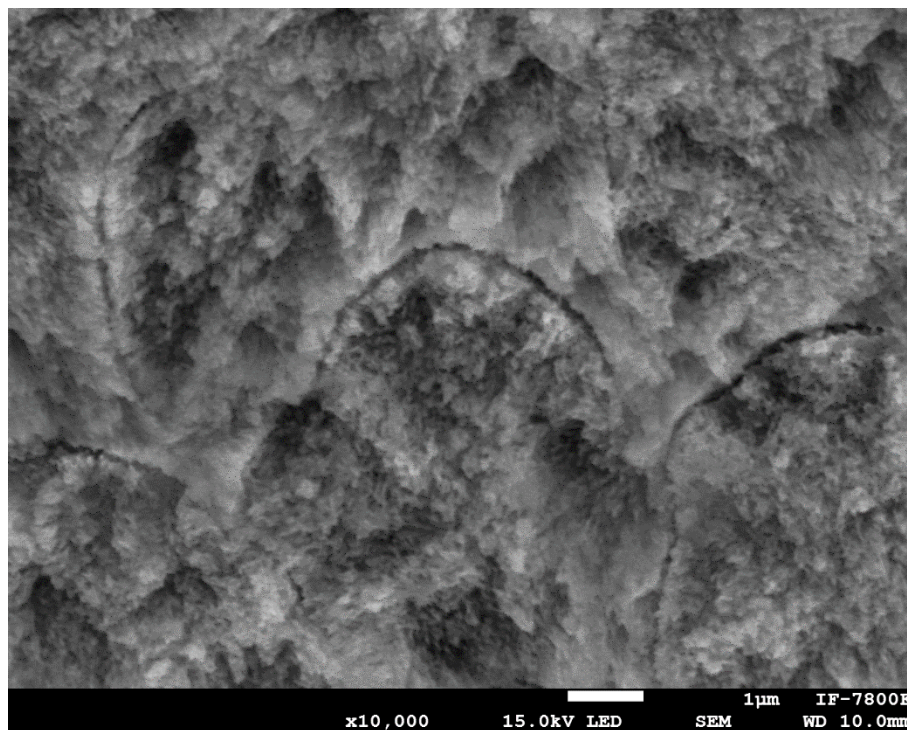


Figura II.5 Prismas del esmalte dental humano en el modo de electrones secundarios en el microscopio electrónico de barrido (SEM).

Los electrones retrodispersados (dispersados elásticamente) son producidos por la interacción electrostática entre el núcleo, de los átomos de la muestra y los electrones del haz. El poder de repulsión de un núcleo es proporcional a su carga positiva y éste es determinada por el número de protones (número atómico Z de cada elemento). Por lo tanto, los elementos más pesados (Z grandes) generan más electrones retrodispersados que elementos ligeros (Z pequeños).

Así, en las imágenes generadas por electrones retrodispersados, el contraste variará debido a diferencias en la composición química además de contrastes topográficos. Esto hace a la técnica útil para el análisis químico de una superficie en conjunto con su análisis morfológico.

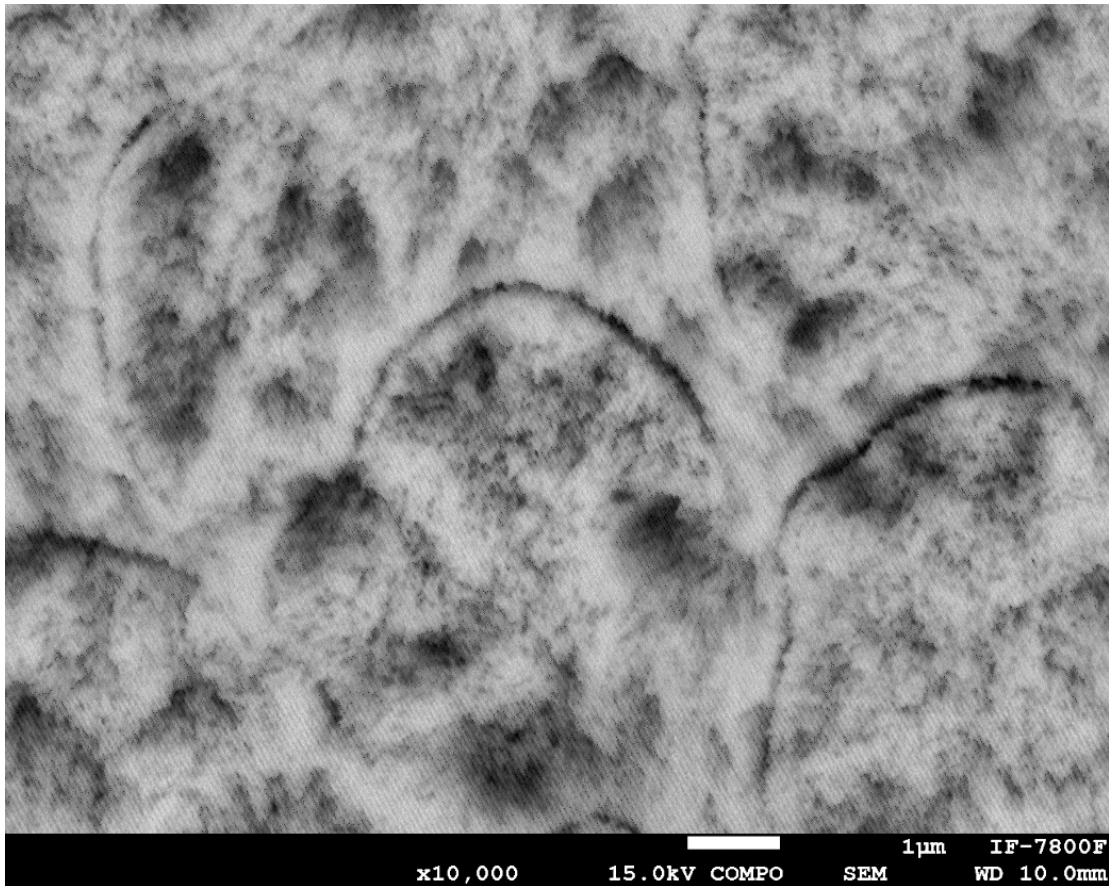


Figura II.6 Prismas del esmalte dental humano en el modo de electrones retro dispersados en el microscopio electrónico de barrido (SEM).

Todas las muestras, tanto volumétricas como en polvo, fueron analizadas utilizando un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-7800F ubicado en el Laboratorio Central de Microscopía (LCM) del Instituto de Física de la UNAM como el que se muestra en la figura II.7, este microscopio también tiene acoplado un detector de energía dispersada de rayos X (EDS) marca Oxford Instruments modelo X-Max de 50mm.

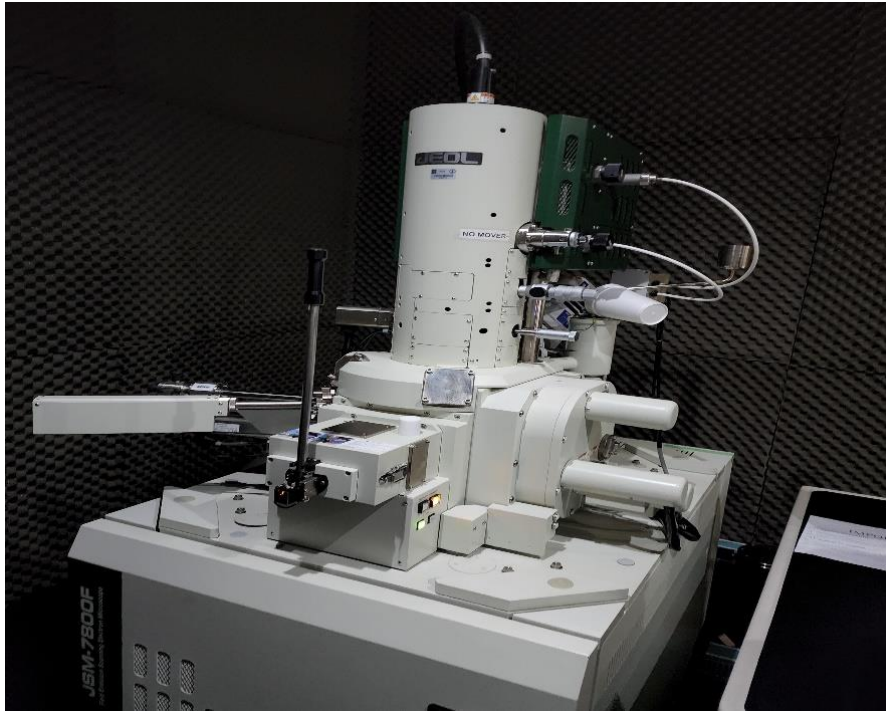


Figura II.7 Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7800F

2.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión se usa para producir imágenes de la muestra al ser atravesada con un haz de electrones. Al igual que un SEM los electrones son producidos por un cañón con filamento termoiónico de tungsteno (W), Hexa boruro de lantano (LaB_6) o de emisión de campo. Después del cañón electrónico, los electrones son acelerados por una alta diferencia de potencial y adquieren suficiente energía cinética para atravesar la muestra (figura II.8). Antes de alcanzar la muestra el haz de electrones es modificado por las lentes condensadoras y la apertura de condensadora para mejorar la coherencia del haz.

Cuando el haz interactúa con la muestra se tienen procesos elásticos, en donde los electrones incidentes, son dispersados sin pérdida de energía, y procesos inelásticos, en que los electrones incidentes ceden parte de su energía a los electrones internos del material. La lente objetiva, situada muy cerca de la muestra focaliza los haces dispersados y forma la primera imagen intermedia. La imagen producida por la lente objetiva estará afectada por una serie de aberraciones entre las que cabe destacar las aberraciones esférica y cromática, así como el

astigmatismo. La imagen intermedia es aumentada por una serie de lentes proyectoras para llegar a hacerse visible en la pantalla fluorescente o también mediante una cámara digital.

El mecanismo de contraste en el TEM, utiliza el modo de campo claro (figura II.9), en la que el diafragma o apertura de la lente objetiva, se centra además del haz central sobre dos o más haces difractados en el plano focal de la lente objetiva. Esta imagen contiene información interpretable sobre el contraste de amplitud de la muestra, si se usa solo un haz a la vez, y sobre el contraste de fase si se usa más de un haz difractado. La imagen así contendrá los espaciados de los planos de red que dieron lugar a dichos haces.

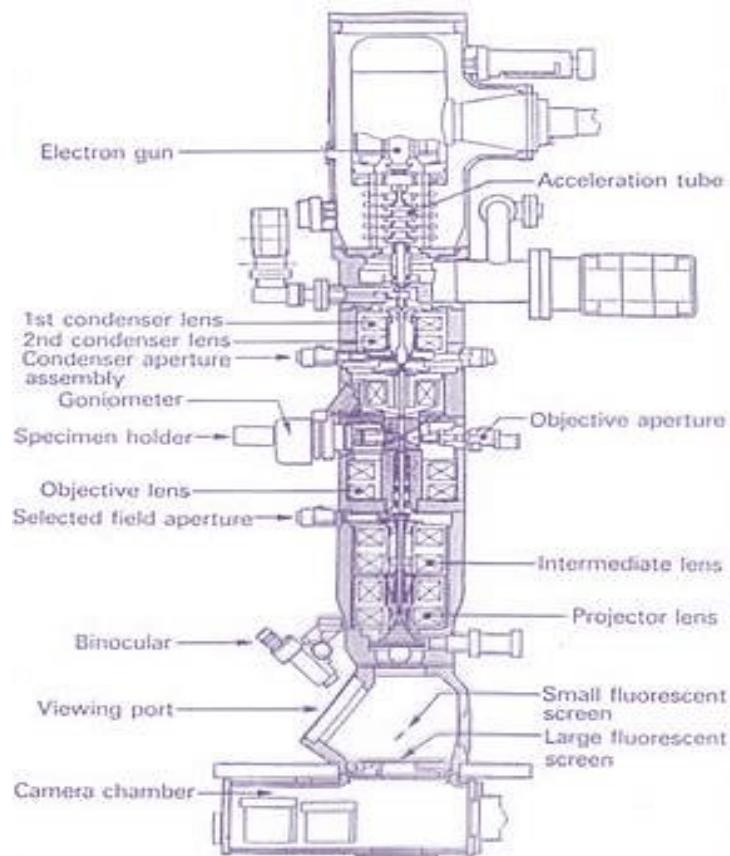


Figura II.8. Diagrama esquemático de un microscopio electrónico de transmisión. (Imagen obtenida de Central microscopy university of Iowa)

Asimismo, se puede elegir con la apertura de la lente objetiva, un haz difractado con un espaciado determinado en lugar del haz transmitido y se forma la imagen en el modo de campo oscuro. Esta imagen contiene información interpretable sobre el contraste de fase de la muestra.

Para realizar microscopia electrónica de alta resolución (HRTEM) se utiliza la apertura de selección de área para elegir el área idónea del cristal (mejor formada, delgada, bien orientada, etc.) que da lugar, al diagrama de difracción de selección de área selecta (SAED). A partir de este patrón de difracción (figura II.8) de electrones se introduce la apertura de objetivo, y se elige así los haces de electrones que formarán la imagen final en pantalla.

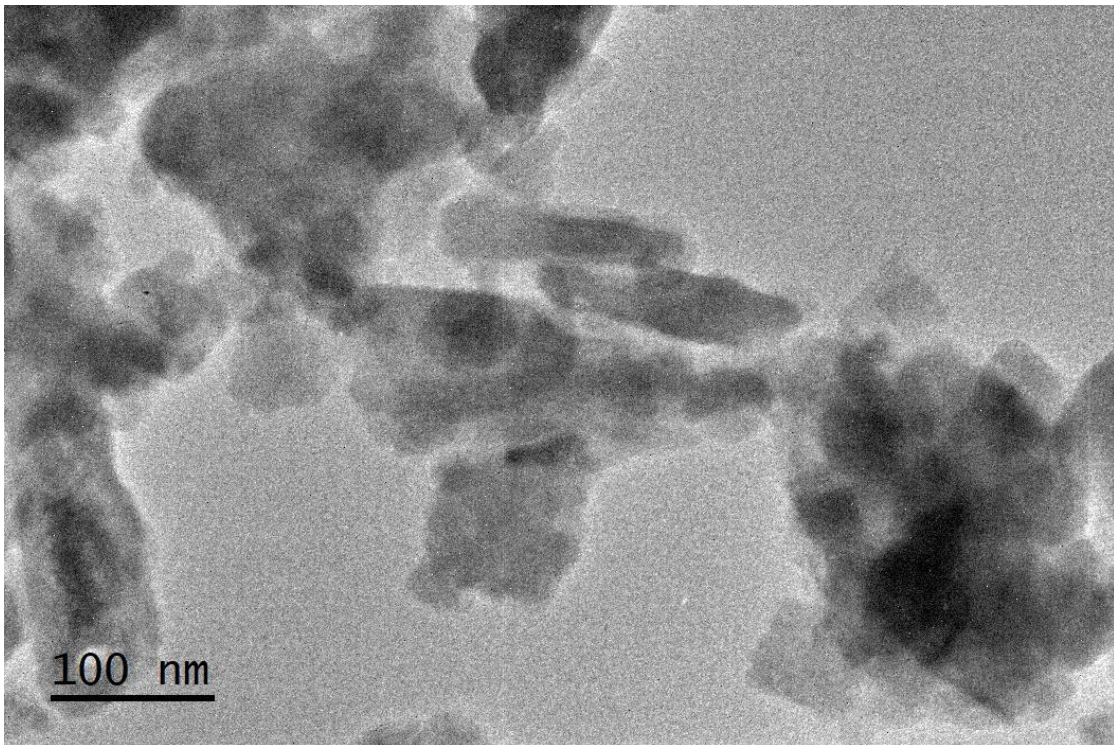


Figura II.9 Polvo de esmalte dental humano en el modo de campo claro de microscopia electrónica de transmisión (TEM).

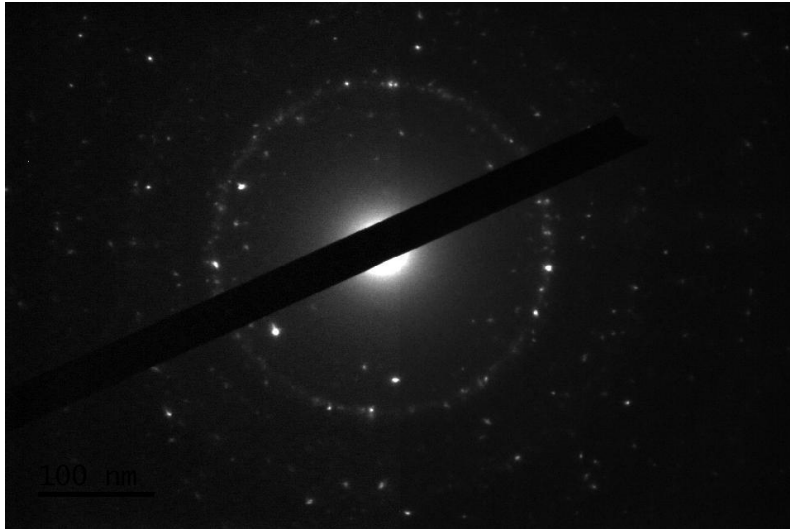


Figura II.10 Patrón de difracción de anillos de esmalte dental humano por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

En esta sección solo las muestras en polvo fueron analizadas en el microscopio electrónico de transmisión de la marca JEOL modelo 2010F, figura II.11, ubicado en el Laboratorio Central de Microscopía (LCM) del Instituto de Física de la UNAM.

Dicho análisis fue usando la técnica de campo claro, campo oscuro, patrones de difracción de electrones en el espacio recíproco y difracción de electrones de área selecta.



Figura II.11 Microscopio electrónico de transmisión JEOL modelo 2010F

2.4 Difracción de rayos X

La difracción de rayos X (DRX) es una técnica de caracterización estructural de materiales sólidos que permite determinar la estructura cristalina del material, al igual que las fases y las imperfecciones que éste pueda tener [4]. Los rayos X son un tipo de radiación electromagnética con la capacidad de atravesar cuerpos opacos, y con una longitud de onda entre 10^{-8} m (aproximadamente de 1\AA) y 10^{-12} m. Los rayos X, no se desvían mediante campos magnéticos o eléctricos y se propagan en línea recta [5].

La difracción de rayos X ocurre cuando una onda electromagnética interactúa con los átomos de un cristal (figura II.13), los cuales tienen un arreglo ordenado con una distancia periódica entre ellos. Este ordenamiento le permite al cristal actuar como una red de difracción, dispersando una onda secundaria (de la misma longitud de onda) en todas las direcciones. Las ondas secundarias generadas por la matriz dan lugar a fenómenos de interferencia que puede ser destructivos o constructivos. La interferencia constructiva produce rayos difractados dispersos solo a lo largo de direcciones bien definidas. Las direcciones y las intensidades de los rayos difractados dependen de la simetría del cristal y el conjunto de rayos difractados, que contiene información sobre la estructura atómica tridimensional del cristal [6]. Los espectros de difracción de rayos X son presentados en gráficas de Intensidad vs 2θ (ver figura II.13). La indexación de los picos observados permite identificar la fase cristalina.

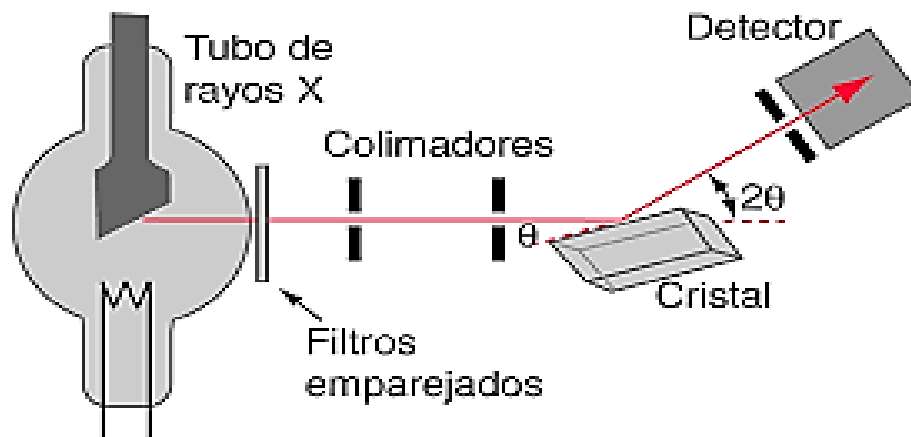


Figura II.12. Diagrama esquemático de un instrumento de rayos X.

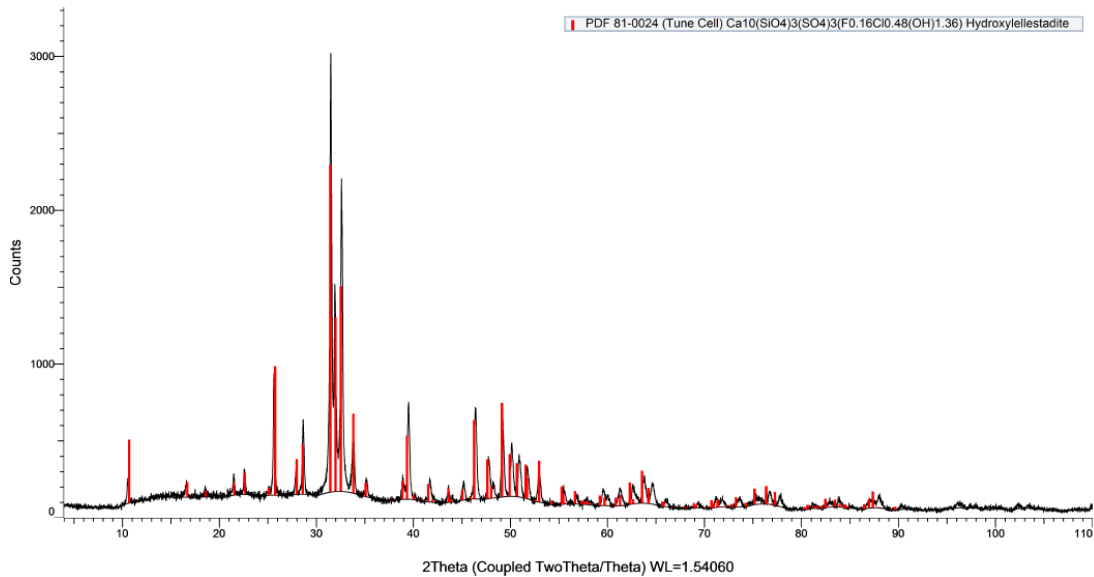


Figura II.13 Ejemplo de espectro de intensidad correspondiente a polvo de esmalte dental con un difractómetro de rayos X.

Un rayo difractado puede definirse como un rayo compuesto de un gran número de rayos dispersados que se refuerzan mutuamente. La difracción es, por tanto, esencialmente un fenómeno de dispersión. Los átomos dispersan la radiación incidente en todas direcciones.

La ley de Bragg determina los ángulos de dispersión coherente e incoherente de los rayos x en una red cristalina. Cuando los rayos X inciden sobre la superficie de un cristal, su ángulo de incidencia θ , se reflejará con el mismo ángulo de dispersión θ y cuando la diferencia de trayectoria es igual a un número entero n de longitud de onda λ , se producirá una interferencia constructiva. En la figura II.14, los dos haces de rayos X, de longitud de onda λ , inciden en fase sobre la superficie de los planos de un cristal (línea negras no necesariamente horizontales y paralelas), con un ángulo de incidencia θ , y formando un frente de ondas.

Para que exista reflexión cooperativa es necesario que tras la reflexión ambos haces sigan estando en fase (línea verde de la derecha), situación que sólo ocurrirá si la diferencia de caminos recorridos por los frentes de onda OF y OH (frentes de onda, antes y después de la reflexión) corresponde a un número entero de veces la longitud de onda de la radiación incidente [7].

Esa condición equivale a decir, que la suma de los dos segmentos FG y GH corresponden a un número entero (n) de veces la longitud de onda (λ):

$$FG+GH= n \lambda \quad (2)$$

$$\text{pero } FG=GH \text{ y } \text{sen } \theta= FG/d \quad (3)$$

$$\text{es decir: } FG= d \text{ sen } \theta \quad (4)$$

con lo que la expresión 2 se convierte en:

$$2d \text{ sen } \theta= n \lambda \quad (5)$$

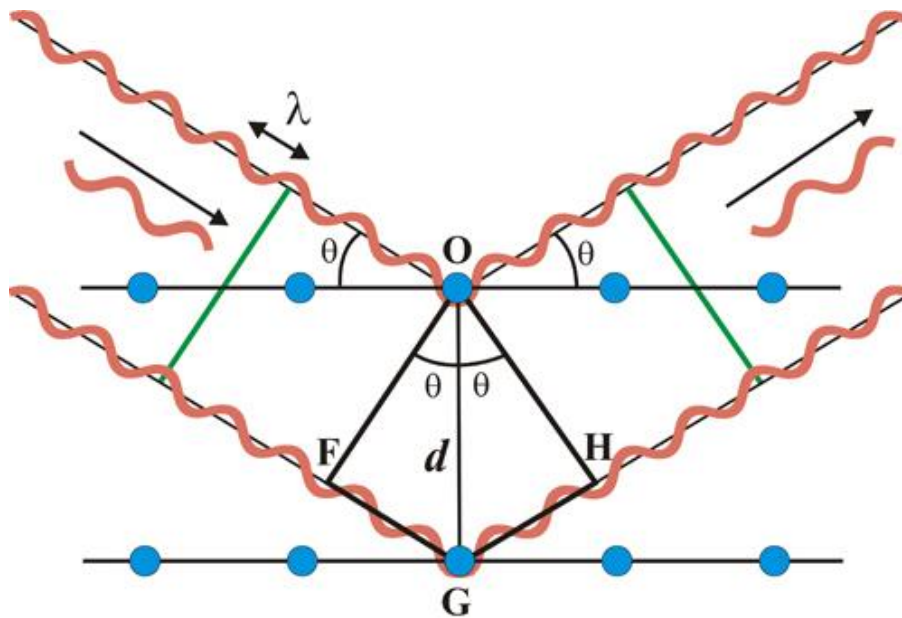


Figura II.14 Representación esquemática de la ley de Bragg

Todas las muestras, tanto volumétricas y en polvo fueron analizadas en un difractómetro Bruker AXS D8 Advance como el que se muestra en la figura II.15 localizado en Laboratorio de Refinamiento de Estructuras Cristalinas (LAREC) del Instituto de Física de la UNAM.



Figura II.15 Difractómetro bruker AXS D8

2.5 Espectroscopia de rayos X por dispersión de energía

El análisis químico elemental por dispersión de energía de los rayos X característicos (EDS, por sus siglas en inglés, Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy) proporciona información acerca de la composición química de los materiales al irradiar con un haz de electrones enfocado sobre la muestra generando rayos X que son detectados (figura II.17) [8].

Los rayos X característicos se producen cuando un átomo dentro de la muestra que se encuentra en estado fundamental (en reposo o no excitado) con sus electrones localizados en niveles discretos de energía, interacciona con el haz electrónico, se expulsan los electrones y el átomo queda en su estado excitado. Para regresar a su estado base, el espacio que ocupaba ese electrón queda libre, un electrón de una capa exterior, de mayor energía, llena ese espacio, y la diferencia de energía genera un rayo X. Cada elemento cuenta con un espectro de emisión característico, con esto se permite identificar y cuantificar los diferentes elementos presentes en el material [9].

Los rayos X son emitidos por los elementos pesados ($Z=29-80$), cuando sus electrones realizan transiciones entre los niveles más bajos de energía atómica. La emisión de rayos X característicos, que se muestra en la figura II.16 como dos picos agudos, se producen cuando hay vacantes en el nivel $n = 1$ o capa K del átomo y

los electrones caen desde arriba para llenar los vacíos. Los rayos X producidos por las transiciones desde los niveles $n=2$ hasta $n=1$ se llaman rayos X K-alfa y los correspondientes a la transición de $n=3 \rightarrow 1$, se denominan rayos X K-beta. Las transiciones a $n=2$ o capa L son designadas como rayos X L ($n = 3 \rightarrow 2$ es L-alfa, $n = 4 \rightarrow 2$ es L-beta, etc.) La distribución continua de rayos X que forma la base "continuo de Brehmsstrahlung" para los dos picos agudos de la izquierda se llama "radiación de frenado"[10].

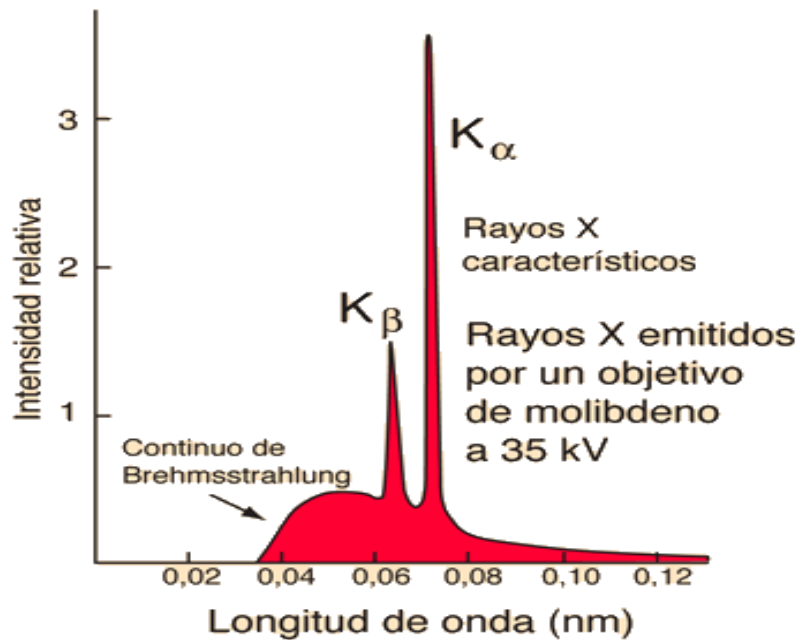


Figura II.16 Señales $k\alpha$ y $k\beta$ producidas en la espectroscopia de rayos X.

El análisis químico de un material es obtenido en microscopios electrónicos de barrido a través del sistema SEM-EDS, que permite analizar los rayos X característicos que se producen al interaccionar el haz electrónico con la muestra.

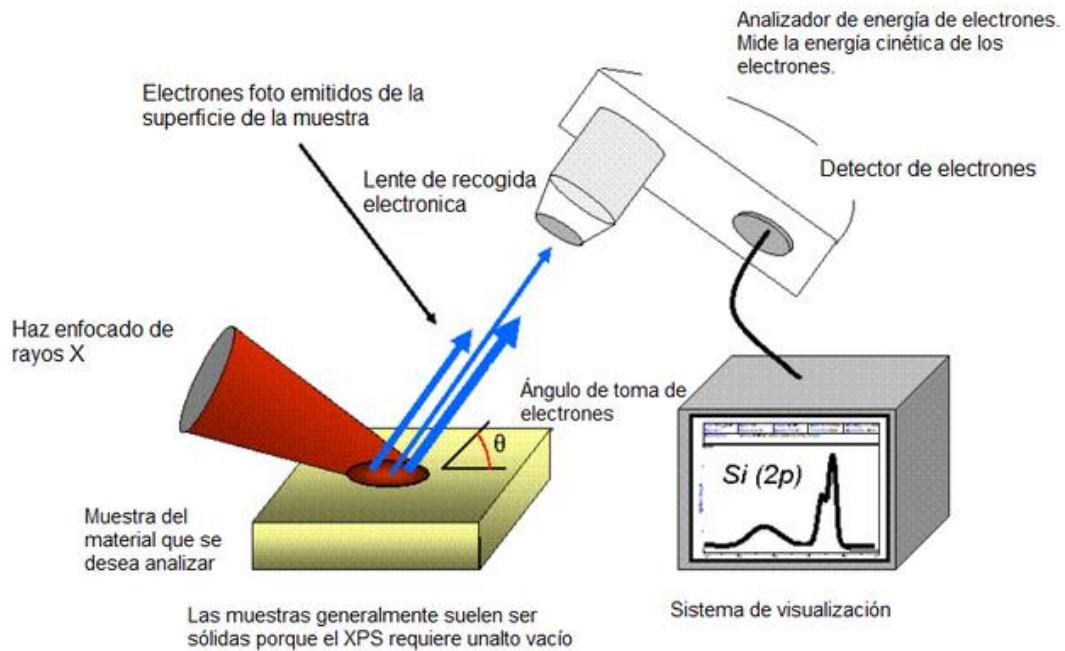


Figura II.17 Esquema de la espectroscopia de rayos X.

Para realizar el estudio del esmalte dental humano fue de vital importancia utilizar diferentes técnicas del sistema SEM-EDS. La primera son los EDS puntuales (ver figura II.18) que se usan cuando lo que interesa es obtener un espectro específicamente en una zona de la muestra y este análisis es en forma de punto.

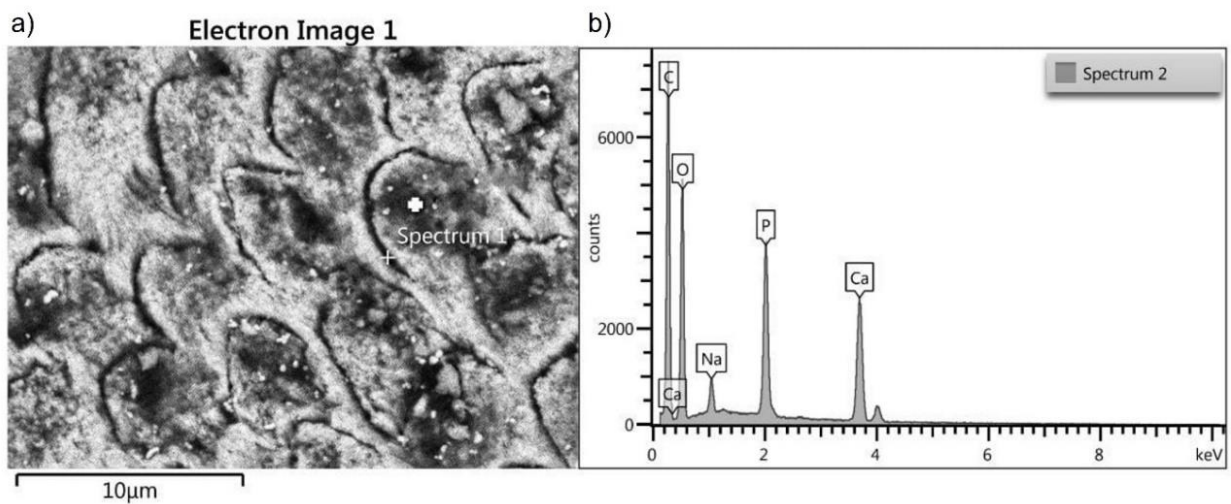


Figura II.18 a) EDS puntual en el centro de un prisma de esmalte dental humano b) Espectro elemental obtenido de la imagen a)

El otro tipo de análisis SEM-EDS utilizado en este trabajo son los EDS lineales (como se muestra en la figura II.19) los cuales sirven para determinar la diferencia de concentración de elementos químicos a lo largo de dicha línea.

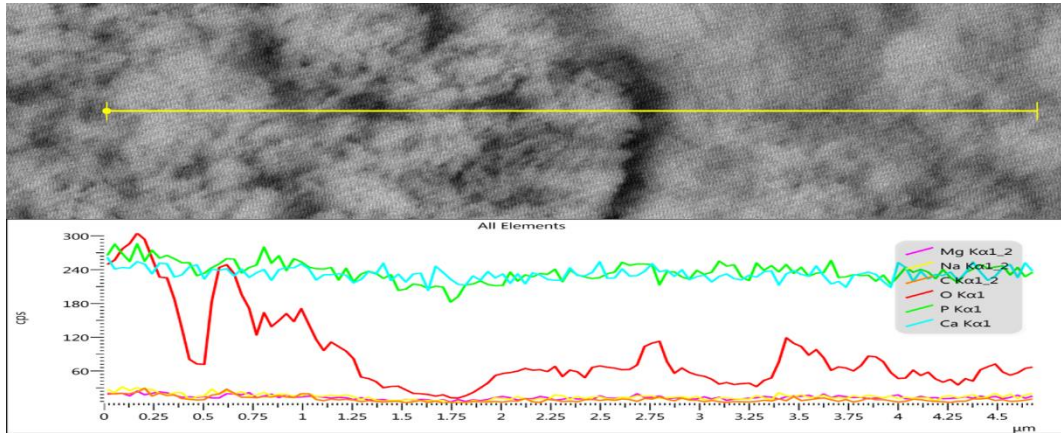


Figura II.19 EDS lineal correspondiente a un prisma de esmalte dental humano.

El ultimo tipo de análisis SEM-EDS utilizado en este trabajo fueron los mapeos químicos elementales (como se muestra en la figura II.20), los cuales proporcionan información espacial de la localización de cada uno de los elementos presentes en el material de interés.

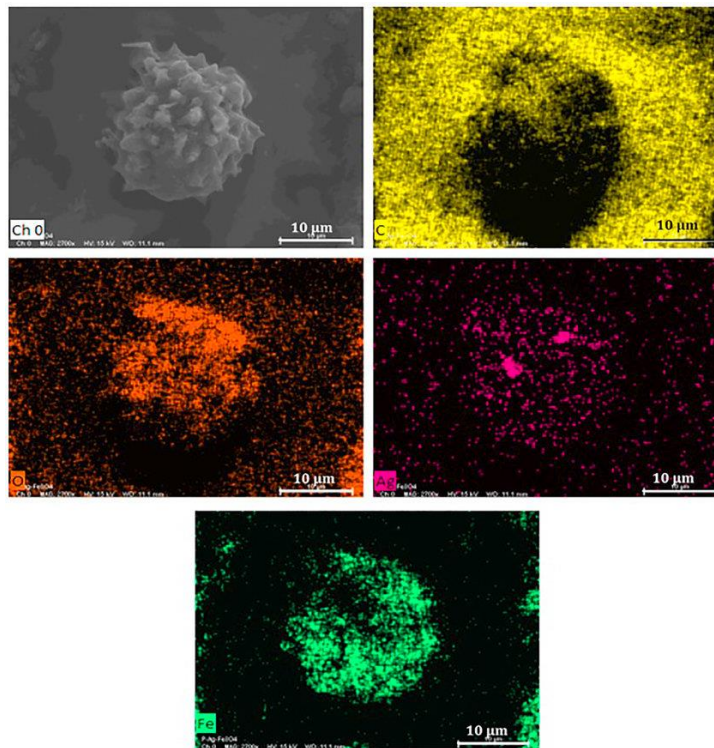


Figura II.20 Mapeo elemental EDS de nano/microestructuras híbridas Ag- Fe_3O_4 para los elementos carbono, oxígeno, hierro y plata [11].

Referencias bibliográficas del capítulo 2

1. Murphy, D.B. (2001) *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*, Wiley-Liss, New York.
2. Vander Voort, G.F. (1984) *Metallography Principles and Practice*, McGraw-Hill Book Co., New York.
3. M. Faraldos y C. Goberna, *Técnicas de análisis y caracterización de materiales*, CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2011
4. E. Zolotoyabko, *Basic concepts of X-Ray Diffraction*, Wiley-VCH, 2014.
5. B. D. Cullity, *Elements of X-ray diffraction*, Addison-Wesley, 1959.
6. A Cassetta, *X-Ray Diffraction (XRD)*. *Encyclopedia of Membranes*, Italy: Springer, 2015.
7. Macías Ferrer, David. (2018). *Difracción de Rayos X*.
8. S. Ebnesajjad, «Surface and Material Characterization Techniques, » de *Surface Treatment of Materials for Adhesive Bonding*, William Andrew, 2014, pp. 39-75.
9. G. A. Calete, *Tratamiento de la superficie del esmalte dental humano con pastas dentales para dientes sensibles, barnices de Flúor y su papel en la remineralización*, México: UNAM, 2015.
10. *X-Ray Fluorescence Amptek Mini-X X-Ray Tube Amptek X-123 X-Ray Spectrometer Bennet Schwab Phys 3340*, Spring 2014 Markus Raschke 5/6/14
11. Rodolfo Daniel Ávila Avilés, *Biosíntesis y caracterización de nanoestructuras por microscopía electrónica* - Scientific Figure on ResearchGate.

CAPÍTULO 3. Procedimiento experimental

En este capítulo se describe con cierto detalle el procedimiento experimental realizado para para la preparación de las muestras de esmalte dental humano presentado en este trabajo de tesis. El procedimiento experimental se realizó en el Laboratorio de Física de Nuevos Materiales del Departamento de Materia Condensada del Instituto de Física de la UNAM.

3.1. Los dientes

Se utilizaron dientes molares permanentes humanos adultos provenientes de tratamientos dentales de ortodoncia. Primero, se hace una selección cuidadosa de los dientes con el microscopio de luz de la marca Zeiss modelo Axiovert 25 para evitar aquellos con grietas y/o daños severos por caries.

En un vaso de precipitado de 50 ml se preparó una disolución 1 a 1 de agua bidestilada (15 ml) e isopropanol (15 ml), para sumergir en ella cada pieza dental, una vez preparada la solución se introdujo el vaso de precipitado en una máquina de baño ultrasónico que contiene agua y una rejilla para soportar el vaso como la que se muestra en la figura III.1. Se dejó durante 10 minutos para quitar cualquier impureza y suciedad de cada una de las piezas dentales.

El baño ultrasónico es el dispositivo que transforma la energía eléctrica en energía mecánica. Este equipo genera ondas ultrasónicas por la oscilación de los transductores piezoeléctricos con una frecuencia aproximada de 20 kHz. En general, un aparato de ultrasonidos incluye un recipiente, lleno de agua, que pueden transmitir las ondas que se emiten por los transductores. Los sonicadores se utilizan en muchos campos, por ejemplo, para romper las paredes celulares (fragmentación subcelular) o en la limpieza de material de laboratorio químico para eliminar las partículas depositadas sobre los objetos de vidrio o cerámica [1].



Figura III.1 Baño ultrasónico de la marca BRANSON modelo 1510

3.2 Preparación de muestras volumétricas

En esta sección se prepararon 2 muestras volumétricas, una en dirección transversal y otra en dirección longitudinal. Para facilitar el manejo de las piezas dentales y hacer los cortes correspondientes, se preparó una mezcla de monómero de NICTONE y polímero de metil-metacrilato (Quarz R2V) (figura III.2).



Figura III.2. Mezcla del monómero NICTONE y polímero Quarz R2V

Se añadió rápidamente la mezcla del monómero a cada una de las piezas dentales,

dándole forma con las manos a conveniencia (figura III.3). Se dejó secar durante 10 minutos. Así, las piezas quedan listas para poder cortarlas.



Figura III.3. Piezas dentales preparadas con la Mezcla del monómero NICTONE y polímero Quarz R2V

Se usó una cortadora modelo Isomet 1000 de la marca Buehler (figura III.4) para cortar las piezas dentales. Para que el corte fuese lo más preciso posible, se usó un disco con filo de diamante wafering Blade ISHC marca Buehler. Esta cortadora permite controlar en pasos de mm la medida de lo que se necesite cortar, así mismo permite controlar la velocidad y el tiempo. Se agregó 2L de agua dentro de la cortadora para evitar el calentamiento y daño del disco. Posteriormente se montó cada una de las muestras en soporte que se ajusta con tornillos. Se realizó el corte longitudinal el cual permite observar tanto el esmalte, la dentina, la región amelo dentinaria, y la zona pulpar del diente (figura III.5).



Figura III.4. Cortadora Isomet 1000 precision saw



Figura III.5. Corte longitudinal de una pieza dental molar

Para preparar la muestra con la sección transversal, se hizo otro corte paralelo al que ya se había hecho, dejando una sección en forma de tableta de todo el diente. El corte del diente en forma transversal incluyó sólo el esmalte dental, y esto se logra guiándonos con la transición entre el esmalte y la dentina.

3.2.1 Pulido mecánico

El objetivo de este paso es reducir el espesor de las muestras y darles forma. El espesor de ambas muestras se redujo en al menos de 200 μm . Para lograrlo se utilizó un vidrio en donde se pegó un pedazo de lija de SiC con tamaño de grano 35 μm , como se muestra en la figura III.6.

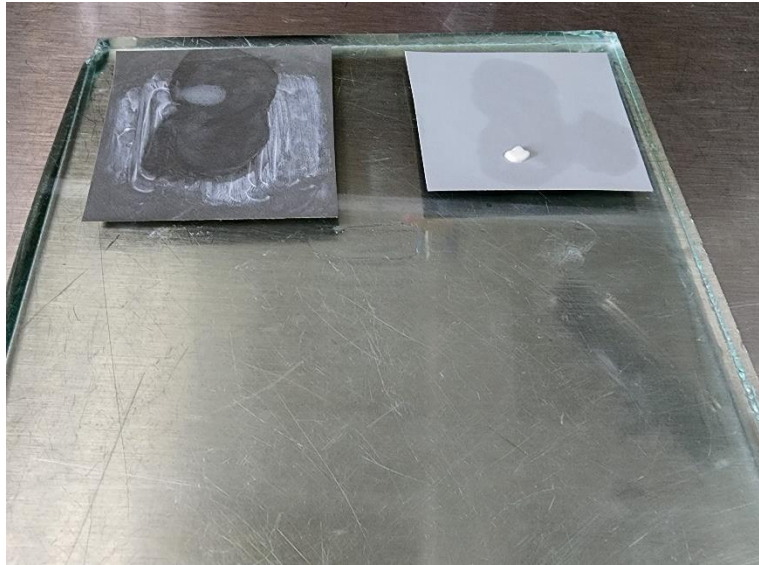


Figura III.6. Material para llevar a cabo el pulido mecánico del diente

En el proceso del pulido mecánico se usó constantemente agua y se siguió un patrón en forma de 8 para evitar rayar la muestra cómo se presentó en la figura III.6, el proceso duro 5 minutos y se realizó 2 veces. Una vez acabado el proceso se limpió la muestra con el baño ultrasónico utilizando una disolución 1 a 1 de agua destilada (15 ml) e isopropanol (15 ml) durante 10 minutos. Este mismo proceso se repitió con lijas de 25 μm , 18 μm y 5 μm , lavando al final con el baño ultrasónico cada vez que se cambiaba de lija.

3.2.2 Pulido espejo

Existen diferentes tipos de paños para cada tamaño de pasta de diamante. En general, cuanto menor es el tamaño del grano de diamante, el paño a utilizar tiene más pelusa. Del mismo modo, los paños duros se utilizan con diamante de mayor tamaño. [1].

Para este proceso de pulido se utilizó un paño textil Alpha y alúminas con tamaño de grano entre $0.06\ \mu\text{m}$ a $1\ \mu\text{m}$. Cabe mencionar que este proceso se usa con materiales duros como todos los tipos de acero y hierro fundido. [2].

Igual que en el pulido mecánico, se usó el vidrio y se pegó un pedazo de paño, posteriormente se añadieron 15 gramos de alúmina con tamaño de grano de $1\ \mu\text{m}$. Se agregó un poco de agua y con una palita de metal se revolvió hasta lograr una consistencia lechosa, como se presenta en la figura III.7



Figura III.7. Pulido espejo usando alúminas con un tamaño de grano $1\ \mu\text{m}$ y paño mojado

La preparación de la muestra consiste, en general, en obtener primero una superficie plana y semipulida, terminando con un pulido fino. Al igual que en el pulido mecánico se utilizó un patrón en forma de 8 durante 5 minutos. Este mismo proceso

se repitió con alúminas 0.3 μm y 0.05 μm . Lavando con el baño ultrasónico cada vez que se cambie de tamaño de grano.

Para revisar el avance de todo este proceso se utilizó el microscopio de luz de la marca Zeiss modelo Axiovert 25 para observar la presencia o ausencia de grietas, rayones o si la muestra estaba sucia. Al final se obtiene la superficie del diente con terminado espejo.

3.2.3 Ataque químico

El último paso después de obtener el pulido con acabado espejo fue el atacar la muestra con ácido fosfórico con la finalidad de revelar la estructura del material ya que el ácido limpia la muestra de desechos pequeños de los pulidos y también disuelve la superficie del material. En una caja Petri se vertió 20 ml de ácido fosfórico y con unas pinzas de acero inoxidable se tomó cuidadosamente cada una de las muestras y se sumerge durante 1.5 minutos, como se muestra en la figura III.8.



Figura III.8 Ataque químico a la muestra para revelar su estructura

3.2.4 Preparación de las muestras para el microscopio (SEM)

Para observar las muestras con el microscopio SEM, se utilizaron dos barriles de cobre (porta muestras para el SEM). En un vaso de precipitado de 50 ml se preparó una disolución 1 a 1 de agua bidestilada (15 ml) e isopropanol (15 ml) y se limpiaron los dos barriles en el baño ultrasónico. Una vez limpios, se colocó pintura de plata en los barriles de cobre para poder fijar las muestras, como se muestra en la figura III.8. Se usó pintura de plata debido a que la cinta de carbono podría intervenir en las cuantificaciones de los elementos presentes en las muestras. Asimismo, para observar con el SEM, las muestras no se recubrieron con carbono amorfo ni con oro por la misma razón de no alterar nuestros resultados.



Figura III.9. Muestra transversal(izquierda) y muestra longitudinal preparadas para ser observadas en el microscopio electrónico de barrido (SEM).

3.3 Preparación de muestras en polvo

Para la preparación de las muestras en polvo, se siguieron los primeros pasos de la sección 2.1 antes de hacer el corte transversal. Usando un micromotor Sunburst se desprendió el esmalte de la dentina, guardando el polvo del esmalte en una caja petri como se muestra en la figura III.10. En este proceso se dejó una capa externa de esmalte para asegurar que no se incluye polvo de dentina en nuestro material.



Figura III.10. Obtención de polvo de esmalte usando la pieza de mano.

3.3.1 Proceso de tamizado

El tamizado es un método físico para separar mezclas por tamaño. Consiste en hacer pasar la mezcla de partículas de diferentes tamaños por un tamiz o coladera. Las partículas de menor tamaño pasan por los poros del tamiz atravesándolo y las grandes quedan retenidas por el mismo [3].

Para poder llevar a cabo el tamizado del polvo, se limpiaron cada uno de los instrumentos de tamizado y sus respectivas mallas con una disolución 1 a 1 de agua destilada (15 ml) e isopropanol (15 ml) durante 10 minutos. Los tamices usados son de la marca MONTINOX de 80, 120 y 325 mesh con un tamaño de apertura de 177, 125 y 44 micras respectivamente. Se colocaron uno sobre otro de manera vertical como se muestra en la figura III.11, con el tamiz de apertura mayor hasta arriba, en la parte de hasta abajo se embono un recipiente para recolectar todo el polvo de esmalte que paso por todas las mallas. guardar el polvo en un recipiente vial.



Figura III.11. Equipo de tamizado usado

Debido a que había muchas partículas del polvo que no pasaban, principalmente por las ultimas 2 mallas de tamizado, se ocupó un mortero de ágata de 50 mm (figura III.12) para triturar y hacer el polvo más fino. Este proceso en total se repitió 4 veces para no desperdiciar nada de material. La figura III.12 presenta el polvo de esmalte obtenido. Una vez que paso todo el polvo por cada una de las mallas se guardó en un recipiente vial de 89ml.



Figura III.12. Proceso de trituración en el mortero de ágata



Figura III.13. El polvo de esmalte obtenido.

3.3.2 Proceso de centrifugado

Para llevar a cabo el proceso de centrifugado de la muestra del esmalte en polvo, se usaron dos soluciones. Una solución de esmalte con cloro comercial y otra disolución de esmalte con agua destilada. Cada una de las soluciones se preparó con 10 gr de esmalte dental y 20 ml del solvente correspondiente.

La centrifugación es una técnica de rotación basada en el movimiento de las partículas, suspendidas en un medio líquido específico, e impulsadas por la fuerza centrífuga, que tiende a desplazarlas hacia fuera del centro de rotación. La separación de las partículas se realiza a por su masa y su forma como se muestra en la figura III. 14. La fuerza centrífuga depende, además, de la velocidad y radio de giro [5]. Tanto la viscosidad de la disolución-muestra (esto es de gran interés para las aplicaciones analíticas) como las propiedades físicas de las partículas afectarán a la sedimentación individual de las mismas.



Figura III.14 Proceso de centrifugado

El radio de giro (x) es la distancia desde el centro de rotación hasta el extremo del recipiente donde está contenida la muestra [5]. El valor de la aceleración centrífuga, en función de la velocidad de giro ω , viene dado por la ecuación:

$$G = \omega^2 x = \frac{4\pi^2(\text{rpm})^2}{3600} x = 0.01966(\text{rpm})^2 x \quad (1)$$

donde x es el radio de giro y rpm la velocidad en revoluciones por minuto.

La centrifugadora que se usó es de la marca Eppendorf modelo 4835 mini spin para 12 tubos (figura III.15). La centrifugación realizada fue de 4500 rpm durante 1 minuto [6]. Se colocaron los viales en posiciones opuestas para que no existiera diferencia en pesos al centrifugar. Al terminar, los viales se colocaron en posiciones verticales durante 1 día.

Una vez terminado el proceso de centrifugado, se usó papel filtro para separar el polvo del solvente usando el método de decantación. Se dejó secando el polvo sobre el filtro a temperatura ambiente durante 2 días, y se colocó plástico para que no se contaminara el polvo de esmalte.



Figura III.15. Centrifugadora Eppendorf 4835.

3.3.4 Preparación de la muestra de polvo de esmalte para el SEM

Se utilizó un barril de cobre de (SEM). En un vaso de precipitado de 50 ml se preparó una disolución 1 a 1 de agua destilada (15 ml) e isopropanol (15ml) para limpiar el barril en el baño ultrasónico. Para fijar el polvo en el barril, primero se preparó el barril con pintura de plata y se colocó un poco de polvo en una pala pequeña de metal y usando aire comprimido a una distancia de 10 cm se rocío el polvo sobre la pintura de plata.

3.3.5 Preparación de la muestra de polvo para el microscopio (TEM)

Para preparar la muestra de polvo para el TEM se usó el método de la jeringa. Este consiste en colocar una rejilla de cobre de 300 mesh previamente preparada con el polímero de colodión como soporte. Después se colocó un poco de polvo de esmalte en la punta del embolo y se introdujo verticalmente en la jeringa. Por último, el embolo se expulsó de manera rápida y el tubo de la jeringa se colocó sobre la rejilla de cobre, como se muestra en la figura III.16. Así, las partículas de polvo quedan suspendidas dentro del tubo de la jeringa y se depositan en la rejilla de cobre de forma dispersa y homogénea.

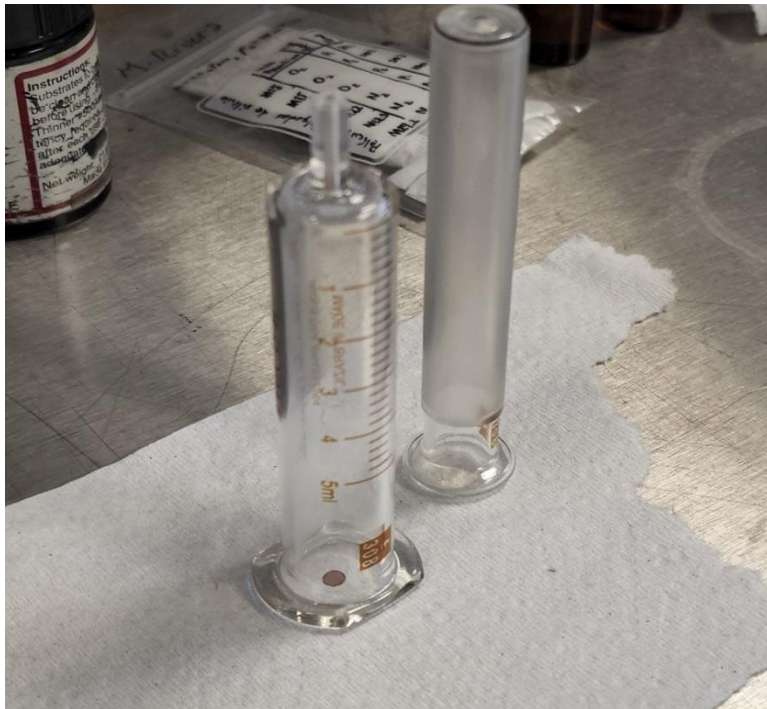


Figura III.16. El método de la jeringa

Referencias bibliográficas del capítulo 3

- 1.- *Kunina, D. M.; Karyakin, A. V.; Gribovskaya, I. F. Zhur. Anal. Khim. 1985, 40, 1184.*
- 2.- *Todaka A, Toyoda S, Natsuhori M et al. ESR assessment of tooth enamel dose from cattle bred in areas contaminated due to the Fukushima Daiich*
- 3.- *American Society for Testing and Materials, Norma C 117 - 95, Volumen 04.02, 2003.*
- 4.- *Retsch GmbH Haan. Analisis por tamizado, 2016, pg 9*
- 5.- *Isaac Túnez, Muñoz, Montilla López Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004 -Córdoba*
- 6.- *Oka, Toshitaka, Detection limit of electron spin resonance for Japanese deciduous tooth enamel and density separation method for enamel–dentine separation, 2022/07/02*

CAPÍTULO 4. Resultados

En este capítulo se describen los resultados obtenidos del análisis de las muestras de esmalte dental humano por las técnicas de difracción de rayos X, y por SEM y SEM-EDS a diferentes ampliaciones. El primer resultado obtenido fue que no hubo presencia de separación de fases el esmalte al llevar a cabo el proceso de centrifugación, tal y como se observa en la figura IV.1. Este resultado indica que el polvo de esmalte está conformado mayoritariamente por una fase, tal como lo indican los difractogramas de rayos X de la figura IV:2.

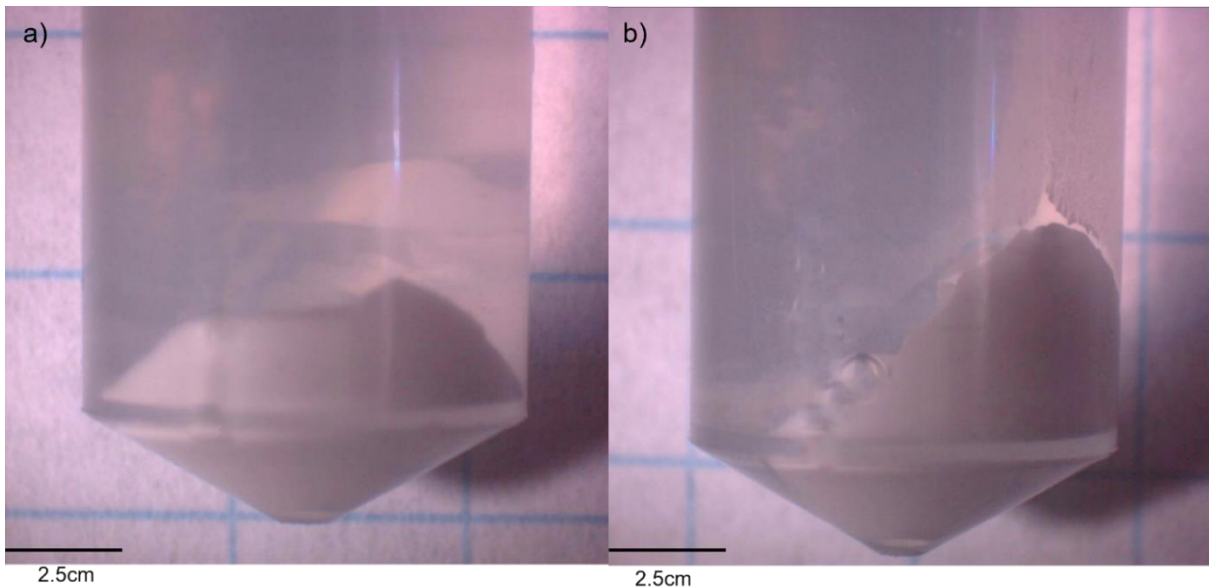


Figura IV.1. Resultados del proceso de centrifugado de las muestras del esmalte dental humano en polvo diluidas en, a) H_2O , b) $NaClO$.

IV.1 Difracción de rayos X (DRX)

En la figura IV.1 Se muestran los difractogramas obtenidos de las muestras en polvo que se sometieron a un proceso de centrifugación. Es muy importante señalar que la sección transversal del haz de rayos X analiza un área circular de aproximadamente 1mm de diámetro, por lo que todos estos análisis son a escala milimétrica.

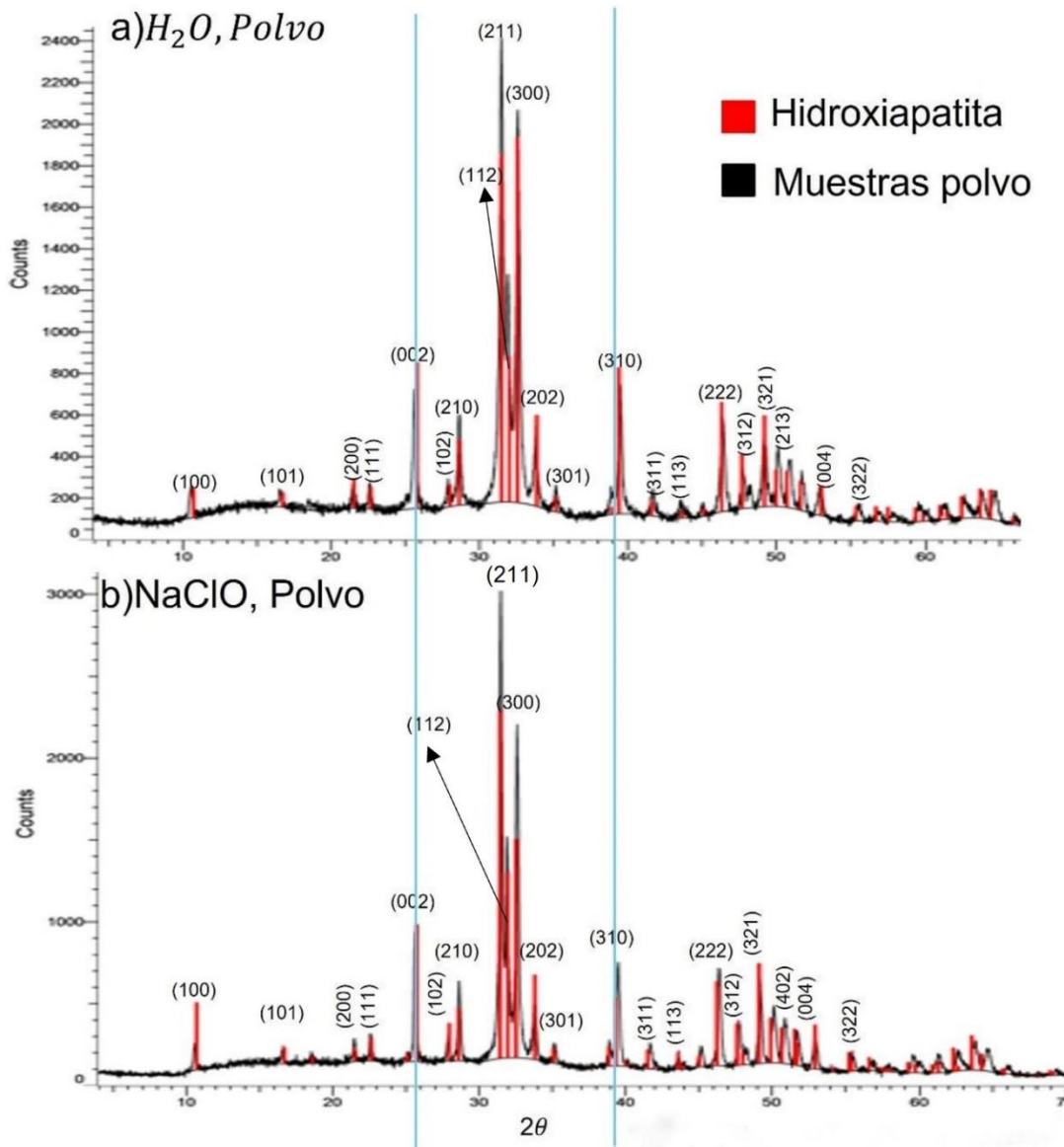


Figura IV.2. Difractogramas de rayos X de las muestras del esmalte en polvo presentados en la figura IV.1. Los cursores en rojo corresponden a la hidroxiapatita.

Como podemos observar en la figura IV.2., en ambos difractogramas los picos de Bragg de la muestra con cloro y agua destilada coincide con los cursores de la HAP, de la misma forma los picos de Bragg corresponden con el tamaño de los cursores. Por lo tanto, podemos concluir que a escala milimétrica los 2 espectros nos indica que la fase principal que conforma el esmalte dental es la hidroxiapatita. Debido a la presencia de la forma “de panza” de la línea base, esta podría indicar la presencia de una fase amorfa.

En la figura IV.3 se presentan los difractogramas obtenidos de las muestras en bulto, tanto en dirección transversal como en la dirección longitudinal, respectivamente. Este análisis se realizó después de realizar la preparación y ataque de la muestra para revelar su estructura.

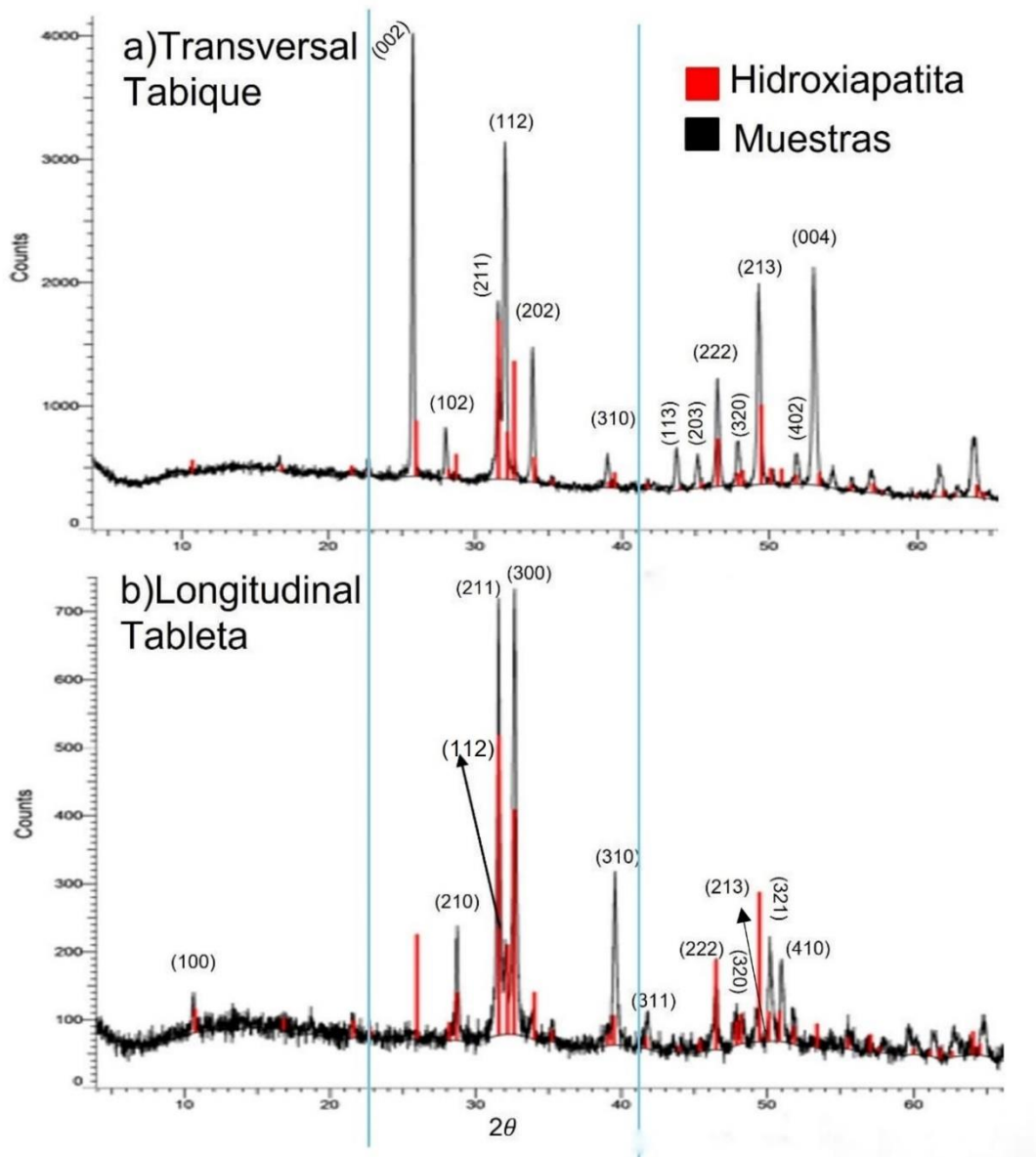


Figura IV.3 Difractogramas de las muestras volumétricas del esmalte dental humano. a) dirección transversal, b) dirección longitudinal.

En la figura IV.3 se observa la existencia de direcciones preferenciales en las muestras volumétricas. Por ejemplo, si comparamos la muestra transversal con la muestra longitudinal en la figura IV.3 se observa que la reflexión correspondiente al plano (002) es muy grande en la muestra transversal y prácticamente desaparece en la muestra longitudinal. Lo mismo sucede con otras reflexiones, por ejemplo, en el (211) el pico es mucho más grande en la muestra en sección longitudinal que en la muestra transversal.

Ahora si observamos la reflexión del plano (300) de la muestra en sección longitudinal, observamos que es el pico más alto de dicho difractograma, mientras que en la muestra en sección transversal dicho plano ni si quiera existe. Al comparar esta reflexión ahora con las muestras en polvo mostradas en la figura IV.2 observamos que el pico correspondiente al plano (300) es en la muestra en polvo más bajo que el correspondiente al plano (211).

Por lo tanto, podemos concluir la existencia de direcciones preferenciales en las muestras volumétricas lo cual está en completo acuerdo con la estructura del esmalte dental que se observa en la figura 3 de la sección de introducción, ya que, si hacemos un corte transversal en el esmalte, podremos observar prismas con cabeza de cerradura donde los cristales del esmalte están orientados en promedio con la dirección [002] normal a la superficie, mientras que si realizamos un corte longitudinal observaremos que líneas de los prismas que van desde la superficie del diente hasta la unión amelodentinaria están compuestos por cristales del esmalte en dirección [300].

IV.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

En esta sección se mostrará una serie de imágenes de SEM a diferentes ampliaciones de los 3 tipos de muestra que se obtuvieron (muestra transversal, muestra longitudinal y muestra en polvo). Como no se observó diferencia de fases en los polvos centrifugados ni tampoco diferencias significativas en el análisis de rayos X, se optó por trabajar solo una de las muestras en polvo. En la figura IV.4 se presentan las imágenes SEM en el modo electrones secundarios a diferentes ampliaciones de la muestra en dirección transversal. Para obtener estas imágenes se utilizó el modo electrones secundarios debido a que estos electrones son de muy baja energía (por debajo de 5 eV), y por lo tanto que deben encontrarse muy cerca de la superficie para poder escapar. Precisamente por esta razón proporcionan información sobre la estructura y topografía de la muestra [1].

En la figura IV.4a se presentan las estructuras de los prismas a escala micrométrica. Se ve claramente la cabeza de llave de cerradura de los prismas. En promedio la cabeza de estos prismas mide 5 μm , aunque también es común encontrarlos deformados. En la figura IV.4b se puede observar que los prismas están formados a su vez por pequeños granos o cristales nanométricos. Estos son los cristales del esmalte dental humano. En las figuras IV.4 c y d se observan cúmulos de estos cristales nanométricos en diferentes direcciones y orientaciones, con diferentes distancias de profundidad, esto debido a que el ataque químico con ácido fosfórico no fue uniforme.

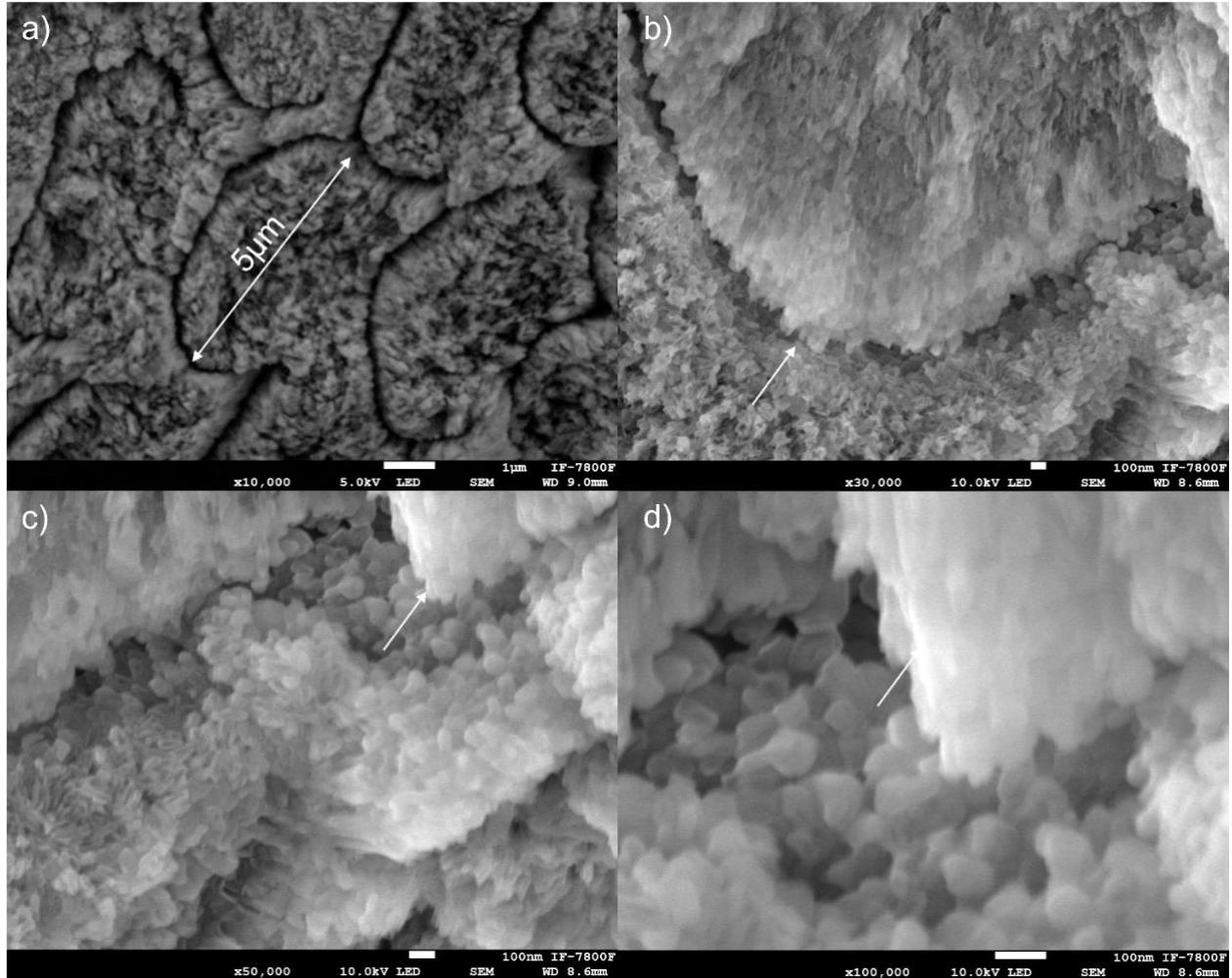


Figura IV.4. Imágenes SEM en el modo electrones secundarios a diferentes ampliaciones de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal. a)10,000x, b)30,000x, c)50,000x y d)100,000x.

En la figura IV.5 se presentas las imágenes SEM en el modo electrones secundarios a diferentes ampliaciones de la muestra en dirección longitudinal. En la figura IV.5 se observa la forma y orientación de los cristales nanométricos del esmalte dental humano en la sección longitudinal con diferentes ampliaciones. En promedio estos nano cristales miden 50 nm de ancho por 500 nm de largo.

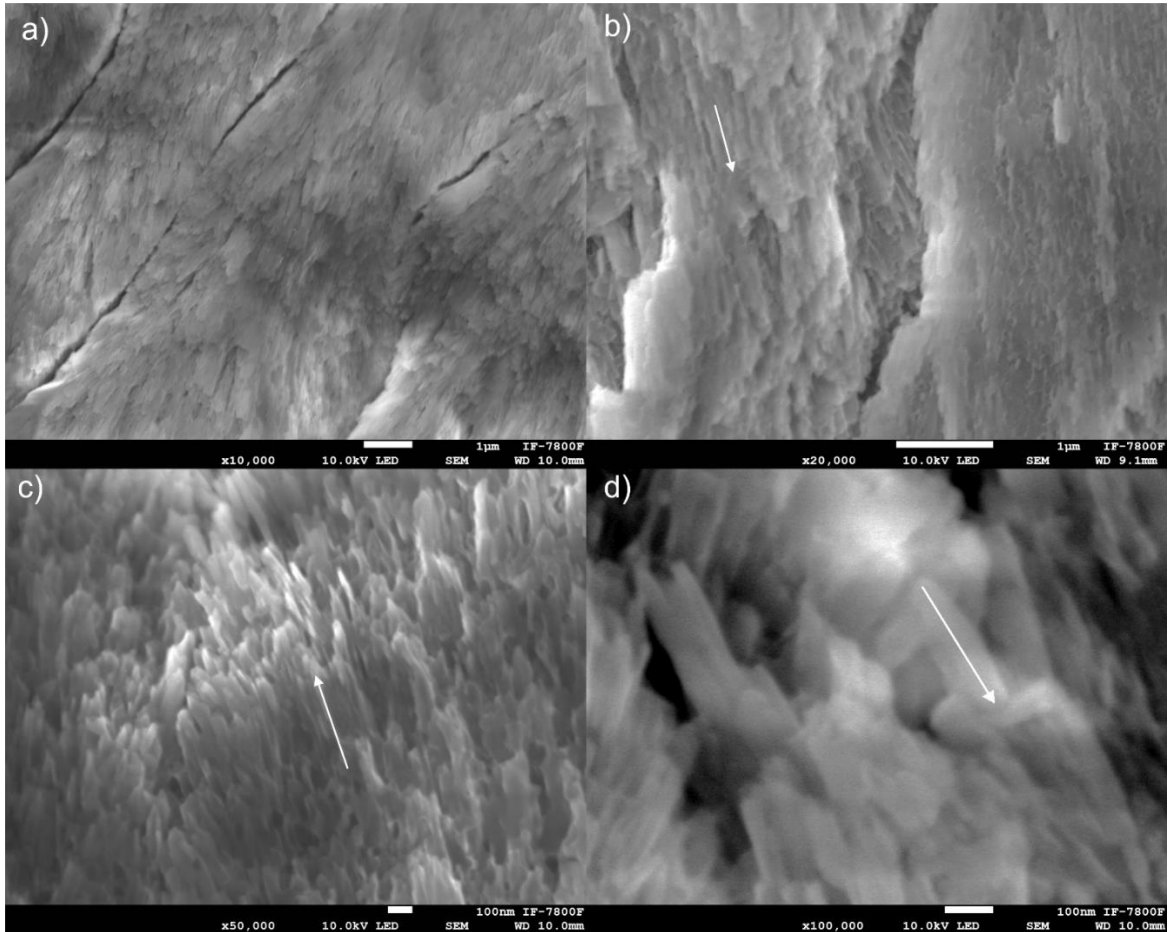


Figura IV.5. Imágenes SEM en el modo electrones secundarios a diferentes ampliaciones de la muestra del esmalte dental humano en la dirección longitudinal. a)10,000, b)20,000x, c)50,000x y d)100,000x.

En la figura IV.6 se presentan las imágenes SEM en el modo electrones secundarios a diferentes ampliaciones de la muestra en polvo del esmalte dental humano.

En las figuras IV.6 a y b se observan los cúmulos de los cristales del esmalte, mientras que en las figuras IV.6 c y d se presentan los cristales nanométricos señalados con la flecha blanca. Debido a que se trabajó en un intervalo de 100,000 a 140,000 ampliaciones, y como se trata de polvo suelto y disperso, es más fácil que el haz de electrones dañe la muestra.

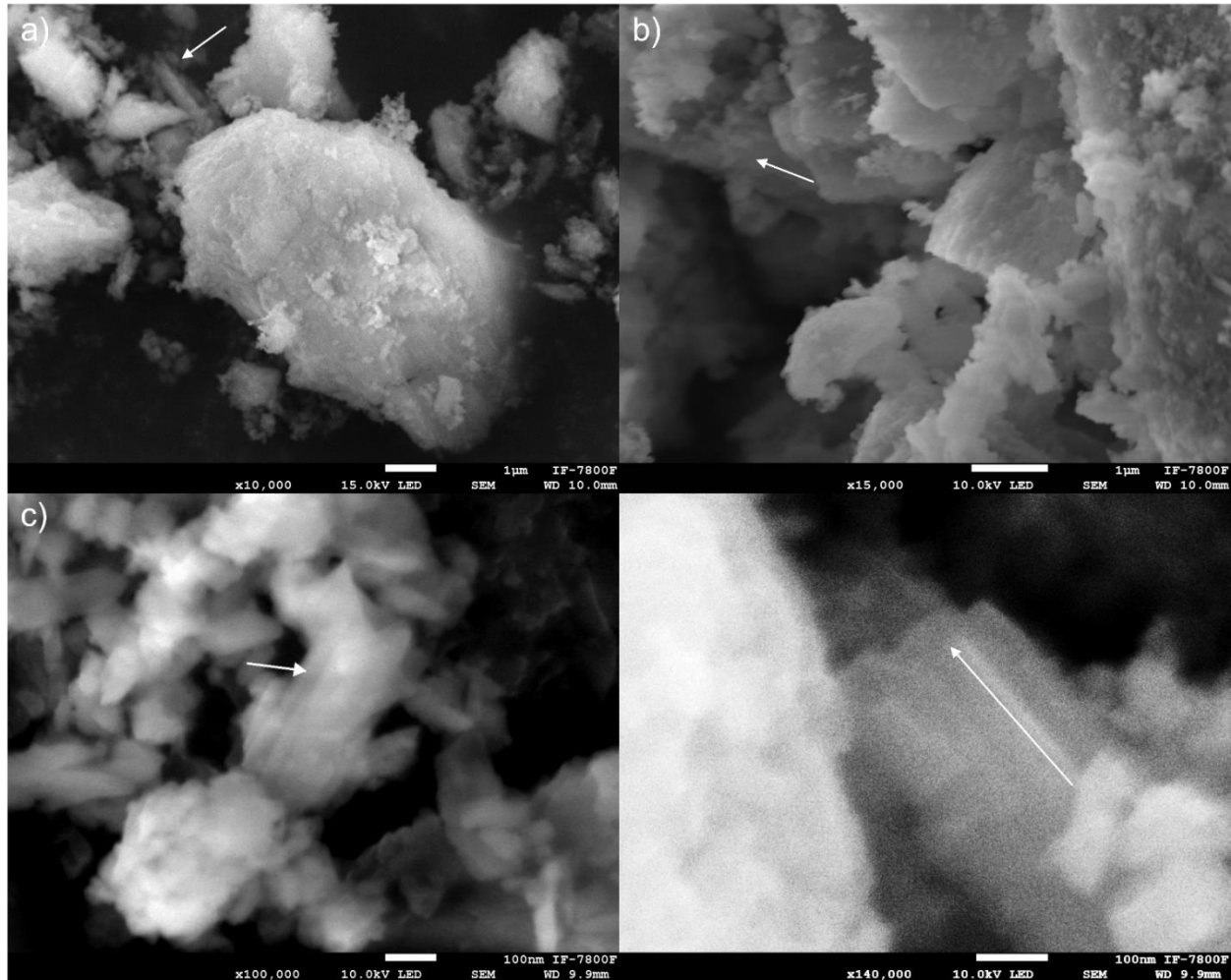


Figura IV.6 Imágenes SEM de la muestra en polvo del esmalte dental humano en el modo electrones secundarios a diferentes ampliaciones. a)10,000, b)15,000x, c)100,000x y d)140,000x.

IV.3 Espectroscopia de rayos X por dispersión de energía (EDS)

En esta sección se mostrará una serie de resultados utilizando el microscopio electrónico de barrido en el modo SEM-EDS. Para poder llevar a cabo este análisis se utilizó el modo electrones retro dispersados debido a que su intensidad varía proporcionalmente con el número atómico de muestra. Por esta razón se utilizan electrones retro dispersados para obtener información sobre la composición química de la muestra [1]. Cada espectro puntual se realizó 4 veces y los resultados fueron un promedio de dicho análisis.

IV.3.1 EDS puntual y Mapeos Químicos Elementales a 2,000x

La figura IV.7 presenta las imágenes de SEM tomadas a 2,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal y espectros de EDS en el modo puntual obtenidos en la interfase y en el centro del prisma. Los espectros presentan los elementos *Ca*, *P*, *O*, *Na*, *Mg* y *C*, cuyos porcentajes se presentan en la tabla IV.1.

Haciendo una comparativa a esta amplificación con los resultados de rayos X presentados en la sección 4.1, vemos que en este caso observamos señales adicionales a los de la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), los cuales corresponden a *Na*, *Mg*, *C*. El hidrógeno es indetectable por esta técnica, pero basándonos en los resultados de rayos X, claramente está presente.

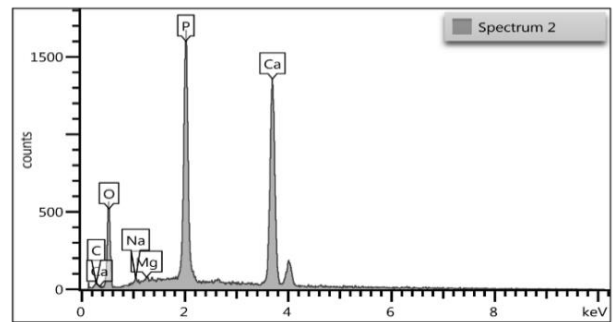
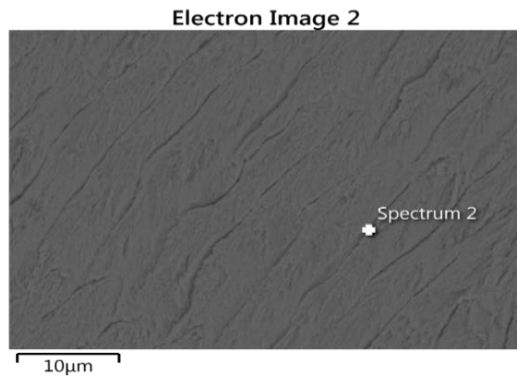
De la tabla IV.1 podemos observar que en la sección longitudinal a 2,000 amplificaciones la concentración de *C*, *O* y *Na* es mayor en el centro del prisma, de hecho, es más del doble del que se presenta en la interfaz de los prismas. El resto de los elementos, *Mg*, *P*, *Ca*, están distribuidos de manera homogénea.

Se sabe que la relación *Ca/P* en HAP sintética es de 1.67. Sin embargo, cuando se hizo el análisis en la interfase de los prismas se encontró que la relación *Ca/P*= 2.42 y observamos que en el centro del prisma la relación es de *Ca/P*=2.

*C*Nota: La medición de la concentración de carbono por EDS es una medición cualitativa, prácticamente significa que, si se ha detectado carbono después de eliminar cualquier fuente de contaminación por carbono durante la preparación de la muestra (como fue el caso del presente trabajo), la muestra contiene carbono. Generalmente, los recuentos de fondo en TEM-EDS son mucho más bajos que los del espectro SEM-EDS. Debido a los altos recuentos de fondo en SEM-EDS, siempre se ve un pico artificial de carbono y, por lo tanto, un valor de más del 2 % de carbono normalmente se mide aunque no haya carbono en la muestra [3]. Sin embargo, en nuestro caso, los mapeos de EDS a diferentes amplificaciones sí presentan variaciones en las concentraciones de carbono. Por lo tanto, los valores de carbono se tomarán de forma cualitativa basado en el hecho de que existen reportes obtenidos por otras técnicas de la existencia del carbono en el esmalte dental humano.*

MUESTRA LONGITUDINAL

Interfase del prisma



Centro del prisma

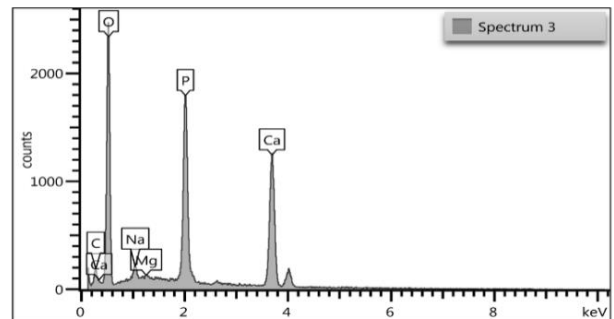
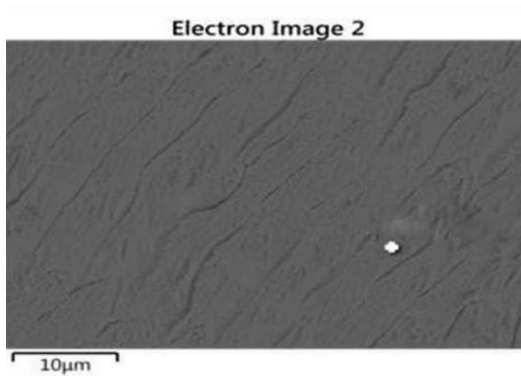


Figura IV.7. Imágenes de SEM a 2,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal y espectros de EDS en el modo puntual obtenidos en la interfase y en el centro del prisma.

El realizar mapeos químicos de EDS permite conocer la distribución espacial de los elementos en la muestra. La figura IV.8 presenta los mapeos químicos elementales en la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal. En estas imágenes se indica que hay mayor concentración de O y C en el centro de los prismas que en las interfaces. El resto de los elementos *Na*, *Mg*, *Ca*, *P*. Están distribuidos de manera homogénea. El objeto tipo mariposa indica la misma posición en todas las imágenes.

Interfase del Prisma 2,000x		
Elemento	\bar{X} wt%	σ (DE)
Ca	55.46	0.02
P	22.90	0.01
O	19.87	0.01
C*	1.29	0.01
Na	0.29	0.03
Mg	0.17	0.01
Total	100	Ca/P=2.42
Centro del Prisma 2,000x		
Elemento	\bar{X} wt%	σ (DE)
Ca	35.72	0.02
P	17.82	0.01
O	41.80	0.02
C*	3.56	0.01
Na	0.94	0.02
Mg	0.13	0.01
Total	100	Ca/P=2

Tabla IV.1 Resultados del EDS puntual en peso porcentual obtenidos de la figura IV.8.

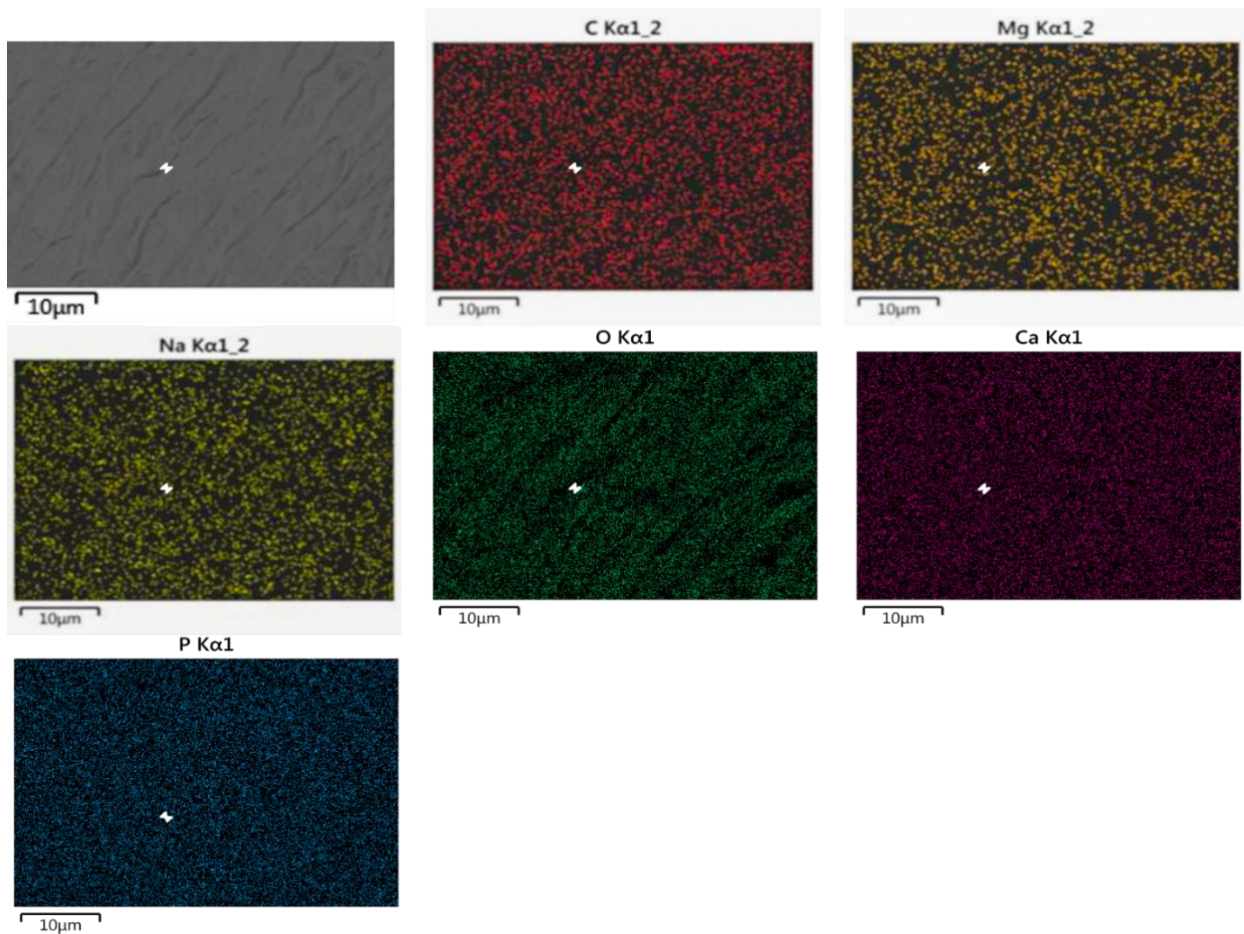


Figura IV.8. Mapeos químico elemental de EDS a 2,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal.

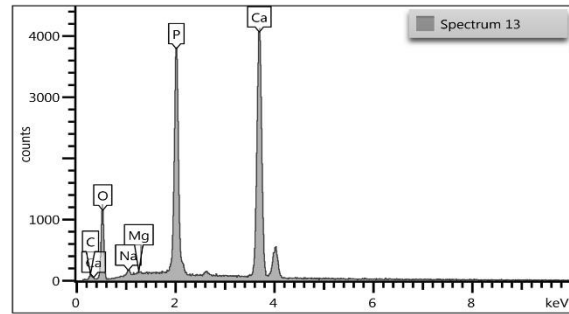
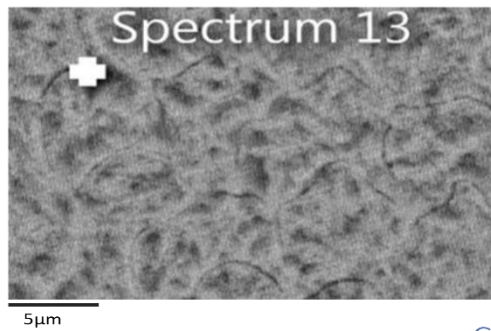
La figura IV.9 presenta las imágenes de SEM a 2,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal y los espectros de EDS en el modo puntual obtenidos en la interfase y en el centro del prisma. Al realizar el análisis de EDS en la interfase del prisma a 2,000x en la muestra del esmalte dental humano en la dirección transversal, se observó un incremento considerable en los elementos *O*, *Na*. Los espectros presentan los elementos *Ca*, *P*, *O*, *Mg* y *C*, cuyos porcentajes se presentan en la tabla IV.2. La tabla IV.2 indica que la relación *Ca/P* en la interfase es de 2.25.

En el centro de los prismas ocurre lo contrario, hay una disminución considerable en la concentración de los elementos *C*, *O*, *Na*, y un notable crecimiento en la concentración de los elementos *P* y *Ca*. De esta manera, la relación *Ca/P* aumenta a 2.39.

Ahora, comparando los 2 espectros puntuales de la tabla IV.2 podemos observar que en la sección transversal a 2,000 ampliaciones la concentración de *C*, *O* es mayor en la interfase del prisma. El resto de los elementos, *Na*, *Mg*, *P*, *Ca*, están distribuidos de manera homogénea.

MUESTRA TRANSVERSAL

Interfase del prisma



Centro del prisma

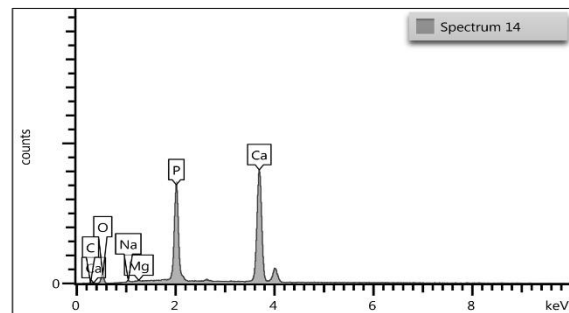
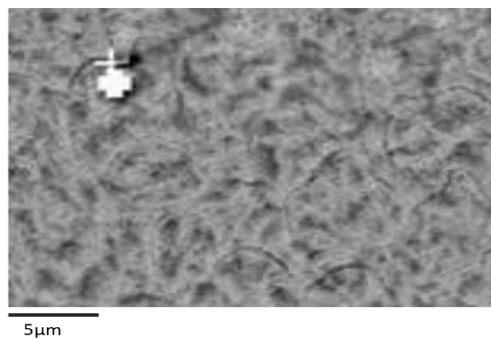


Figura IV.9. Imágenes de SEM a 2,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal y los espectros de EDS en el modo puntual obtenidos en la interfase y en el centro del prisma.

Interfase del Prisma 2,000x		
Elemento	\bar{X} wt%	σ (DE)
Ca	45.44	0.01
P	20.17	0.01
O	31.30	0.01
C*	2.35	0.01
Na	0.58	0.02
Mg	0.15	0.01
Total	100	Ca/P=2.25
Centro del Prisma 2,000x		
Elemento	\bar{X} wt%	σ (DE)
Ca	59.55	0.02
P	24.86	0.01
O	14.30	0.02
C*	0.64	0.02
Na	0.47	0.01
Mg	0.15	0.01
Total	100	Ca/P=2.39

Tabla IV.2 Resultados en peso porcentual del EDS obtenido de la figura IV.10.

La figura IV.10 presenta los mapeos químico elemental de EDS a 2,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal. En esta figura se observa que existe mayor concentración de *O* y *C* en la interfase de los prismas. El resto de los elementos *Na*, *Mg*, *Ca*, *P*. Están distribuidos de manera homogénea.

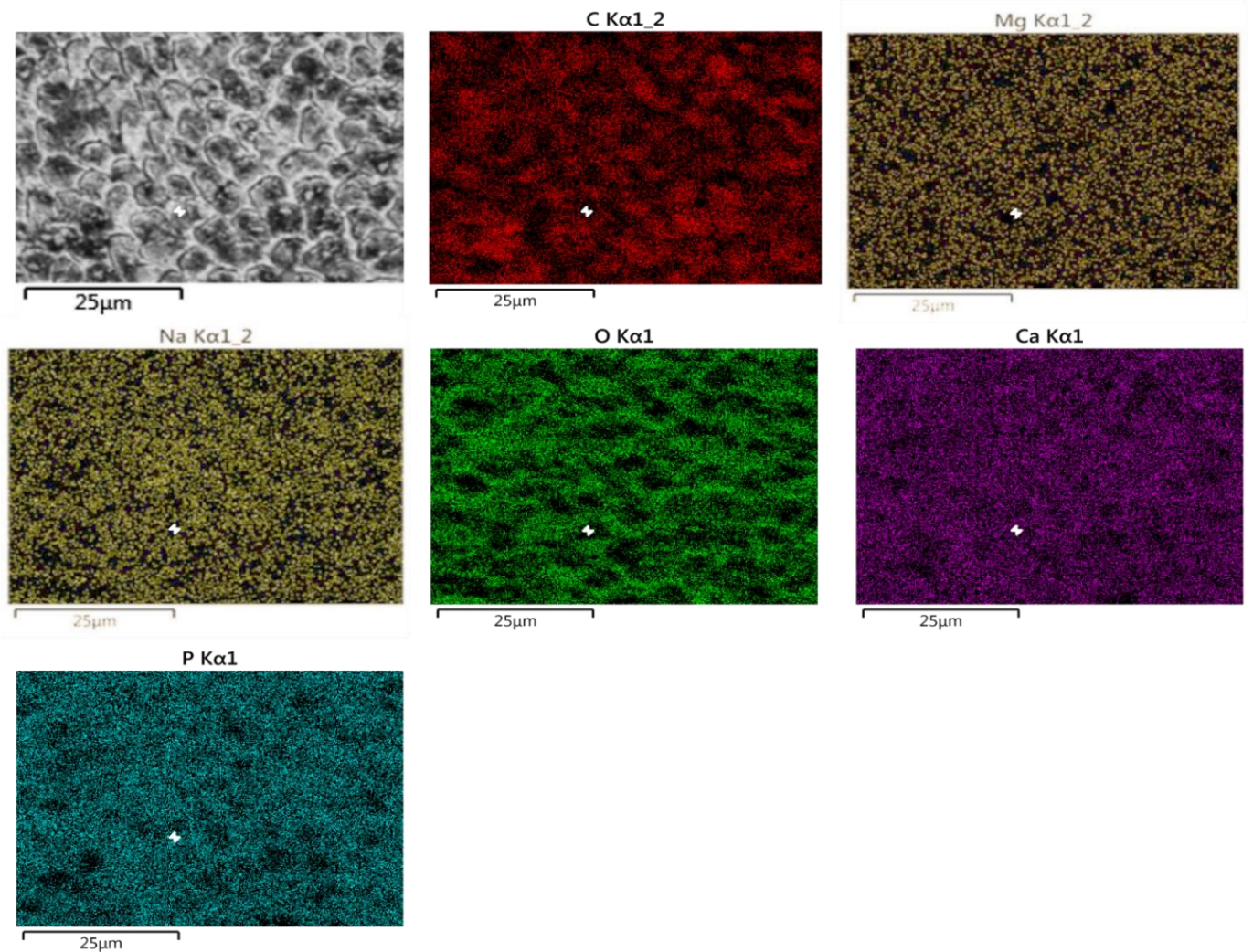


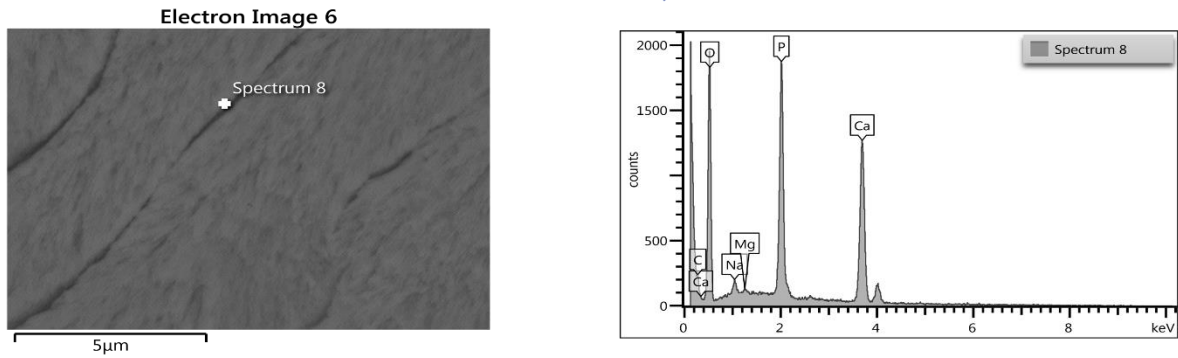
Figura IV.10 Mapeos químico elemental de EDS a 2,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal. El objeto tipo mariposa indica la misma posición en todas las imágenes.

IV.3.2 EDS puntual y Mapeos Químicos Elementales a 10,000x

La Figura IV.11 presenta las imágenes de SEM a 10,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal y los espectros de EDS en el modo puntual obtenidos en la interfase y en el centro del prisma.

MUESTRA LONGITUDINAL

Interfase del prisma



Centro del prisma

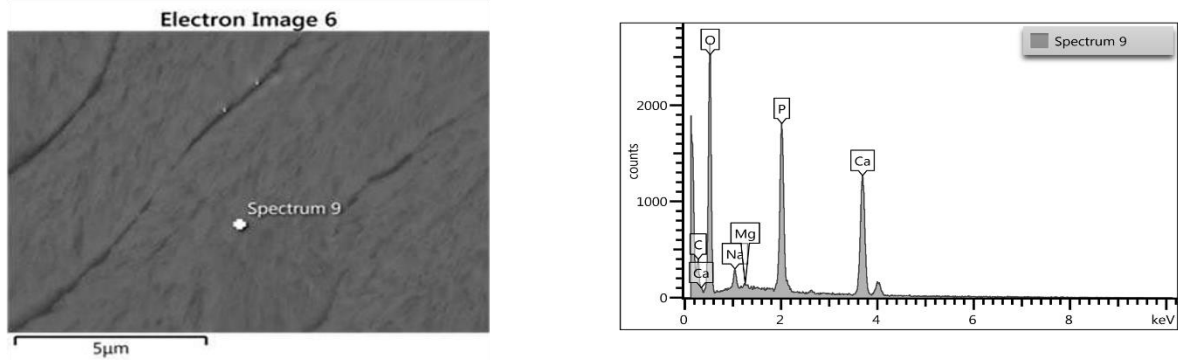


Figura IV.11. Imágenes de SEM a 10,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal y los espectros de EDS en el modo puntual obtenidos en la interfase y en el centro del prisma.

Al realizar el análisis EDS a ampliaciones de 10,000x en la muestra longitudinal, comparamos los resultados del análisis elemental de ambos espectros puntuales de la tabla IV.3 y podemos observar que en la sección longitudinal la concentración de C, O es mayor en el centro de los prismas.

El resto de los elementos, *Na*, *Mg*, *P*, *Ca*, están distribuidos de manera homogénea. También se observa en la tabla IV.3 que en la interfase de los prismas se presenta una relación $Ca/P=1.95$ mientras que en el centro del prisma la relación es de $Ca/P=1.99$.

Interfase del Prisma 10,000x		
Elemento	\bar{X} wt%	σ (DE)
Ca	38.99	0.03
P	19.92	0.03
O	37.95	0.02
C*	2.10	0.02
Na	0.82	0.02
Mg	38.99	0.03
Total	100	Ca/P=1.95
Centro del Prisma 10,000x		
Elemento	\bar{X} wt%	σ (DE)
Ca	34.22	0.01
P	17.18	0.02
O	41.46	0.04
C*	3.42	0.04
Na	1.44	0.03
Mg	0.24	0.02
Total	100	Ca/P=1.99

Tabla IV.3 Resultados en peso porcentual del EDS puntual obtenido de la figura IV.12

La figura IV.12 presenta los mapeos químicos elementales de la muestra longitudinal. En esta figura podemos observar que existe mayor concentración de *O* y *C* en el centro de los prismas. Esto es más fácil de observar con ayuda de los cursores agregados en la interfase de un mismo prisma, donde también podemos observar la ausencia de estos 2 elementos. El resto de los elementos *Na*, *Mg*, *Ca*, *P* están distribuidos de manera homogénea.

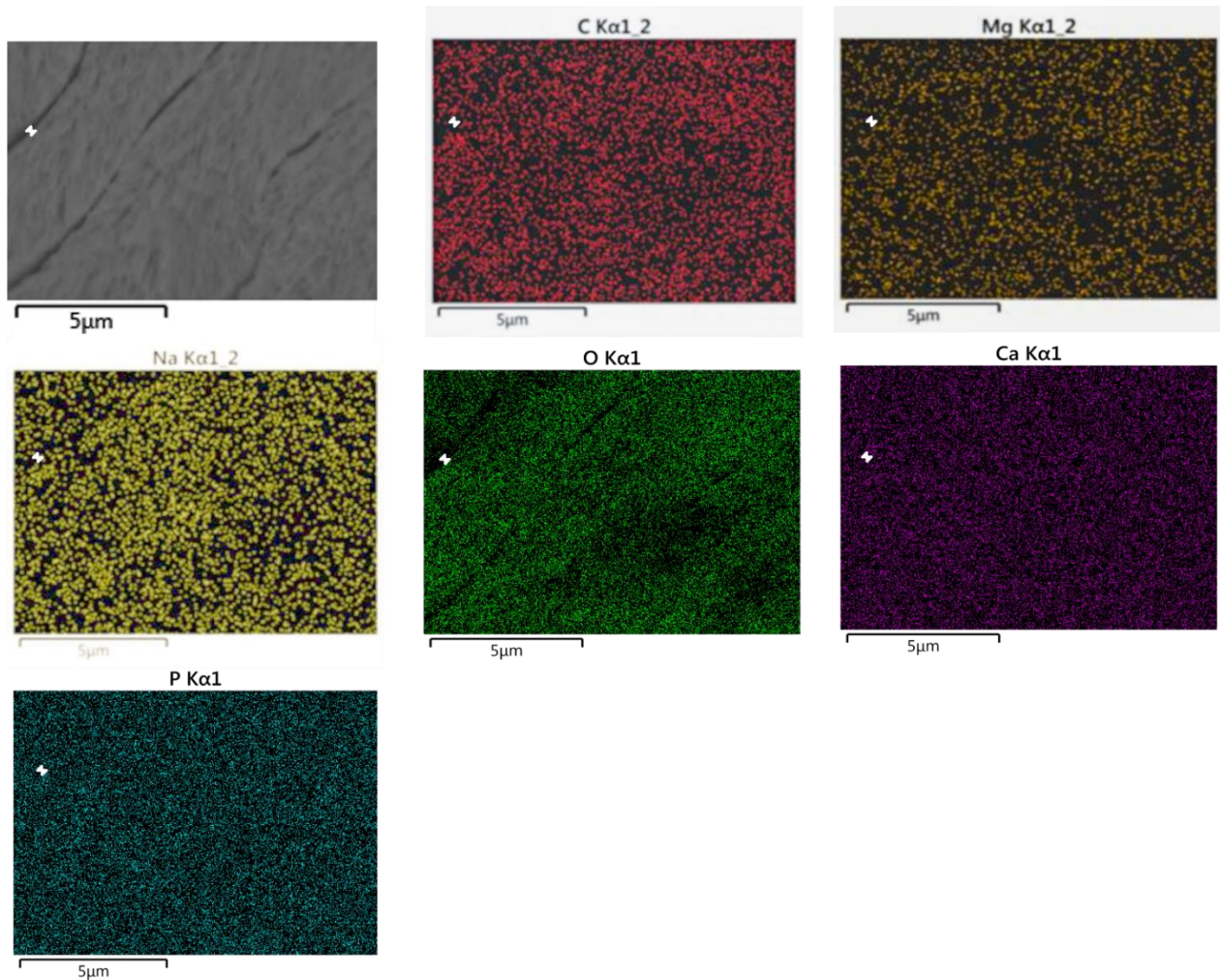
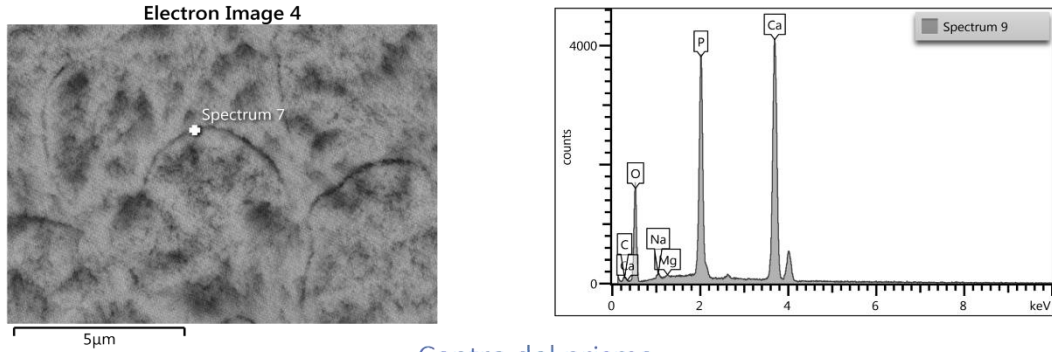


Figura IV.12 Mapeos químico elemental de EDS a 10,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal. El objeto tipo mariposa indica la misma posición en todas las imágenes.

La figura IV.13 presenta los mapeos químico elemental de EDS a 10,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal. Al realizar el análisis a ampliaciones de 10,000x en la muestra transversal, de la tabla IV.4 podemos observar se observa que la concentración de *C*, *O* es mayor la interfase de los prismas. El resto de los elementos, *Na*, *Mg*, *P*, *Ca*, están distribuidos de manera homogénea. En la interfase de los prismas se observa la relación $Ca/P=2.21$ mientras que en el centro del prisma la relación es de $Ca/P=2.29$.

MUESTRA TRANSVERSAL

Interfase del prisma



Centro del prisma

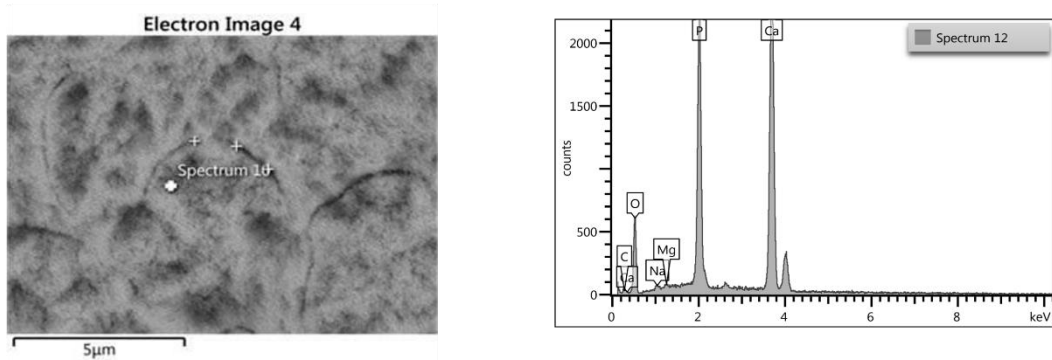


Figura IV.13 Imágenes de SEM a 10,000x de la muestra en dirección transversal

Interfase del Prisma 10,000x		
Elemento	\bar{X} wt%	σ (DE)
Ca	43.27	1.31
P	19.55	0.72
O	34.11	1.79
C*	2.42	0.21
Na	0.50	0.01
Mg	0.15	0.01
Total	100	Ca/P=2.29
Centro del Prisma 10,000x		
Elemento	\bar{X} wt%	σ (DE)
Ca	51.04	3.20
P	22.04	1.21
O	24.14	0.24
C*	1.93	0.19
Na	0.38	0.03
Mg	0.22	0.02
Total	100	Ca/P=2.29

Tabla IV.4 Resultados en peso porcentual del EDS puntual obtenido de la figura IV.14

La figura IV.14 presenta los mapeos químico elemental de EDS a 10,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal. De esta figura y de la Tabla IV.4 se observa que existe mayor concentración de O, C, Na en la interfase de los prismas, esto lo podemos observar más fácilmente orientándonos con los cursores agregados en el centro de un mismo prisma. Además, se observa la ausencia de estos tres elementos. En el resto de los elementos, *Mg*, *Ca*, *P*, también se observan depreciaciones en el centro de los prismas, pero un poco más tenue que los tres primeros.

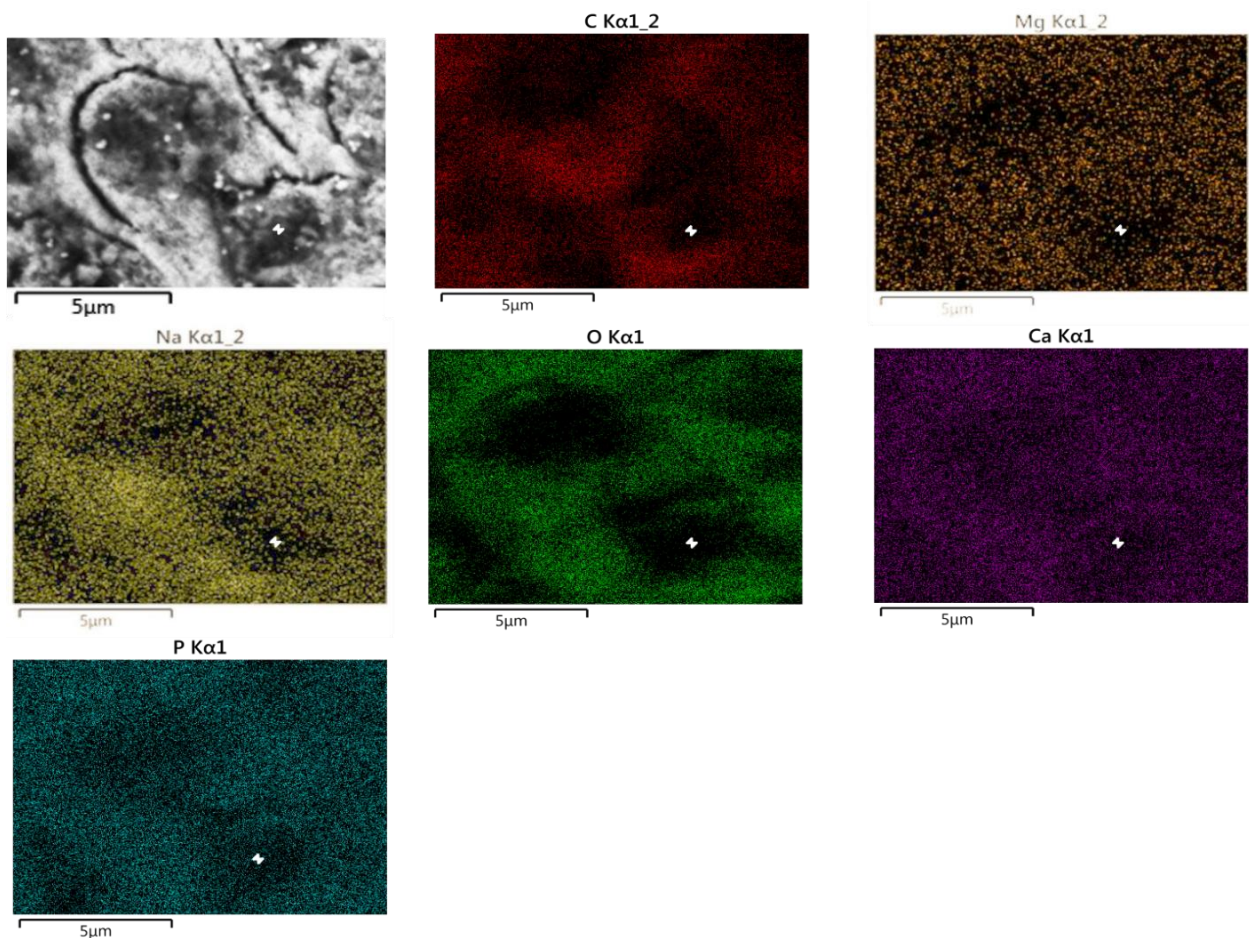


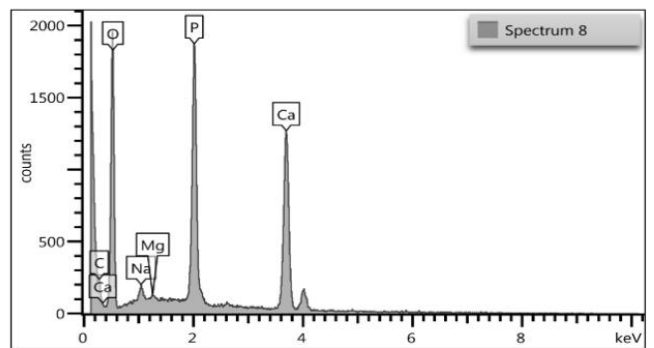
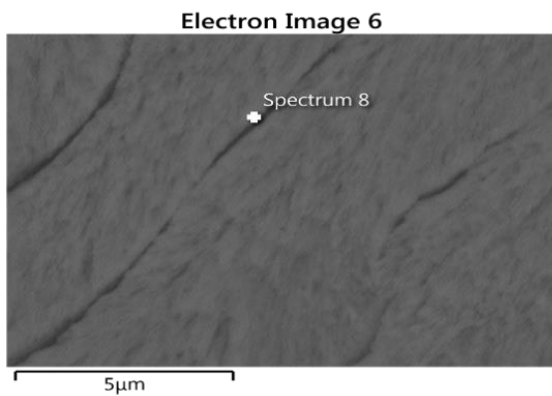
Figura IV.14 Mapeos químico elemental de EDS a 10,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal. El objeto tipo mariposa indica la misma posición en todas las imágenes.

IV.3.2 EDS puntual y Mapeos Químicos Elementales a 20,000x

La figura IV.15 presenta las imágenes de SEM a 20,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal y los espectros de EDS en el modo puntual obtenidos en la interfase y en el centro del prisma. Los espectros presentan los elementos *Ca*, *P*, *O*, *Na*, *Mg* y *C*, cuyos porcentajes se presentan en la tabla IV.5.

MUESTRA LONGITUDINAL

Interfase del prisma



Centro del prisma

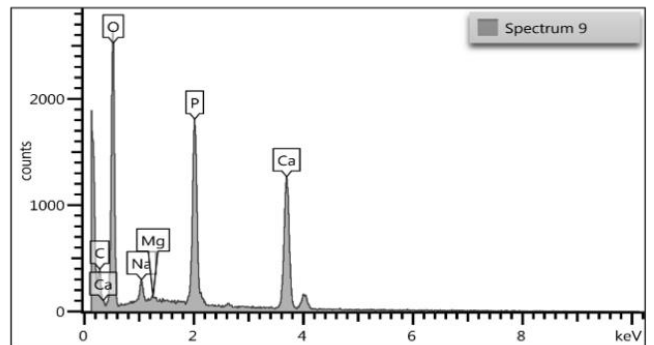
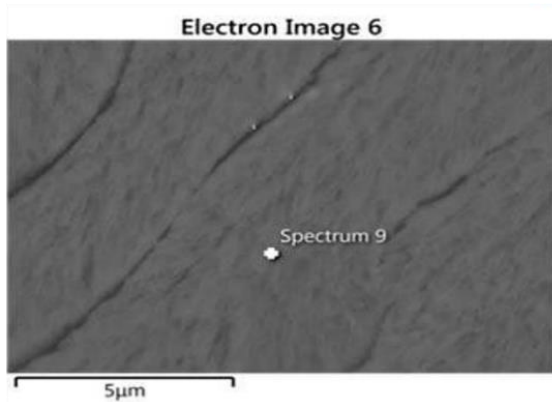


Figura IV.15 Imágenes de SEM a 20,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal y los espectros de EDS en el modo puntual obtenidos en la interfase y en el centro del prisma.

En la tabla IV.5 se observa que el análisis en la muestra longitudinal a ampliaciones de 20,000x, que la concentración de C, O es mayor en el centro del prisma. El resto de los elementos, Na, Mg, P, Ca, están distribuidos de manera homogénea. En la interfase de los prismas se obtuvo la relación $Ca/P=2.2$ mientras que en el centro del prisma la relación es de $Ca/P=2.03$.

Interfase del Prisma 20,000x		
Elemento	\bar{X} wt%	σ (DE)
Ca	52.86	0.02
P	23.92	0.01
O	21.57	0.02
C*	1.04	0.01
Na	0.42	0.02
Mg	0.17	0.02
Total	100	Ca/P=2.2
Centro del Prisma 20,000x		
Elemento	\bar{X} wt%	σ (DE)
Ca	35.91	0.02
P	17.62	0.02
O	42.30	0.02
C*	3.33	0.02
Na	0.64	0.02
Mg	0.20	0.01
Total	100	Ca/P=2.03

Tabla IV.5 Resultados del EDS puntual obtenido de la figura IV.16

La figura IV.16 presenta los mapeos químico elemental de EDS a 20,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal. En esta figura y en la tabla IV.5 se observa que existe mayor concentración de C, O en el centro de los prismas. Esto lo podemos observar debido a los cursores agregados la interfase de un mismo prisma en donde podemos observar ausencia de estos dos elementos. El resto de los elementos, C, Na, Mg, Ca, P. Están distribuidos de manera homogénea.

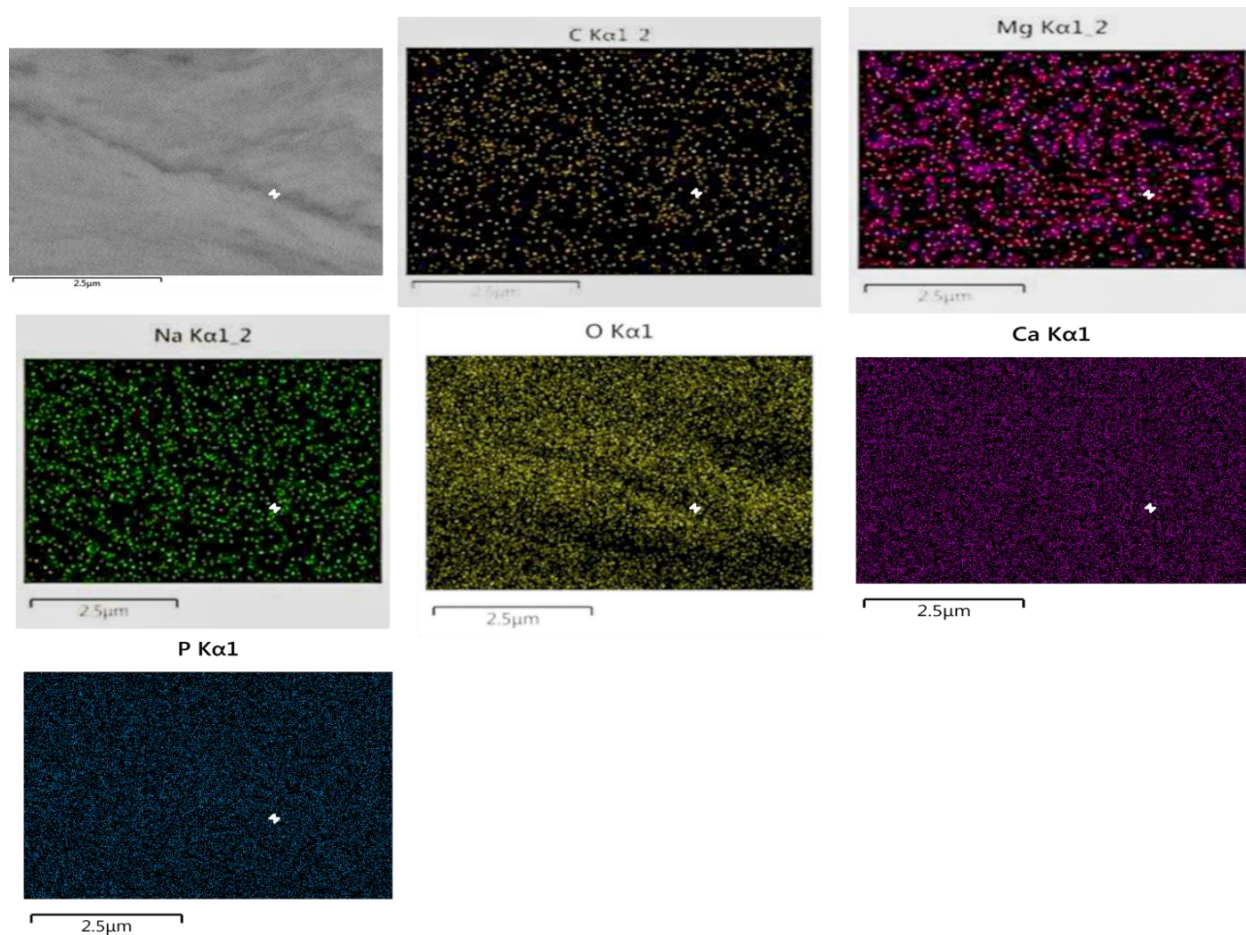
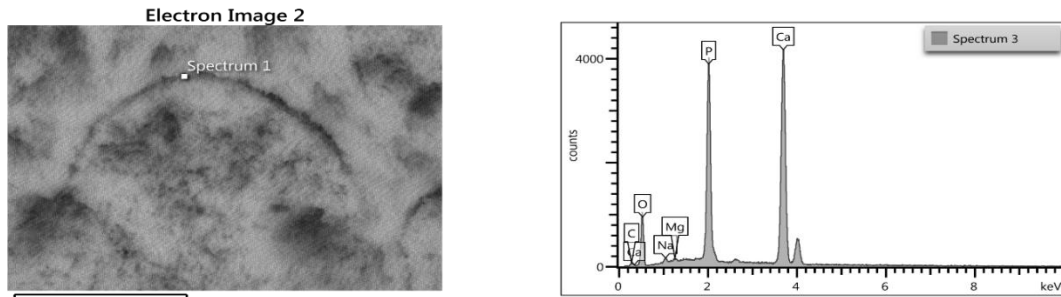


Figura IV.16. Mapeos químico elemental de EDS a 20,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección longitudinal. El objeto tipo mariposa indica la misma posición en todas las imágenes.

La figura IV.17 presenta las imágenes de SEM a 20,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal y los espectros de EDS en el modo puntual obtenidos en la interfase y en el centro del prisma. Los espectros presentan los elementos *Ca*, *P*, *O*, *Na*, *Mg* y *C*, cuyos porcentajes se presentan en la tabla IV.6. Esta figura y la tabla IV.6 indican que la concentración de *C*, *O* es mayor en el centro del prisma, caso contrario a las ampliaciones antes analizadas. El resto de los elementos, *Na*, *Mg*, *P*, *Ca*, están distribuidos de manera homogénea. En la interfase de los prismas se encontró que la relación $Ca/P=2.29$ y observamos que en el centro del prisma la relación es de $Ca/P=2.12$.

MUESTRA TRANSVERSAL

Interfase del prisma



Centro del prisma

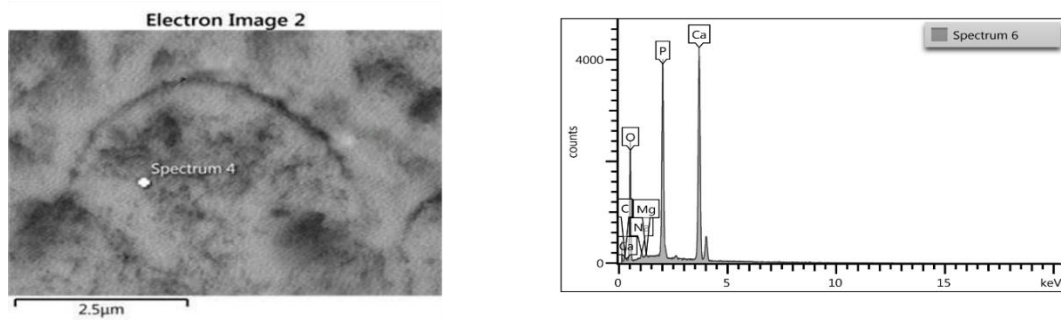


Figura IV.17 Imágenes de SEM a 20,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal y los espectros de EDS en el modo puntual obtenidos en la interfase y en el centro del prisma.

Interfase del Prisma 20,000x		
Elemento	\bar{X} wt%	σ (DE)
Ca	50.81	3
P	22.1	0.68
O	24.75	3.2
C*	1.62	0.65
Na	0.43	0.10
Mg	0.26	0.04
Total	100	Ca/P=2.29
Centro del Prisma 20,000x		
Elemento	\bar{X} wt%	σ (DE)
Ca	39.31	4.11
P	18.48	1.58
O	37.91	5.51
C*	3.46	0.28
Na	0.63	0.23
Mg	0.19	0.01
Total	100	Ca/P=2.12

Tabla IV.6 Resultados del EDS puntual obtenido de la figura IV.18

La figura IV.18 presenta los mapeos químico elemental de EDS a 20,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal. En estos mapeos químicos se observa que existe mayor concentración de *C*, *O*, *Na* en el centro de los prismas. El resto de los elementos, *Mg*, *Ca*, *P*. Están distribuidos de manera homogénea.

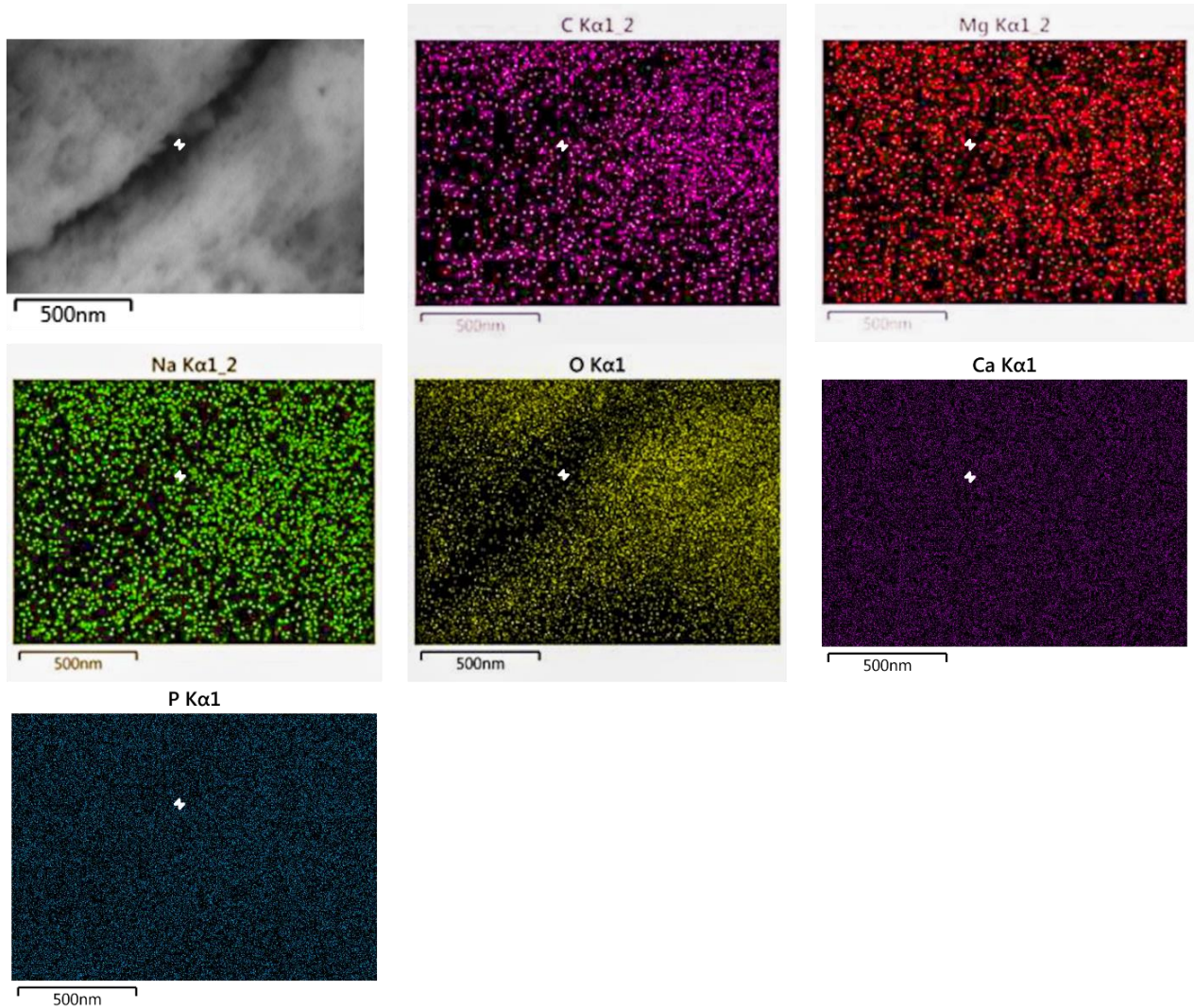


Figura IV.18 Mapeos químico elemental de EDS a 20,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal. El objeto tipo mariposa indica la misma posición en todas las imágenes.

IV.4 EDS lineal

En esta sección se obtuvieron resultados de EDS en el modo lineal a ampliaciones de 20,000x. con el objetivo de analizar la variación en la concentración de los elementos a lo largo de una línea micrométrica entre prismas, tanto en la muestra longitudinal como transversal. La longitud de la línea de EDS fue de 3 μm , aproximadamente.

En la figura IV.20 se presentan los resultados del EDS-Lineal en la muestra longitudinal del esmalte dental humano. En esta figura se observa que los elementos minoritarios como lo son (*Na*, *Mg*, *C*) se encuentran distribuidos en la parte inferior, mientras que los elementos con mayor concentración (*Ca*, *P*, *O*) se localizan en la parte superior. De la figura IV.18 también podemos observar que el elemento que presenta mayor variación con respecto a la posición es el *O* y que también presenta una depresión en la interfase del prisma.

En la figura IV.20 se presentan los espectros EDS-Lineal de los elementos mostrados en la figura IV.19 pero de manera individual para la observación más clara de las variaciones que presentan en cada caso. Es importante señalar aquí que se observa mucha variación en la concentración de los elementos por las irregularidades que contiene la muestra en sí misma y también por a la amplificación de la escala de la gráfica. Sin embargo, podemos observar tanto en la figura IV.20 como en la figura IV.21 que, en promedio, hay menor concentración de *C* y *O* en la interfase de los prismas.

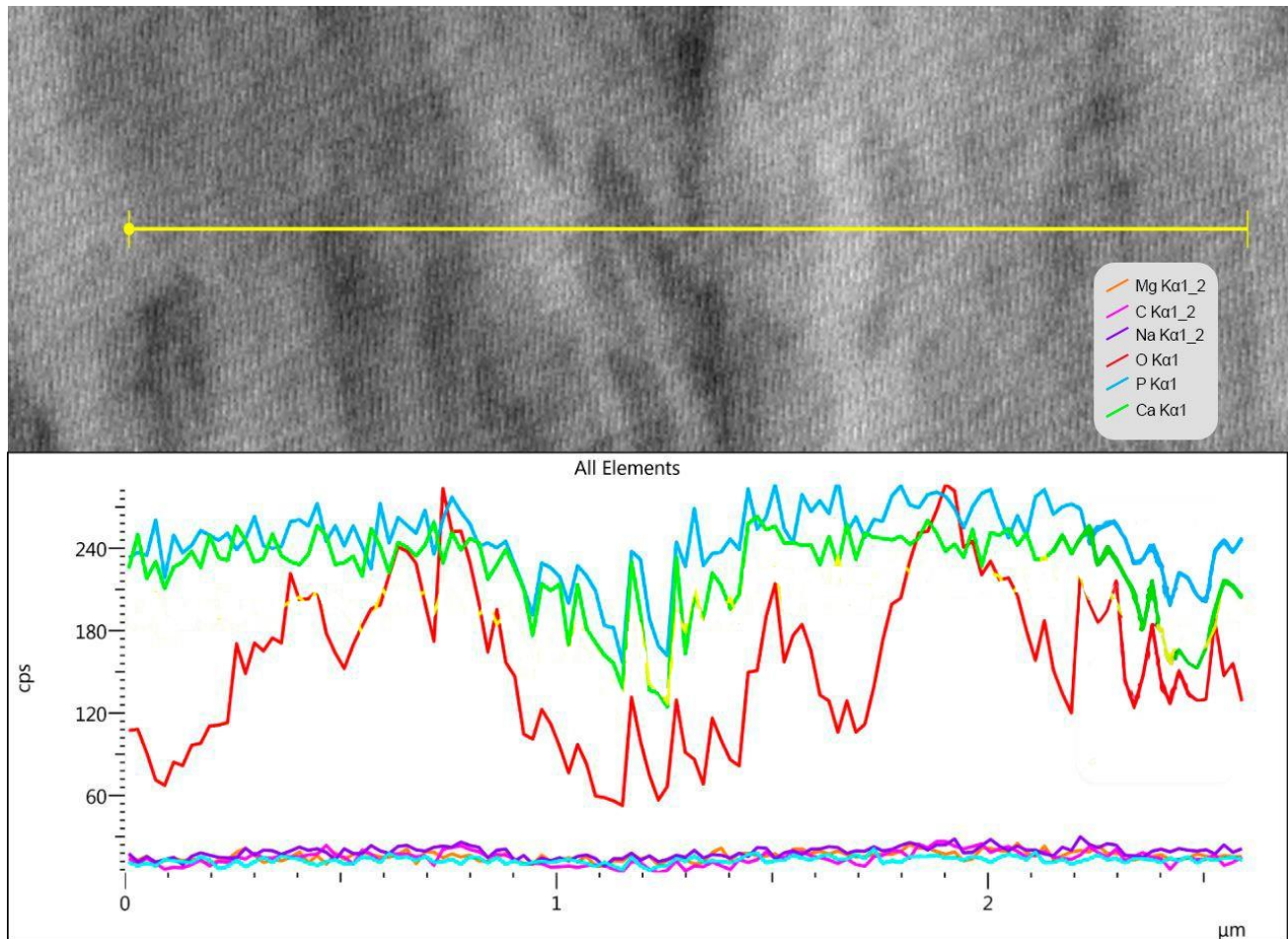


Figura IV.19. EDS-Lineal en la muestra longitudinal del esmalte dental humano. La longitud de la línea analizada es de 3 μm .

En la figura IV.21 se presentan los espectros EDS-Lineal en la muestra transversal del esmalte dental humano. En este caso la longitud de la línea analizada es de 5 micras. Nuevamente, en la figura IV.21 se observa que los elementos minoritarios como lo son (*Na*, *Mg*, *C*) se encuentran distribuidos en la parte inferior sin mostrar mucha variación, mientras que los elementos con mayor concentración (*Ca*, *P*, *O*) se localizan en la parte superior. El *Ca* y el *P* se mantienen prácticamente iguales. De la figura IV.21 también se observa que el elemento que presenta mayor variación con respecto a la posición es el *O* y que también presenta una depresión en el sitio de la interfase del prisma.

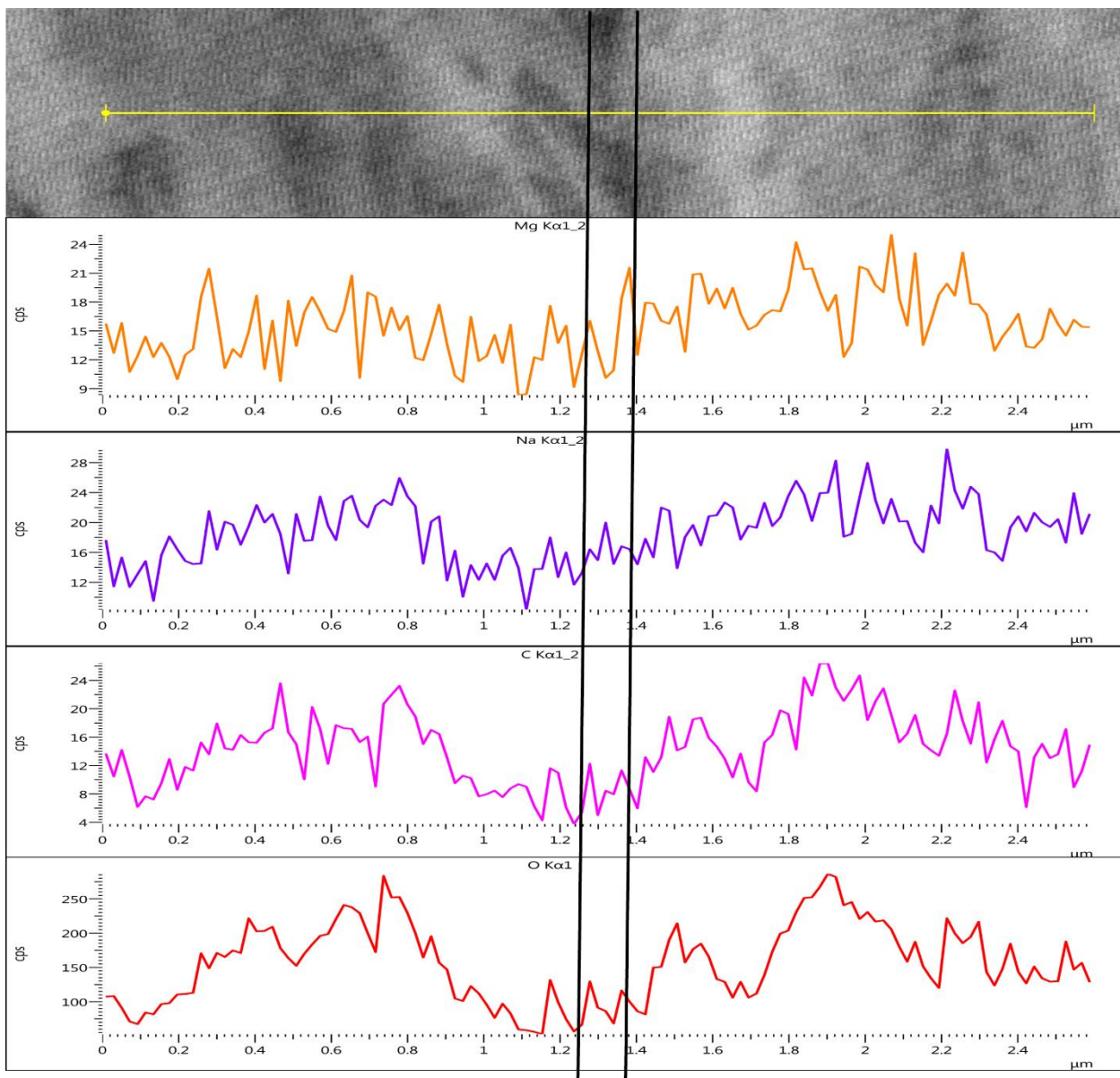


Figura IV.20 EDS-Lineal individual de los elementos registrados en la muestra longitudinal del esmalte dental humano.

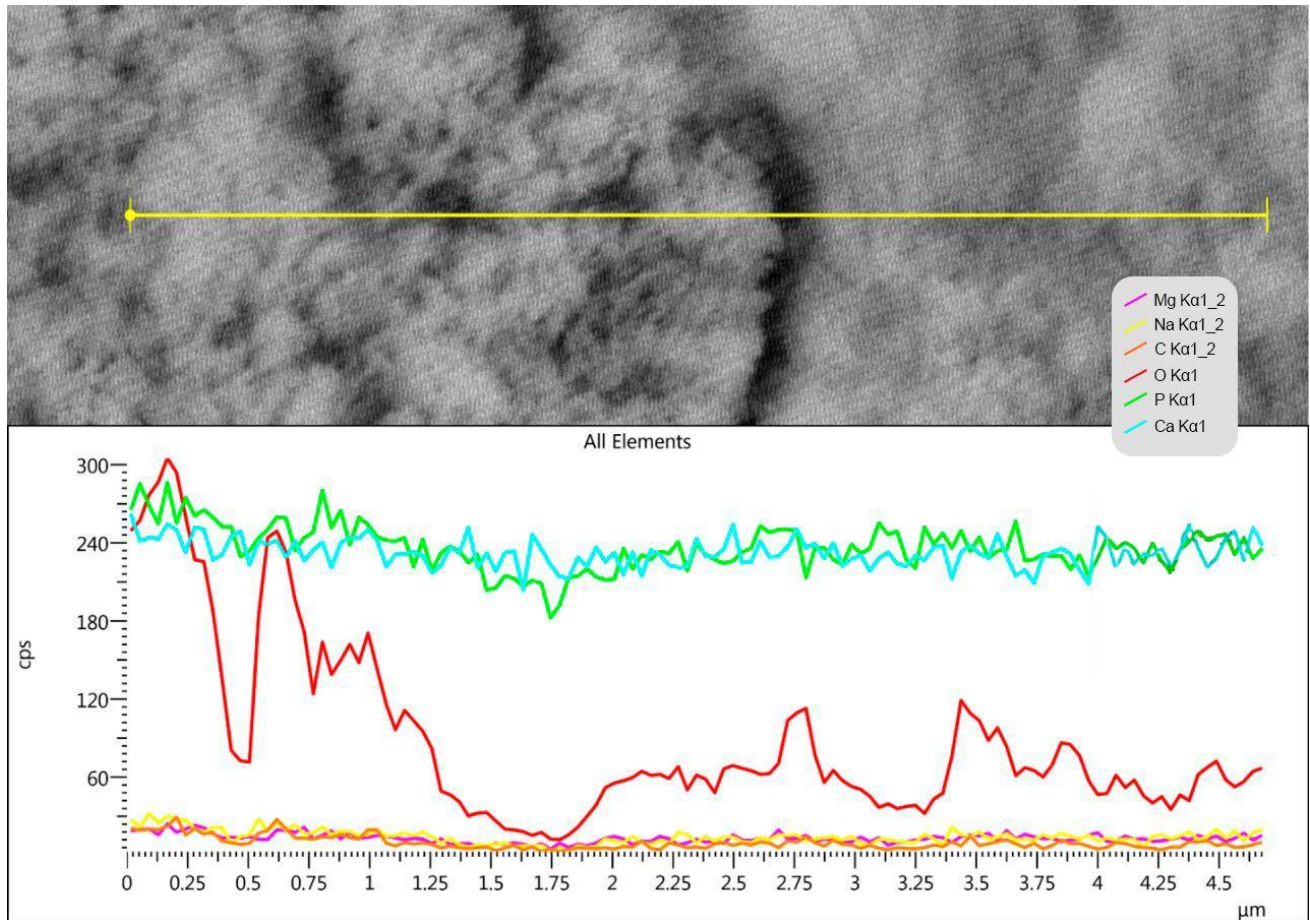


Figura IV.21. EDS-Lineal en la muestra transversal del esmalte dental humano. La longitud de la línea analizada es de 5 µm.

En la figura IV.22 se presentan los espectros de EDS-Lineal de manera individual de los elementos registrados en la muestra transversal del esmalte dental humano para una observación clara de la variación de los elementos. Es importante señalar nuevamente que se observa mucha variación debido a la topografía de la muestra en la región analizada y a la amplificación de la escala. Sin embargo, es posible observar que el elemento que más variación presenta es el oxígeno.

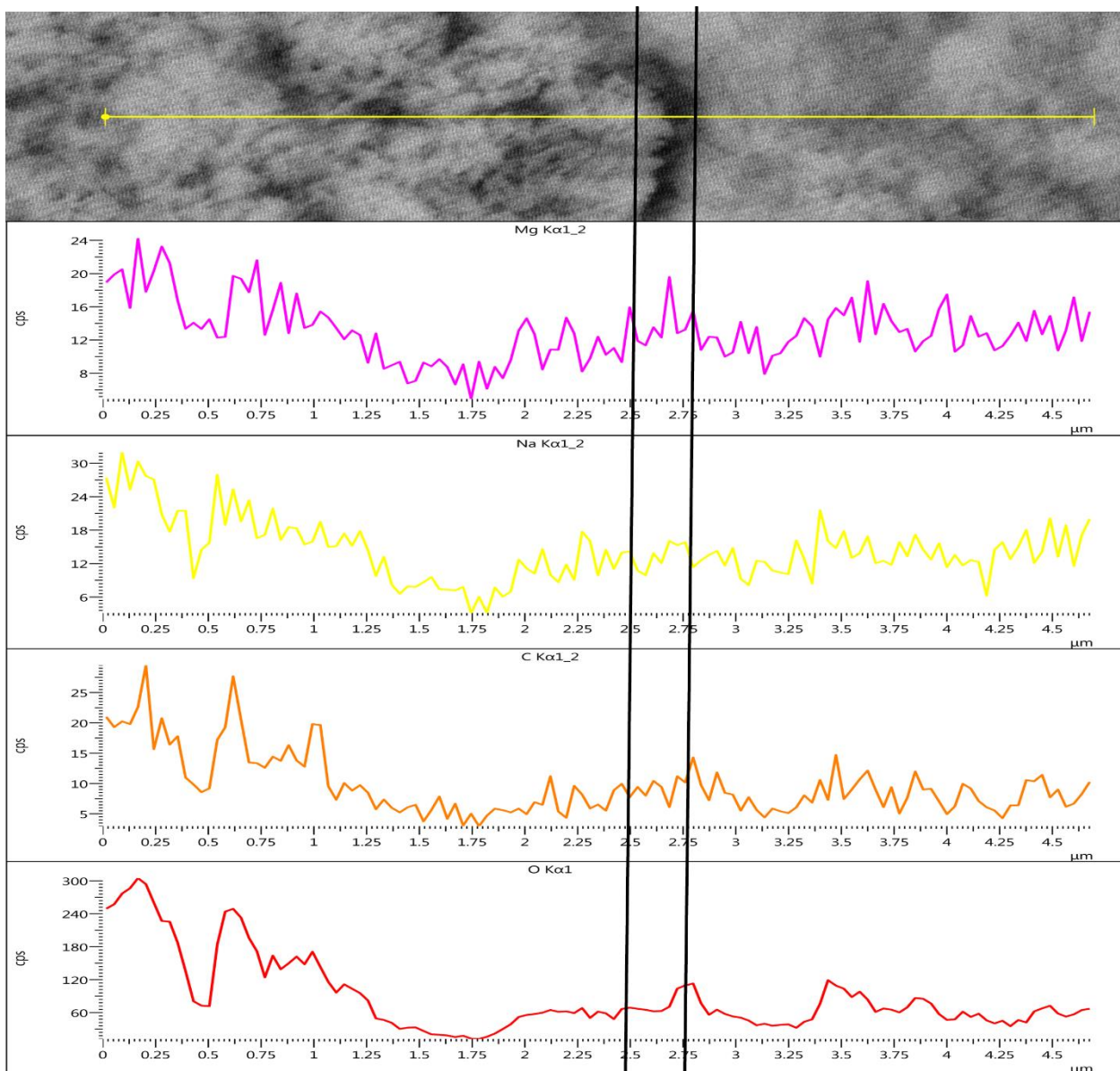


Figura IV.22. EDS-Lineal individual de los elementos registrados en la muestra transversal del esmalte dental humano.

IV.5 Mapeos Químicos Elementales en la muestra en polvo

Es esta sección presentaremos ahora el análisis químico obtenido por EDS en la muestra en polvo del esmalte dental humano.

Al realizar un análisis de la muestra en polvo del esmalte dental humano a ampliaciones de 45,000x se observa nuevamente la presencia de los elementos ya obtenidos (*Ca, P, C, Na, Mg*) distribuidos de manera homogénea en el grano de

polvo, tal como se presenta en la figura IV.24. A esta amplificación aún no es posible observar los granos individuales del esmalte dental. Al aumentar la amplificación, por ejemplo, a amplificaciones 85,000, si es posible observar un solo grano nanométrico de esmalte dental humano. El análisis de EDS indica que los elementos de Ca, O y C se localizan mayoritariamente en el prisma. En el caso del P y Mg prácticamente no se nota alguna diferencia, de tal manera que la presencia de estos dos elementos, son de manera homogénea. Cabe mencionar aquí que el realizar el estudio de EDS en las muestras en polvo no es posible realizar un estudio completo como en el caso de las muestras volumétricas analizadas en las secciones anteriores, al menos no con la resolución que presenta este equipo de SEM-EDS. Por lo tanto, si queremos analizar la distribución de los elementos dentro y en la interface de los cristales del esmalte dental humano, es necesario analizar muestras volumétricas las cuales presentan los cristales como sus interfaces o límites de cristal.

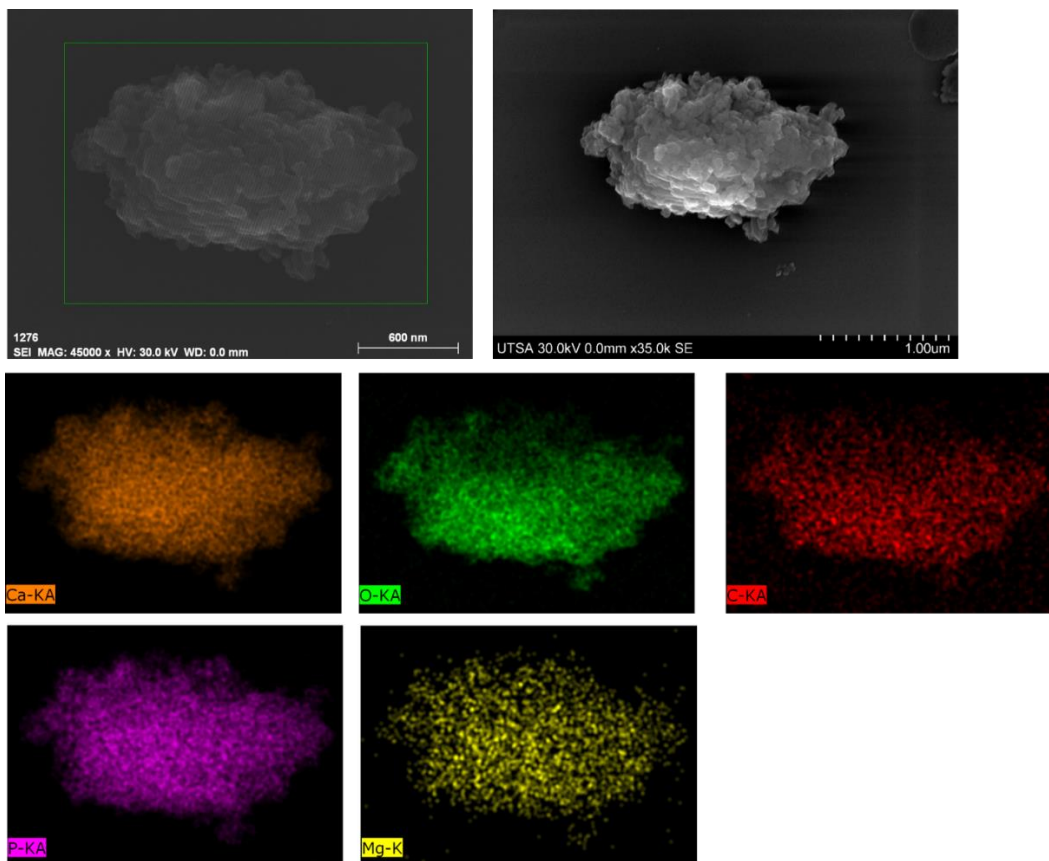


Figura IV.23 Mapeos químico elemental de EDS a 45,000x de la muestra en polvo del esmalte dental humano.

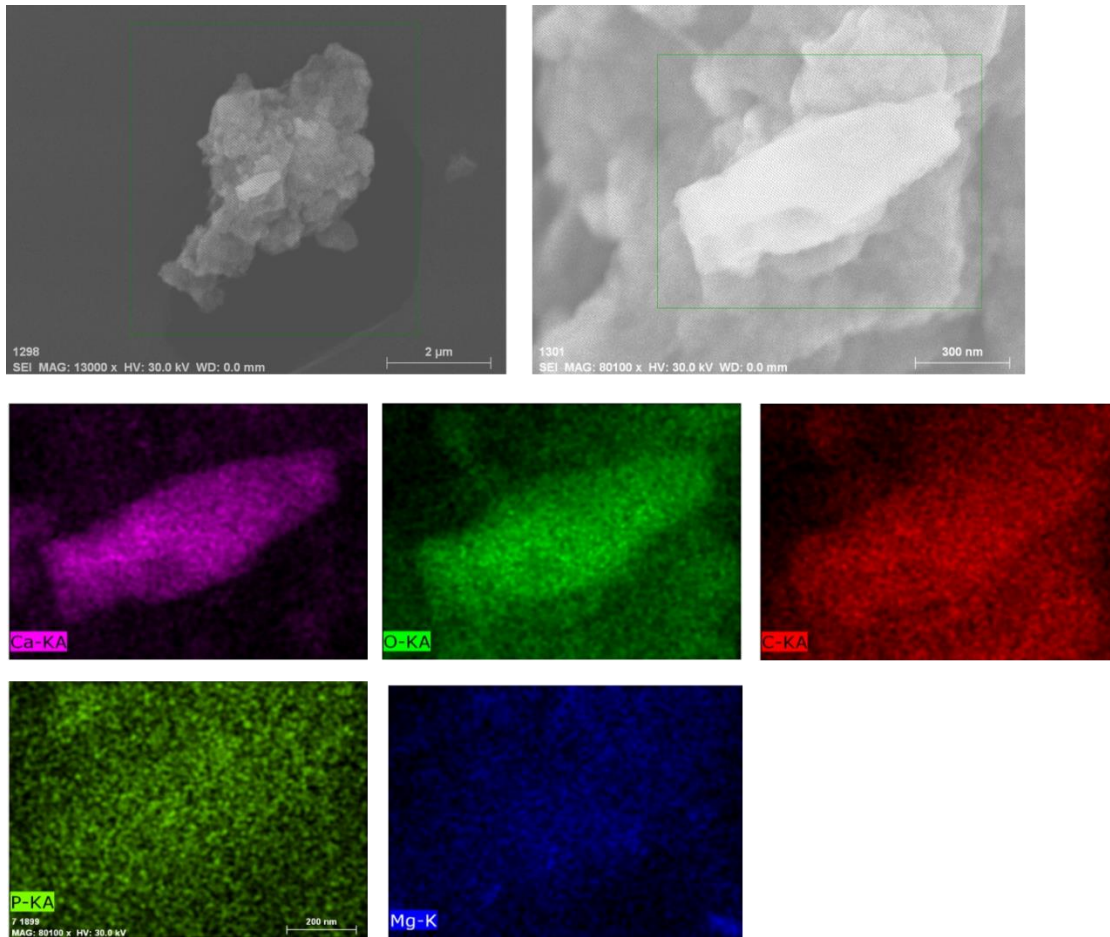


Figura IV.24 Mapeos químico elemental de EDS a 85,000x de la muestra en polvo del esmalte dental humano.

IV.6 EDS-Line Scan en los cristales del esmalte dental humano en una muestra transversal.

La figura IV.25 presenta las imágenes de SEM a amplificación de 100,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal y los espectros de EDS-Lineal a lo largo de un cristal nanométrico del esmalte. En este caso se presentan dos análisis lineales (EDS-lineal) a lo largo del rectángulo que se indica en ambas imágenes de SEM. La línea 1 pasa por el centro del cristal, mientras que la línea 2 pasa por un costado, pero ambas líneas realizan el análisis EDS dentro del cristal nanométrico del esmalte dental humano.

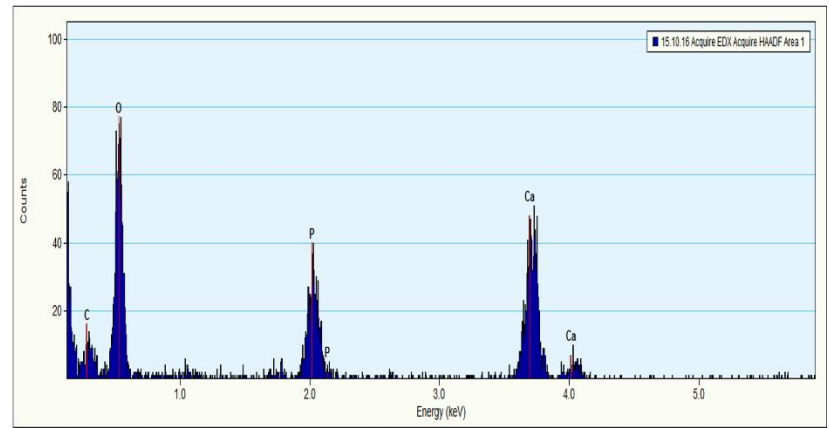
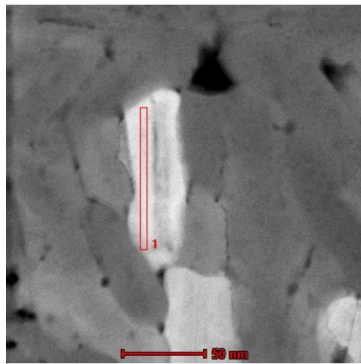
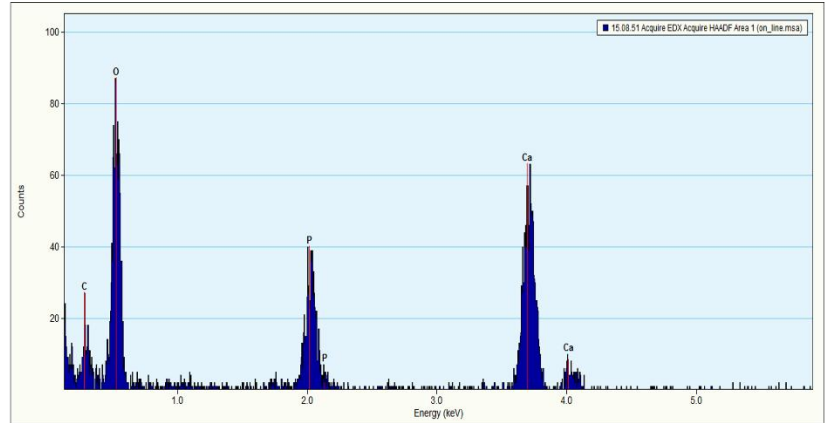
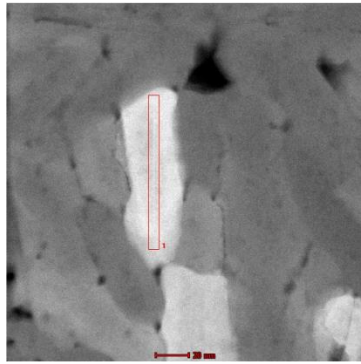


Figura IV.25 Imágenes de SEM a 100,000x de la muestra del esmalte dental humano en dirección transversal y los espectros de EDS-Lineal a lo largo del cristal del esmalte.

La tabla IV.7 presenta las concentraciones por elemento obtenidos del análisis de EDS a lo largo de las líneas 1 y 2 dentro de los cristales del esmalte dental humano correspondientes a la figura IV.26. Los elementos que se observan dentro del cristal nanométrico son únicamente los correspondientes a la hidroxiapatita, junto con el carbono. Por lo tanto, dentro del cristal nanométrico no se encontró *Na* ni *Mg*, probablemente, si existen, éstos se encuentran fuera del intervalo mínimo de detección del detector de EDS.

La tabla IV.8 presenta sólo las concentraciones de *Ca* y *P* obtenidos del análisis de EDS a lo largo de las líneas en el centro de algunos de los cristales del esmalte dental humano como los mostrados en la figura IV.25. Nótese que esta tabla indica que la relación *Ca/P* es en promedio de 1.4.

Elemento	Línea 1	Línea 2
Ca	33.70	40.67
P	24.07	31.28
O	39.47	25.16
C	2.76	2.89
Ca/P	1.4	1.3

Tabla IV.7. Concentraciones por elemento obtenidos del análisis de EDS en el modo lineal (EDS-lineal) a lo largo de las líneas 1 y 2 dentro de los cristales del esmalte dental humano correspondientes a la figura IV.26. Estos datos fueron obtenidos a ampliificaciones de 100,000x.

Mx=100,000 nanocristales figura IV.26				
#Cristal	#Línea	Concentración (at%)		Ca/P
		Ca	P	
Cristal 1	Línea 1	58.5	41.5	1.4
	Línea 2	56.4	43.6	1.3
Cristal 2	Línea 1	58.7	41.3	1.4
	Línea 2	55.1	44.9	1.2
Cristal 3	Línea 1	62.5	37.5	1.7
	Línea 2	60.7	39.3	1.5
Cristal 4	Línea 1	60.4	39.6	1.5
	Línea 2	55.5	44.5	1.2

Tabla IV.8. Concentraciones de *Ca* y *P* obtenidos del análisis de EDS en el modo puntual a lo largo de las líneas en el centro de los cristales del esmalte dental humano. Estos datos fueron obtenidos a ampliificaciones de 100,000x.

Referencias bibliográficas del capítulo IV

1. *D. Chernin and Y.Y. Lau, ed., Proc. of the First Int. Workshop on Crossed-Field Devices, August 15-16, 1995, Ann Arbor, Michigan.*
2. *Murata K (1976) Exit angle dependence of penetration depth of backscattered electrons in the scanning electron microscope. Phys Stat Sol (a) 36: 197-207.*
3. <https://www.globalsino.com/EM/page1853.html>

CAPÍTULO V. Discusión

En este capítulo se comentarán las implicaciones de los resultados obtenidos del análisis de las muestras de esmalte dental humano por las técnicas de difracción de rayos X, y por SEM y SEM-EDS. En las diferentes escalas analizadas se tiene el conocimiento de la estructura y composición química del esmalte. Recordemos que el prisma del esmalte dental tiene dimensiones de 5 μm en promedio y el grano o cristal del esmalte tiene dimensiones nanométricas.

A nivel milimétrico, representado por el difractograma de rayos X, no se observó la presencia de sodio ni de magnesio; solo se obtuvo la fase de la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). La razón Ca/P de la hidroxiapatita es $10/6 = 1.67$.

La Tabla V.1 presenta el resumen de resultados de SEM-EDS de las concentraciones de los elementos registrados, tanto en los prismas como en las interfaces de los prismas en el esmalte dental humano en las direcciones longitudinal y transversal y que fueron obtenidos a diferentes ampliaciones. Estos valores son los valores promedios presentados en las tablas del capítulo IV. La tabla V.1 también presenta el valor promedio y la desviación estándar de las concentraciones.

Un dato importante en el estudio de la composición química del esmalte y la dentina, es la relación que se obtiene entre el número de átomos de *Ca* con respecto al número de átomos de *P*, lo que se conoce como la relación *Ca/P*. Esta relación se obtiene observando que la celda unitaria de la HAP contiene 10 átomos de *Ca* y 6 átomos de *P* (lo cual se complementa con 26 átomos de *O* y 2 átomos de *H*). Entonces, el valor de la relación *Ca/P* para la HAP sintética es de 1.67 [1].

La tabla V.1 indica que en el esmalte dental humano el valor del cociente *Ca/P* tiene valores entre 2 y 2.4, es decir, se incrementa la concentración de *Ca* en relación con la concentración de *P*. Por lo tanto, esto implica una mayor concentración de *Ca* y/o una disminución en la concentración de *P*. Aunque es importante mencionar que los valores de la relación *Ca/P* de muestras naturales como el esmalte y la dentina depende de varios factores, siendo algunos de ellos la sustitución de los átomos de

Ca y P por átomos de Na, Cl y Mg su principal origen [2].

A

Elemento	Dirección Longitudinal							
	Interface				Prisma			
	2,000x	10,000x	20,000x	$\bar{X} \pm D.E.$	2,000x	10,000x	20,000x	$\bar{X} \pm D.E.$
Ca	55.46	38.99	52.86	49.10±8.85	35.72	34.22	35.91	35.28±0.93
P	22.90	19.92	23.92	22.25±2.08	17.82	17.18	17.62	17.54±0.33
O	19.87	37.95	21.57	26.46±9.98	41.80	41.46	42.30	41.85±0.42
C	1.29	2.10	1.04	1.48±0.55	3.56	3.42	3.33	3.44±0.12
Na	0.29	0.82	0.42	0.51±0.28	0.94	1.44	0.64	1.00±0.40
Mg	0.17	0.22	0.17	0.18±0.03	0.13	0.24	0.20	0.19±0.06
Ca/P	2.42	1.96	2.21	2.20±0.23	2.00	1.99	2.04	2.01±0.03

B

Elemento	Dirección Transversal							
	Interface				Prisma			
	2,000x	10,000x	20,000x	$\bar{X} \pm D.E.$	2,000x	10,000x	20,000x	$\bar{X} \pm D.E.$
Ca	45.44	43.27	50.81	46.51±3.88	59.55	51.04	39.31	49.97±10.16
P	20.17	19.55	22.10	20.61±1.33	24.86	22.27	18.48	21.87±3.21
O	31.30	34.11	24.75	30.05±4.80	14.30	24.14	37.91	25.45±11.86
C	2.35	2.42	1.62	2.13±0.44	0.64	1.93	3.46	2.01±1.41
Na	0.58	0.50	0.43	0.50±0.08	0.47	0.38	0.63	0.49±0.13
Mg	0.15	0.15	0.26	0.19±0.06	0.15	0.22	0.19	0.19±0.04
Ca/P	2.25	2.21	2.30	2.25±0.05	2.40	2.29	2.13	2.27±0.14

Tabla V.1. Resumen de resultados de SEM-EDS de las concentraciones de los elementos registrados en el esmalte dental humano a diferentes ampliaciones. Estos valores son los valores promedios presentados en las tablas del capítulo IV. La columna $\bar{X} \pm D.E.$ presenta el valor promedio y la desviación estándar de las concentraciones.

Como podemos también observar de la tabla V.1, a nivel milimétrico y micrométrico (2,000x-10,000x respectivamente) podemos indicar un comportamiento similar en la concentración de Ca (35 a 50%), P (17 a 23%), O (25 a 42%), C (2 a 3.5%), Na (0.49 a 0.51%), y Mg (0.18 a 0.19%). Es importante resaltar que la desviación estándar indicada en la Tabla V.1 se presenta mayor variación en la interface que en el prisma al ser analizados en dirección longitudinal, pero en la dirección transversal, la mayor variación se presenta en el prisma que en la interface. Esta variación puede ser

producto directo de la estructura del esmalte dental humano al ser analizado en estas direcciones.

También es necesario indicar que la variación de los elementos del esmalte dental humano es más fácilmente observable con el análisis EDS tipo lineal y en tipo imagen (mapeo químico) que en tipo puntual. De esta manera observamos que en la muestra longitudinal se observa mayor concentración de C y O en el centro del prisma que si observamos la muestra transversal, donde observamos mayor concentración de C y O pero ahora en la interface de los prismas. A mayor amplificación (20,000x) la mayor concentración de Na y Mg se encuentra en la interfaz de los prismas y también en la interface de los granos nanométricos.

El C y evidentemente el O sí se encuentran dentro del grano del esmalte dental, y por lo tanto dentro de la celda unitaria del esmalte dental. Basados en los estudios de difracción electrónica que se han realizado en los granos del esmalte dental humano [1, 4], la celda unitaria cristalográfica del esmalte debe ser muy parecida a la celda unitaria de la hidroxiapatita. Es decir, la celda unitaria del esmalte dental humano debe ser una estructura hexagonal, pero tiene que contener átomos de C, Na, y Mg. También es importante comentar que la distribución del Na, Mg y O se debe encontrar en la interfaz de los prismas e interface de los granos nanométricos, ya que estas interfaces contienen un mayor porcentaje de materia orgánica.

Si observamos la tabla IV.8 del capítulo IV nos indica que la relación Ca/P del cristal nanométrico del esmalte dental a 100,000 amplificaciones se encuentra entre 1.2 y 1.7, realizando un promedio nos da 1.4 ± 0.1 , lo cual quiere decir que ya no es una relación $Ca/P \geq 2$, como los obtenidos en la tabla V.1. En este caso la relación Ca/P está por debajo del de la HAP sintética que es 1.67. Por otro lado, si observamos la tabla IV.7 de la sección IV.6 del capítulo IV, las concentraciones de los elementos que se hallaron dentro del cristal (Ca, P, O, C) presentan una relación $Ca/P = 1.35$. Es decir, dentro del cristal nanométrico del esmalte dental humano se tiene una menor concentración de Ca que en la hidroxiapatita.

Comparando los resultados obtenidos con microscopia electrónica de barrido (SEM) en este trabajo de tesis con los resultados obtenidos con tomografía atómica por

Karen A. DeRocher, Paul J. M. Smeets (2020) [3] podemos observar primeramente una diferencia muy importante en la calidad de las imágenes obtenidas, principalmente en la observación de los prismas micrométricos del esmalte dental en la sección transversal, esto se puede atribuir a que estos autores de dicho artículo realizaron el ataque químico con ácido láctico para revelar la estructura. Los equipos utilizados para llevar a cabo el análisis fueron, SEM, espectroscopias correlativas y FIB (Focused ion beam), junto con STEM-ADF, Cryo-STEM-ADF. A grandes ampliaciones las imágenes obtenidas tanto en SEM como en STEM-ADF son excelentes, y esto se atribuye al equipo utilizado para la caracterización.

Con respecto a la composición química de los granos del esmalte dental humano, Karen A. DeRocher, Paul J. M. Smeets (2020) [3] mencionan la realización de un estudio de gradientes químicos (figura V.1.) en donde se hace una reconstrucción química en 3D de los granos nanométricos del esmalte dental fluorado, y en donde se puede observar la distribución de los elementos como *Na*, *Mg*, *F* y *C* en forma de carbonilo (*COH*). En la figura V.1. se observa que el *Mg* se encuentra distribuido principalmente en el interior de los granos del esmalte. Prácticamente no se encuentra en la interface, a diferencia del *Na* y del *F* que, aunque también se observan en el interior de los granos, se encuentran localizados principalmente en la interface. El carbono (*C*) se encuentra distribuido homogéneamente en el interior del grano del esmalte dental humano en forma de carbonilo.

El resultado más relevante del análisis realizado por Karen A. DeRocher, Paul J. M. Smeets (2020) [3], es que encontraron mayor concentración de *C* y *Mg* en el centro de los prismas, mientras que el *Na* y *F*, se encuentran mayoritariamente en la interfaz de los prismas. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis.

En la figura V.1 (e), tomada de la referencia [3], se presenta una gráfica sobre la concentración de cada elemento en (at%) en función del área analizada en (nm), donde ig significa interfase granular, co (core) hace referencia al núcleo de los cristales nanométricos, de tal forma que el *F* y *Na* se encuentran principalmente en la interfase y el *Mg* y *C* en el centro de los prismas.

Estos resultados reportados por Karen A. DeRocher y colegas, concuerdan con los resultados obtenidos en la sección IV.5 en donde se realizan line scan a cristales nanométricos en una muestra transversal, debido a que dicho análisis se realizó únicamente dentro del prisma y prácticamente no se registró *Na* ni *Mg*. Este resultado es porque el análisis realizado en la figura IV.26 es en transmisión, esto implica que la muestra fue muy pequeña y por lo tanto las concentraciones son muy pequeñas por ser tan delgada la muestra. En lo que coinciden ambos resultados reportados es en la presencia de Carbono dentro de los cristales nanométricos de esmalte dental humano.

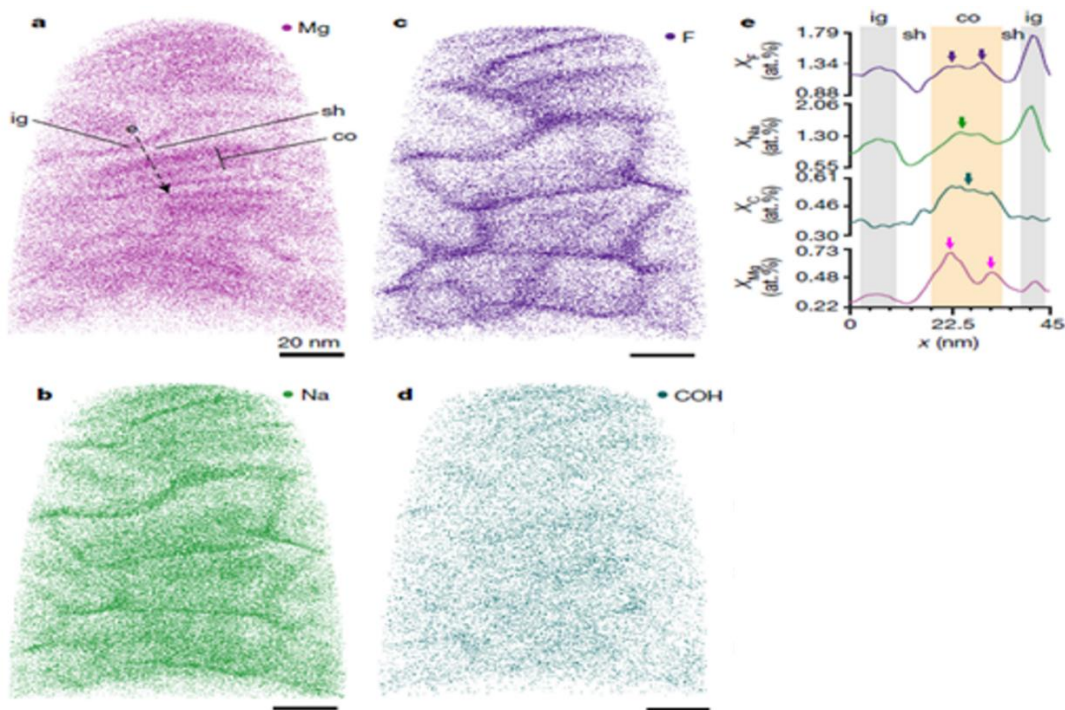


Figura V.1. Mapeos químicos obtenida por tomografía atómica en los granos nanométricos del esmalte dental humano fluorado. a) *Mg* en magenta, b) *Na* en verde, c) *F* en púrpura, d) *C* en forma de carbonilo (*COH*) en verde azulado. Las barras de escala, 20 nm. Hay que en cuenta que la fluoración aumenta la concentración de *Na* y *F* en la interfaz intergranular (barras grises ig) frente al sitio central (barras naranjas). Imagen tomada la referencia [3]

Referencias bibliográficas del capítulo V

1. Reyes-Gasga, Jose. (2001). ESTUDIO DEL ESMALTE DENTAL HUMANO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y TÉCNICAS AFINES. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*. 21. 81-85. 10.29057/icbi.v9iEspecial2.7655.
2. LeGeros, R. Z., (1991). *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*. Basel: S. Karger, AG. ISBN: 978-3-8055-5236-3. DOI: 10.1159/isbn.978-3-318-04021-0.
3. DeRocher, K.A., Smeets, P.J.M., Goodge, B.H. et al. *Chemical gradients in human enamel crystallites*. *Nature* 583, 66–71 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2433-3>
4. Reyes-Gasga, J., (2013). Observación del esmalte dental humano con microscopía electrónica. *Revista Tamé de la Universidad Autónoma de Nayarit*. 1, 90-96. ISSN: 2007-462X.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados y la discusión realizada en este trabajo se presentan las siguientes conclusiones.

No se presentó separación de fases en el proceso de centrifugación.

A nivel milimétrico:

La difracción de rayos X indicó la presencia de HAP hexagonal, pero no la presencia de *Na*, *Mg*, *C*.

Tanto en la muestra en dirección longitudinal como en la muestra en dirección transversal, se observó una mayor concentración de *O*, *C*, *Na* en el centro del prisma. Los elementos *Mg*, *P*, *Ca* se encontraron distribuidos de manera homogénea.

A nivel micrométrico

En la muestra en la dirección longitudinal se observó una mayor concentración de *O* y *C* en el centro del prisma de los elementos. En la muestra en dirección transversal se observó una mayor concentración de *O* y *C* en la interfase del prisma. Los elementos *Mg*, *P*, *Na*, *Ca* se encontraron distribuidos de manera homogénea en ambos tipos de muestras.

A nivel nanométrico:

Tanto en la muestra en la dirección longitudinal como en la muestra en la dirección transversal, se observó mayor concentración de *O* y *C* en el centro del prisma de los elementos. Los elementos *Mg*, *P*, *Na*, *Ca* se encontraron distribuidos de manera homogénea en ambos tipos de muestras.

En el cristal nanométrico del esmalte dental humano:

Se registró mayor concentración de los elementos presentes en el grano nanométrico fueron los correspondientes a la hidroxiapatita (*Ca*, *P*, *O*) y adicionalmente el *C*. No se registró la presencia de los elementos *Mg* y *Na*.

Esto nos permite concluir que a grandes ampliaciones la concentración de sodio y magnesio están presentes no solamente en la interfase de los prismas, sino también en la interfase de los granos nanométricos del esmalte dental humano. Por otra parte, el carbono, además de estar presente en la interfase de los prismas, si se encuentra presente dentro de los granos nanométricos. En el caso del oxígeno, su distribución se encuentra mayoritariamente dentro de los prismas y de los granos nanométricos del esmalte dental humano.

Por lo tanto, de acuerdo con los resultados de rayos X, la celda unitaria del esmalte dental es muy parecida a la celda unitaria de la hidroxiapatita, por lo que debe ser una celda hexagonal, y se propone la posibilidad de que pueda contener carbono dentro de dicha celda, lo concuerda con lo reportado en la literatura.