

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN**



**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y QUÍMICA Y  
COMPORTAMIENTO TÉRMICO DE LA HIDAROXIAPATITA DE  
ESMALTE Y DENTINA CARIADOS**

---

**Tesis que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias**

**Presenta:**

**M. en C. Gaby E. Tiznado Orozco**

Director de Tesis: Dr. José Reyes Gasga

México, D.F. Octubre del 2010.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## *Agradecimientos*

*A mi director de tesis Dr. José Reyes Gasga, por su compromiso en este trabajo.*

*Agradezco sincera y profundamente la ayuda recibida de los técnicos: Pedro Mexía Hernández, Manuel Aguilar Franco, Antonio Gómez Cortés, Pedro W, J. Ocotlán Flores Flores, Samuel Tehuacanero Nuñez, Roberto Hernández Reyes, Jacqueline Cañetas, Diego.*

*A los miembros de las comisiones evaluadoras: Dr. Luis Gaitan, Dr. L. Felipe Jiménez, Dr. Miguel Araiza, Dr. Barceló Santana, Dra. Elba R. Leyva, Dra. Sandra Rodil, Dr. Jesús Arenas, Dr. Lauro Bucio. Por sus valiosas aportaciones para mejorar este trabajo.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México: Instituto de Física, Facultad de Odontología, Beca DGEP.*

*A la Universidad Autónoma de Nayarit*

*Agradezco a mis compañeros y amigos por su ayuda siempre y por esos excelentes momentos.*

*Por último, más no el menos importante a mi familia por su siempre incondicional apoyo.*

---

## ABREVIATURAS

<b>XRD</b>	Difracción de Rayos X
<b>EDS</b>	Espectroscopía de Energía Dispersa de Rayos X característicos
<b>SEM</b>	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>TEM</b>	Microscopía Electrónica de Transmisión
<b>HRTEM</b>	Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución
<b>STEM</b>	Microscopía Electrónica de Barrido y Transmisión
<b>ES</b>	Esmalte Sano
<b>EA</b>	Esmalte Afectado
<b>DS</b>	Dentina Sana
<b>DA</b>	Dentina Afectada
<b>HAP</b>	Hidroxiapatita
<b>HAPs</b>	Hidroxiapatita sintética
<b>TGA</b>	Termogravimetría
<b>FTIR</b>	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
<b><math>\beta</math>-TCP</b>	Fosfato beta tricálcico- (Whitlockita)

---

---

## ÍNDICE

<b>RESÚMEN</b>	.....	V
<b>ABSTRACT</b>	.....	VI
<b>INTRODUCCIÓN</b>	.....	1
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	.....	4
<b>HIPÓTESIS</b>	.....	5
<b>OBJETIVOS</b>	.....	5
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	.....	6
<b>1. ANTECEDENTES</b>	.....	7
1.1 Diagnostico de la Caries	.....	8
1.1.1 Detectores de caries	.....	10
1.2 Proceso de Caries	.....	11
1.2.1 Caries en el esmalte	.....	13
1.2.2 Caries en la dentina	.....	15
1.3 Estructura y Composición del Esmalte	.....	15
1.4 Estructura y Composición de la Dentina	.....	16
1.5 Hidroxiapatita	.....	17
<b>2. TECNICAS DE CARACTERIZACIÓN</b>	.....	19
2.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	.....	20
2.2 Difracción de Rayos X (XRD)	.....	21
2.2.1 Refinamiento Rietveld	.....	21
2.3 Espectroscopia de Energía Dispersa de Rayos X		
Característicos (EDS)	.....	22
2.4 Análisis Termogravimétrico (TGA)	.....	23

---

2.5 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	24
<b>3 METODOLOGÍA.....</b>	<b>26</b>
3.1 Criterios de inclusión	27
3.1.1 Criterios de exclusión	27
3.1.2 Criterios de eliminación	27
3.2 Procedimiento Experimental	28
3.2.1 Preparación de muestras en polvo	28
3.2.2 Tratamiento térmico	30
3.2.3 Análisis químico de las muestras	32
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>36</b>
4.1 Microscopia Óptica (MO)	37
4.2 Información Química y Estructura	38
4.2.1 EDS	38
4.2.2 XRD	39
4.2.3 FTIR	40
4.3 Información Térmica	41
4.3.1 EDS	43
4.3.2 TGA	43
4.3.3 XRD	43
4.3.4 FTIR	45
4.4 Variaciones de los Parámetros De Red	48
4.5 TEM	50
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>54</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>64</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>74</b>

---

---

## RESÚMEN

La caries es una enfermedad muy particular de los tejidos dentales que aparece cuando la presencia de ciertos microorganismos y sus productos metabólicos ácidos disminuyen el pH del microambiente. Inicia como una lesión erosiva de la superficie dental, la cual progresa como un proceso de disolución. En la actualidad los criterios más empleados para el diagnóstico de la caries son los métodos convencionales: visual y táctil, lo cual sigue generando controversia respecto hasta donde extenderse en el momento de hacer una preparación cavitaria.

En el presente trabajo de tesis se estudian las características estructurales y químicas de los polvos de esmalte y dentina de dientes humanos afectados por la caries; se analiza además, el comportamiento térmico de los polvos al ser calentados partiendo de temperatura ambiente hasta 500 °C. Específicamente se desea conocer si las zonas pigmentadas en esmalte y dentina de dientes afectados por una lesión de caries tienen una estructura y composición química diferentes a las zonas correspondientes en un diente sano. Contribuyendo junto con diferentes técnicas de diagnóstico a ser menos invasivo durante la rehabilitación dental.

Se usaron dientes sanos y cariados de personas entre 20 y 37 años de edad los cuales fueron extraídos por razones de tratamiento periodontales y ortodónticos. Las características estructurales y químicas de estos materiales son analizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía por energía dispersa de rayos X característicos (EDS) y difracción de rayos X (XRD). El comportamiento térmico es analizado por la técnica del análisis térmico diferencial (TGA) y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

---

Los resultados muestran diferencias entre los materiales afectados y los materiales sanos, los cuales son más marcados en la dentina. Estas diferencias corresponden a tamaño de cristal y en la cantidad de agua y material orgánico presente. Los resultados por TEM demostraron la disolución parcial de cristales de hidroxiapatita (HAP) con sustituciones de Na, Mg, Cl y C. Variaciones en forma e intensidad se observan en las bandas de FTIR correspondientes a  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ .



---

## ABSTRACT

Caries is a disease of the dental tissues when microorganisms affect them. It starts as a surface-erosion lesion and then, as demineralization progresses, develops into subsurface lesions, but it always requires the establishment of the necessary physicochemical conditions for mineral dissolution. The demineralization of human tooth is mainly caused by exposure to acidic produced by bacteria. Today, visual (color) and tactile (hardness) have been used criteria for the clinical assessment of caries.

In this work, we analyze the structural and chemical characteristics as well as the thermal behavior of carious affected (stained) areas of both enamel (powder coming from both the dark and translucent zones) and dentine (powder coming from both the inner and affected zone) and compared against those from sound (healthy) teeth. Structural and chemical analyses were performed using x-ray diffraction (XRD), energy-dispersive x-ray spectroscopy (EDS), TEM, thermogravimetric analysis (TGA) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Thermal analysis was carried out by thermogravimetric analysis, Fourier transform infrared spectroscopy and x-ray diffraction. The analysis was performed using x-ray diffraction (XRD), energy-dispersive x-ray spectroscopy (EDS), TEM, thermogravimetric analysis (TGA) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

The analysis carried out in this work for powders indicated important differences among them and with powders from the sound dental material. These differences correspond to the crystal size and the presence of organic material and water. The sound enamel contains more water and more organic materials. In contrast, water and organic material are less than expected in the case of carious dentine because of the removal of the body of the lesion from the sample. Results also demonstrate partially dissolved crystals of hydroxyapatite (HAP) with substitutions of Na, Mg, Cl

---

and C, and a greater weight loss in carious dentine as compared with carious enamel. A greater amount of thermal decomposition is observed in carious dentine as compared with sound dentine, with major variations in the *a*-axis of the HAP unit cell than in the *c*-axis. Variations in shape and intensity of the OH<sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> FTIR bands were also found.

# INTRODUCCIÓN

La caries es una de las enfermedades más comunes que afecta al hombre. No es una afección mortal pero puede, sin embargo, causar episodios de dolor, estrés, y, además, la posible pérdida de la estructura dental. Esta pérdida puede ser limitada a una porción del diente o llegar a comprometer la vitalidad dental, terminando en procesos más complicados. La caries ha sido investigada con el objetivo de comprender y en consecuencia abordar el problema de salud pública que conlleva. No obstante que en todos estos años de investigación sobre el proceso de caries se ha generado una gran cantidad de información, la caries es un tema que continúa generando interés y controversia debido en gran parte a las características propias del diente.

Se puede definir a la caries como una patología compleja, la que una vez establecida en el diente generará cambios en la estructura dental. Estos cambios van desde efectos microscópicos hasta la destrucción macroscópica localizada de los tejidos dentales, los cuales son susceptibles a la acción de ácidos producidos por la fermentación bacteriana de los carbohidratos. Los ácidos producidos causan una disminución del pH de manera local por debajo de un valor crítico en el cual la hidroxiapatita (HAP) comienza a desmineralizarse y, por lo tanto, se presenta una difusión de iones hacia fuera de la muestra. Si estas condiciones perduran, eventualmente se forma una cavitación. No obstante las diferentes clasificaciones que hay del proceso de caries (caries de puntos y fisuras, caries de superficies lisas; caries rampante, de biberón, entre otras.) se considera que el mecanismo del proceso es similar en todos los tipos de caries.

Una vez establecida la lesión, el único tratamiento es restaurativo mutilatorio, lo que implica sustituir el tejido perdido con algún material de restauración. En los últimos años la odontología de mínima invasión, cuya filosofía es eliminar la menor cantidad de tejido sin comprometer el éxito de la rehabilitación, está ganando terreno. Un aspecto fundamental para el éxito terapéutico de la odontología de

mínima invasión es el diagnóstico preciso. En las últimas décadas se han desarrollado varios métodos de diagnóstico para la detección de la caries dental como son la trans-iluminación con fibra óptica, medición de la conductividad eléctrica y los métodos con láser fluorescente.

Otra herramienta en el diagnóstico de la caries es el uso de detectores de caries cuyo objetivo es diferenciar mediante una tinción entre la dentina infectada externa y la dentina afectada interna al momento de hacer la preparación cavitaria. El uso de estos detectores permite reducir el riesgo de eliminar innecesariamente tejido dental sano. No obstante, recientemente se ha puesto en duda la especificidad de éstos, considerando que en realidad se está eliminando tejido dentinario que puede ser conservado.

En la actualidad los criterios más empleados en el diagnóstico de la caries corresponde a los métodos convencionales: el visual y el táctil, lo cual sigue generando controversia respecto hasta donde extenderse en la eliminación de tejido dental en el momento de hacer una preparación cavitaria.

Lo anterior llevó a las siguientes preguntas de investigación:

- **¿Cuáles son las diferencias estructurales y de composición química del esmalte y dentina afectados por una lesión cariosa con respecto a los tejidos sanos?**
- **¿De qué manera las diferencias existentes contribuyen al diagnóstico en la práctica clínica de mínima invasión?**

Por lo anterior, nuestro objetivo principal en el presente trabajo es el conocer si la hidroxiapatita presente en las zonas pigmentadas del esmalte y dentina como consecuencia de la lesión cariosa presenta algún cambio en estructura y composición con respecto a la hidroxiapatita presente en las zonas correspondientes en un diente sano.

El procedimiento experimental seguido implicó el uso de molares y premolares con lesiones cariosas obtenidos de diferentes individuos; en cada uno de ellos se llevó

## Introducción

---

a cabo la remoción de tejido reblandecido presente en la cavidad, de manera similar a lo realizado en la clínica. Este material reblandecido corresponde a lo denominado en la literatura como dentina cariada externa, misma que al ser removida deja expuesta la dentina cariada interna. La dentina cariada interna adquiere una pigmentación generada por la presencia de melanoidina como consecuencia de la lesión cariosa. En nuestro caso, para analizar la hidroxiapatita contenida en la región pigmentada y eliminar los residuos de material orgánico fue necesario separar esta zona del resto de la estructura dental para posteriormente darle un tratamiento térmico. La información sobre la estructura de la hidroxiapatita se obtuvo usando técnicas tales como microscopía electrónica de transmisión, difracción de rayos X (XRD) y espectroscopia infrarroja (FTIR), la cual también nos da información química de la muestra. También se usó la técnica de espectroscopia de energía dispersa de rayos X característicos (EDS) para la obtención de información química de estos materiales. El comportamiento térmico fue analizado usando técnicas de FTIR, Termo-gravimetría (TGA) y XRD.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican claras diferencias asociadas a la cantidad de material orgánico y agua en cada muestra. Las diferencias encontradas en el material inorgánico fueron el tamaño de cristal, las variaciones en los parámetros de red generadas por difusión de iones presentes, además de las variaciones en la proporción de los elementos que componen cada una de las muestras. Estos resultados nos permiten resaltar la importancia de los criterios que deben de tomarse en cuenta durante la rehabilitación de los dientes lesionados en las diferentes etapas del procedimiento clínico, como lo son la preparación de cavidades, y rehabilitación del diente con materiales adhesivos.

En el futuro será conveniente diseñar compuestos que en su formulación contengan iones que influyan de manera conveniente en los parámetros de red y con ello se obtengan mejores resultados. También será necesario hacer formulaciones con iones específicos que sean capaces de formar cristales de hidroxiapatita, y de esta manera regenerar el diente.

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la actualidad, a pesar de los diferentes métodos auxiliares de diagnóstico del proceso de caries existentes, los más utilizados siguen siendo el método visual y táctil. Nos guiamos en las diferencias de color presentes en el esmalte y en la dentina afectada para determinar hasta donde es conveniente extender la preparación.

Anteriormente se difundió el uso de soluciones pigmentantes o detectoras de caries, las cuales permitían diferenciar entre una dentina cuya matriz orgánica estaba degradada, incapaz de formar cristales de hidroxiapatita (HAP), y una dentina cuya matriz orgánica conservaba sus propiedades. No obstante estudios recientes indican que los detectores de caries no son lo suficiente sensibles y/o específicos [1- 4] para indicar que tan invasivos podemos ser al eliminar tejido afectado.

Debido a la importancia en la odontología actual a ser lo mínimamente invasiva durante la preparación de cavidades y rehabilitación del órgano dental afectado por una lesión cariosa, éste trabajo tiene como meta el establecer si existen diferencias estructurales y químicas entre los tejidos sanos y aquellos que han sido afectados por caries, específicamente delimitándose a analizar la zona pigmentada del esmalte y dentina como consecuencia de la lesión incipiente (en el caso del esmalte) o ya establecida (esmalte y dentina).

La pregunta a la que se pretende dar respuesta en este trabajo es hasta qué punto el material inorgánico presente en la zona afectada por la lesión cariosa es similar o diferente al material inorgánico que se encuentra en el tejido sano.

### **HIPÓTESIS**

El material inorgánico que conforma las zonas pigmentadas afectadas por la lesión cariosa del tejido dental humano presenta características estructurales y químicas diferentes al material inorgánico de las zonas sanas y estas diferencias se ven reflejadas en el comportamiento térmico que presentan cuando estos materiales se someten a un proceso de calentamiento.

### **OBJETIVOS**

#### **General:**

Analizar las diferencias estructurales y químicas de los polvos obtenidos de zonas afectadas por caries del esmalte y de la dentina de la pieza dental humana y su respuesta al tratamiento térmico.

#### **Específicos:**

- Caracterización estructural y química de los polvos de esmalte y dentina tanto sano como cariado.
- Identificación de los elementos sustitucionales que existan en la hidroxiapatita del diente como consecuencia del proceso de caries.
- Identificar las diferencias del comportamiento térmico de la hidroxiapatita del diente cariado y del diente sano.

### **JUSTIFICACIÓN**

La caries dental sigue siendo la patología más frecuente en la consulta odontológica [5]. Actualmente el único tratamiento clínico que se realiza una vez establecida la lesión es la eliminación del material dañado y sustitución con materiales dentales de restauración. Desarrollar métodos de diagnóstico así como técnicas restaurativas que nos permitan ser conservadores en la rehabilitación de dientes con una lesión cariosa siguen siendo temas de interés a investigar.

Cuando la caries se establece en los dientes se da de manera alterna un proceso de desmineralización y remineralización, lo que ocasiona pérdida y/o sustituciones de iones dentro de la estructura del esmalte y dentina, y lo cual puede también generar diferencias estructurales y químicas entre un diente que ha sido afectado por caries y uno que no lo está.

Una forma indirecta de analizar las diferencias estructurales y químicas que presenta el material inorgánico de las zonas afectadas con caries con respecto al material inorgánico de las zonas sanas, es el observar su comportamiento bajo la variación de ciertos parámetros. El parámetro que hemos escogido en este trabajo es la temperatura. De esta manera el someter el material cariado y el material sano a un tratamiento térmico nos permitirá deducir y estudiar sus similitudes o diferencias, y correlacionar esta respuesta a sus características estructurales y químicas.

La información generada contribuirá a futuras investigaciones en el área de biomateriales e ingeniería biomédica en donde se comienza a tener interés en desarrollar métodos que permitan construir estructuras similares a los prismas del esmalte directamente sobre la superficie dental [6-7].



# **CAPÍTULO 1**

## **ANTECEDENTES**

La propuesta en el ICW-CCT (International Consensus Workshop on Caries Clinical Trials) en 2004 define a la caries dental como un proceso que envuelve un desbalance de las interacciones moleculares normales entre la superficie y la sub-superficie dentales y la bio-película microbiana adyacente [8]. En el afán de actualizar y unificar terminología definen los siguientes términos:

Proceso de Caries ocurre como una interacción entre la bio-película y la superficie y subsuperficie dental.

Lesión de caries es la manifestación del estado del proceso en un tiempo determinado.

Progresión de la caries se da cuando el equilibrio entre desmineralización y remineralización se pierde, permitiendo una pérdida de minerales [8].

### **1.1 Diagnóstico de la caries:**

Para la odontología de invasión mínima (odontología conservadora) el objetivo principal es la máxima preservación de tejido dental durante los procedimientos de preparación de la cavidad y su restauración. El concepto abarca tanto los procedimientos de tratamiento como el diagnóstico precoz de la enfermedad, riesgos y síntomas asociados, requisito ineludible este último para que el tratamiento final produzca una invasión mínima y, en consecuencia, el mínimo trauma al paciente. Para lograr un diagnóstico temprano se han venido desarrollando algunas técnicas para el diagnóstico de la caries como la transiluminación con fibra óptica, la medición de conductividad eléctrica y los métodos de láser fluorescente [9]. No obstante, los métodos más utilizados por el odontólogo continúan siendo la inspección visual, la exploración táctil (explorador) y los métodos radiográficos [2, 9]. Los criterios de diagnóstico a considerar en el método visual son: la pérdida de la translucidez, opacidad, cambio de color hacia

amarillo-marrón presente en esmalte y dentina y, finalmente la formación de cavidad [10-13].

La última contribución al criterio visual de diagnóstico para la caries lo representa el International Caries Detection and Assessment Criteria (ICDAS), el cual es designado como método visual para la detección de la caries en fase tan temprana como sea posible por medio de criterios de diagnóstico visuales estandarizados. Algunos de los criterios que se consideran incluyen el color de las piezas dentales, la apariencia sin brillo y opacidad, el aspecto blanco, marrón o ennegrecido de algunas lesiones (figura1). Este índice ha demostrado ser satisfactoriamente sensible y específico tomando en cuenta que un método de diagnóstico ideal es aquel que posee tal exactitud que sea capaz de detectar la presencia de la enfermedad en todos los casos (100% sensibilidad) y la ausencia de la misma en la totalidad de los casos (100% especificidad) [8].

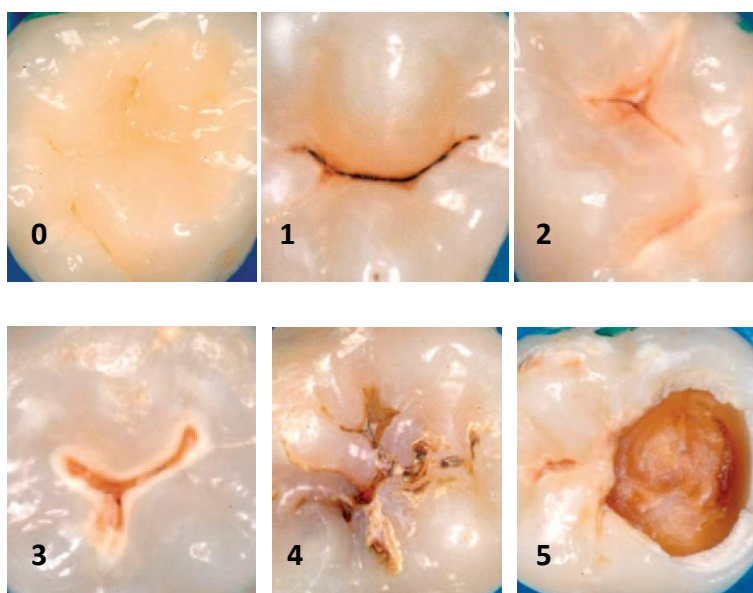


Figura1. Imágenes de lesiones cariosas en las que se muestran los criterios visuales ICDAS sobre la caries. Permite al dentista numerar gradualmente el estadio de salud dental estableciendo una escala del 0 (diente sano) hasta el 6 (cavitación extensiva).

Al momento de restaurar al diente y hacer preparaciones de cavidades utilizando los métodos convencionales anteriormente descritos, es importante que los clínicos se apoyen de diversas herramientas que le permitan discernir entre el tejido que debe ser conservado o cual se debe retirar. Un ejemplo son los detectores de caries los cuales se introdujeron en el mercado hace 30 años aproximadamente. A lo largo del tiempo han tenido modificaciones en su fórmula para hacerlos inocuos al organismo [8].

### 1.1.1 Detectores de caries

El principal objetivo en el tratamiento de la caries es la remoción del tejido infectado evitando eliminar tejido sano y tratando de mantener la vitalidad pulpar. Los detectores de caries se introdujeron con el fin de eliminar tejido sano pero a la vez impedir que quedara dentina infectada ya que, de ser así, seguiría progresando la lesión (figura 2).

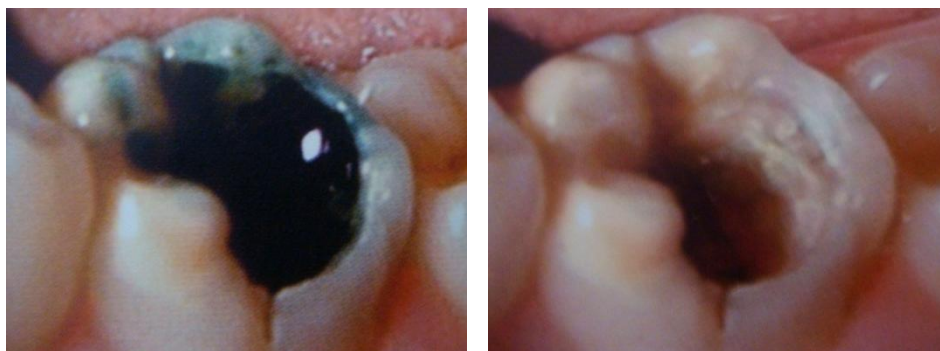


Figura 2. Imagen por microscopía de luz que muestra un primer molar inferior con una cavitación por caries. En A) se nota el color oscuro del detector de caries. En B) la cavidad ya está limpia de tejido dañado.

El uso de los detectores se basa en los siguientes principios:

La caries dental está constituida por dos capas con una separación bien definida. La capa externa la constituye un tejido no vital, con un gran porcentaje de bacterias, restos de componentes inorgánicos así como proteínas

desnaturalizadas. Por lo tanto la estructura presenta una degeneración irreversible.

La capa interna la constituye un tejido vital, también con componentes orgánicos e inorgánicos, pero la estructura orgánica presenta una degeneración reversible, la presencia de bacterias puede ser mínima o estar libre de ellas. Es decir, mantiene básicamente una estructura similar a la de la dentina normal y, por lo tanto, puede ser conservada. La aplicación de una solución que consiga teñir sólo la capa infectada permitirá eliminarla respetando la capa externa. Para tal fin se dispone actualmente de diferentes marcas comerciales que ofrecen detectores de caries. Todos ellos se basan en el mismo principio de las dos capas y se utilizan de la misma manera.

La técnica de aplicación es la siguiente: se coloca una gota de detector en la cavidad o en una torunda de algodón y se empapa la cavidad dejando que actúe durante 1 minuto; posteriormente se lava bien con jeringa de agua y aire. La parte de dentina que permanece teñida de color intenso es caries remanente y debe ser eliminada. Una vez eliminada se vuelve a aplicar el detector. La parte de dentina que queda débilmente teñida no se tocará.

Es deseable que todo método de diagnóstico tenga un bajo índice de falsos positivos con el fin de evitar el sobre tratamiento. Por lo que se refiere a los detectores de caries, se ha visto que no toda la dentina teñida está infectada [8]. Por otro lado, la ausencia de tinción tampoco descarta la presencia de bacterias. La causa de ello radica en que los detectores no tiñen bacterias, sino la matriz orgánica de la dentina hipocalcificada. Por ello la dentina cercana a la pulpa y situada en las inmediaciones a la unión amelo dentinaria tienden a ser teñidas en dientes sanos.

### **1.2 Proceso de caries**

Constantemente se hacen estudios con el fin de entender el proceso de caries y todo lo que implica, pero este proceso es complicado. Algunas razones de esta

complicación se encuentran en las dimensiones del tejido, que es muy pequeño y la estructura compleja del diente [4].

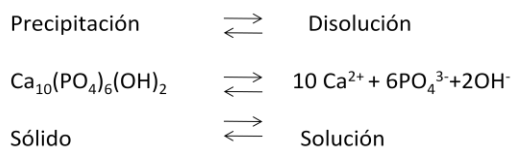
A lo largo de los años de investigación del proceso de caries han surgido diversas teorías con el objetivo en común de explicar el proceso de caries. Estas teorías difieren con respecto a los factores que inician la destrucción de los tejidos; sin embargo, coinciden en que para que se desarrolle la enfermedad necesariamente debe darse la disolución del esmalte [14]. Las bacterias *S. mutans*, *S. sobrinus* y *Lactobacillus spp* entre las más de 500 especies en la placa producen ácidos orgánicos como producto del metabolismo en la fermentación de los carbohidratos, lo que genera un decremento del valor del pH local por debajo del punto crítico con un valor entre 5.5- 4.5 para la HAP, resultando en una desmineralización de los tejidos dentales. Si la difusión de fosfatos, carbonatos y calcio hacia fuera del diente es continuo, eventualmente se forma una cavitación en el lugar [9, 15-18], pero si la remineralización es más rápida que la disolución, el desarrollo de la caries es lento o incluso se detiene. En tales casos la precipitación de los cristales ocurre en los túbulos después de que el proceso celular se retrae [16, 19].

Las propiedades fisicoquímicas de los tejidos dentales determinan su solubilidad en ambiente oral. Ésta propiedad es de suma importancia con referencia al iniciacio de la caries, el proceso de remineralización y uso de modelos de laboratorio para desarrollar lesiones similares a la caries *in vitro*. La presencia de carbonato en dentina y esmalte es algo conocido pero que muchas veces es ignorado en el intento de definir la solubilidad de estos tejidos [20]. Otros elementos que influyen son las llamadas impurezas: flúor, cloro, sodio, entre otros. La proporción de estas impurezas varía de persona a persona incluso de un diente a otro y debido a que estas impurezas pueden influir en la solubilidad del esmalte es que la solubilidad no tiene un valor fijo.

## Antecedentes

---

Cuando la HAP está en contacto con el agua la siguiente reacción ocurre:



Una pequeña cantidad de HAP se disuelve liberándose calcio, iones hidroxilos y fosfatos. La solubilidad de la HAP es totalmente dependiente del pH, a un pH 7 la solubilidad de la HAP en agua es de 30mg/L, mientras que a pH 4 es de 30g/L.

Hay dos razones por las cuales se incrementa la solubilidad del esmalte en ácido. Primero, los iones de hidrógeno son removidos de los iones hidroxilos para formar agua.



El producto de  $[\text{H}^+][\text{OH}^-]$  en agua es igual a  $10^{-14}$  (mol/L). Por lo tanto, como el  $[\text{H}^+]$  incrementa en una solución ácida, el  $[\text{OH}^-]$  debería disminuir en una manera reciproca. Segundo, el fosfato inorgánico en saliva está presente en 4 maneras diferentes:  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y las proporciones dependen totalmente del pH.

La reversión de una caries incipiente permite cambiar paradigmas en cuanto al manejo de la caries generando un gran interés en desarrollar nuevas y mejores terapias de remineralización. Las últimas investigaciones se enfocan en realizar preparaciones que contengan calcio tal como fosfato de calcio amorfo (FCA) y derivados de la caseína (productos comerciales) [9].

### 1.2.1 Caries del esmalte

El proceso que se da en el esmalte puede ser considerado exclusivamente como un proceso químico debido a que es un tejido acelular por lo que las medidas reparativas implican cambios en el ambiente químico local. Además el proceso destructivo se da por episodios que pueden ser más o menos continuos. Debido a ésto el ambiente debe estar constantemente ajustado para fomentar la

remineralización [14, 21]. Durante su progresión en la lesión cariosa se identifican algunas zonas con características específicas. Tomando como referencia y punto de partida de la superficie del esmalte y avanzando hacia dentina, histológicamente estas zonas se distribuyen de la siguiente manera: zona superficial, cuerpo de la lesión, zona oscura y zona traslúcida. Una ligera remineralización se da en la zona oscura. El cuerpo de la lesión corresponde a la zona más amplia y donde la desmineralización y destrucción son mayores. Si la desmineralización continúa, eventualmente se formará una cavidad.

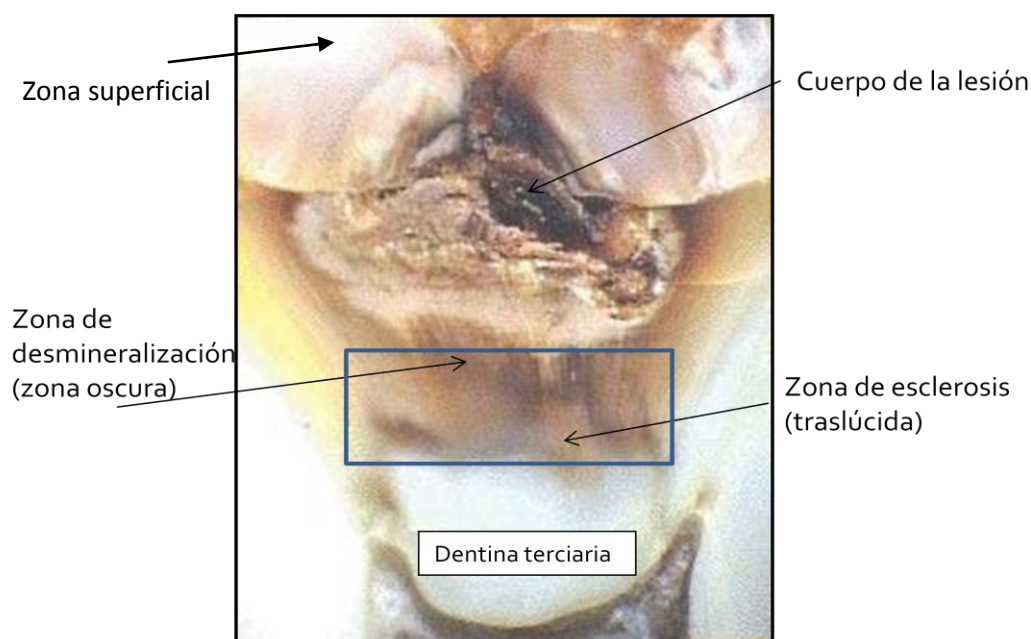


Figura 3. Imagen de una lesión de caries establecida en esmalte y dentina. Se aprecia la pigmentación característica de la lesión así como la localización de las diferentes capas presentes en la lesión.

Previo a la formación de la cavidad, el proceso de caries se considera reversible (remineralización) en su estado incipiente, pero una vez establecida la cavidad no es posible una regeneración.



### 1.2.2 Caries de la dentina

La caries dentinal ha sido clasificada por técnica clínicas y de laboratorio [22, 23]. De esta forma se describen dos capas alteradas: una capa externa (o infectada) y una capa interna (afectada). Cada capa es dividida en diferentes zonas: zona de destrucción, zona de penetración bacteriana y zona traslúcida; siendo esta última el frente de avance de la lesión cariosa (fig. 3). En la zona de penetración bacteriana hay una gran concentración de microorganismos y, finalmente, en la zona de destrucción, la dentina está descompuesta [24].

En la lesión cariosa es posible detectar una pigmentación amarilla-parda de la matriz orgánica. El pigmento es extremadamente insoluble en los solventes comunes (agua, acetona, etanol y tolueno entre otros) y está limitada a la parte orgánica de la estructura dental. Una vez aislada se identificó que su composición química base corresponde a una melanoidina formada como resultado de la interacción entre carbohidratos y proteínas [25].

### 1.3 Estructura y composición del esmalte:

El esmalte es un tejido acelular compuesto un 95-96% por hidroxapatita (HAP); el 5-4% restante consiste de restos orgánicos y agua [26]. La parte orgánica corresponde principalmente a proteínas (enamelinas, amelogeninas, tuftelinas y fosfoproteínas), y en menor proporción a lípidos, iones de citrato y lactato [14, 27, 28]. La amelogenina tiende a disminuir conforme el esmalte se va formando y madurando, siendo la enamelina la que más se conserva entre los cristales de HAP. El componente de agua está asociado parcialmente con el contenido orgánico y con el cristal de hidroxapatita. Se cree que ambos componentes tienen un papel importante en la disolución y remineralización de las apatitas biológicas ya que permiten la difusión y almacenaje de iones involucrados en este proceso [27].

La HAP biológica (i. e. la HAP que se encuentra en el esmalte, dentina y huesos) puede presentar una serie de variaciones en su estructura originadas por sustituciones o inclusiones de iones, los que a la vez tienen un efecto directo en el

comportamiento de la HAP con respecto a solubilidad, resistencia, dureza, conductividad, tamaño y morfología del cristal (y por lo tanto la disponibilidad del calcio) etc. Siendo los elementos constituyentes principales de la HAP  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{OH}^-$  [5, 27, 29, 30], los iones encontrados en el esmalte son  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Los iones de K no parecen tener una distribución muy específica. Debido a esta no estequiometría, la composición exacta y estructura de la fase mineral del esmalte es muy diversa. Sin embargo, la apatita del esmalte es considerada una apatita carbonatada ya que la impureza que se encuentra en mayor proporción es el ion carbonato, el cual está localizado en el sitio tetraédrico del  $\text{PO}_4$  [31].

El contenido de carbonato en el esmalte es de 3.5% en peso y 5.6% en peso en dentina [4]. En la estructura de la HAP el carbonato puede ocupar dos posiciones: puede sustituir al grupo hidroxilo, denominándose apatita carbonatada tipo A, o bien puede sustituir al grupo fosfato, denominándose apatita carbonatada tipo B. Ya que el ión carbonato es mayor que el ión hidroxilo, éste ocasionará una expansión del eje *a* cuando se presenta esta sustitución, mientras que la sustitución del ión carbonato por el fosfato, de mayor tamaño, producirá una contracción del eje *a* [32, 33]. Margolis y Moreno han obtenido valores estimados del producto de solubilidad del esmalte considerando las posibles sustituciones [34]. Esto es importante debido al efecto que puede darse en las fases de remineralización del esmalte posterior a la disolución de los ácidos [34].

Los cristales de HAP en el esmalte tienen un tamaño promedio de 50 nm de longitud, están arreglados de tal manera que su eje *c* es paralelo al eje *c* de los prismas del esmalte en su centro [14].

### **1.4 Estructura y composición de la dentina**

La dentina contiene 70-75% de HAP y 25-30 % de material orgánico y agua. El contenido de material orgánico corresponde en un 90 % a proteína colágena tipo I y 10% de proteínas no colágenas (fosfoproteínas fosforiladas, osteocalcina, glicoproteínas). La dentina humana, a diferencia del esmalte, está constantemente en formación.

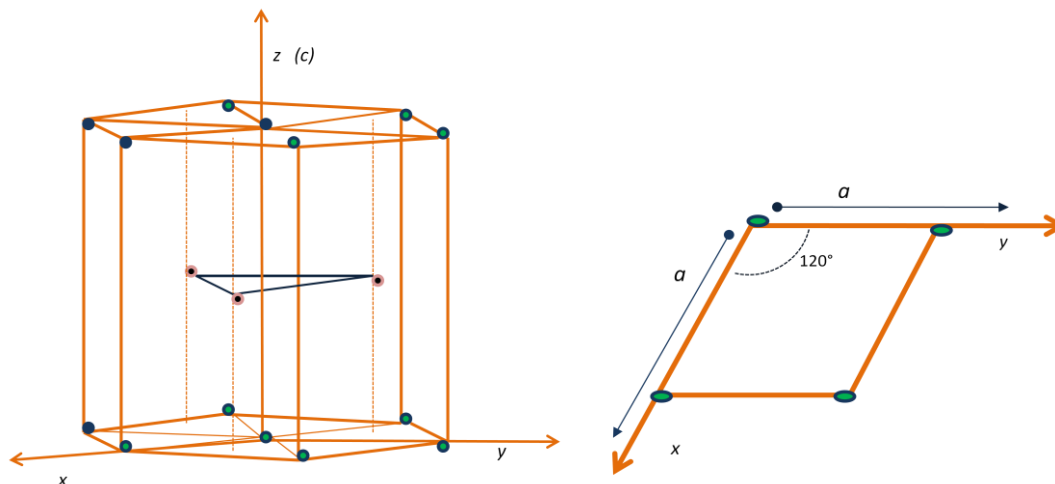
La dentina es un complejo compuesto por las siguientes estructuras: 1) túbulos altamente orientados, 2) zona peritubular altamente mineralizada rodeando los túbulos dentinarios embebida en una matriz intertubular, 3) colágena tipo I que secreta la matriz precursora de los cristales de HAP, 4) fluido dentinal. El tamaño de dichos cristales es aproximadamente de 10 nm. Se considera que la HAP presente en la dentina es también deficiente en Ca, la cual contiene diferentes cantidades de iones  $\text{HP}_4^{2-}$  y  $\text{CO}_3^{2-}$ , siendo la cantidad de  $\text{CO}_3^{2-}$  más grandes en dentina que en esmalte [35]. Este mayor contenido de carbonato le hace más vulnerable a ataque carioso.

### 1.5 Hidroxiapatita:

La hidroxiapatita (HAP) es un fosfato de calcio con una estructura hexagonal cuya fórmula es  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  [36]. La HAP es el principal componente inorgánico de los tejidos mineralizados del cuerpo, de ahí el gran interés en los últimos años para aplicaciones como biomaterial [37, 38]. La composición estequiometría de la HAP del esmalte y dentina no corresponde a la fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  de la HAP sintética, debido a que muchos elementos, tales como Mg, Na y Cl son incluidos en la celda unitaria. De hecho muchos autores sugieren que el esmalte dental es una HAP carbonatada y deficiente en calcio [38-40].

Los cristales de HAP pueden tener una celda unitaria hexagonal (fig. 4) o monoclinica. La forma hexagonal es la más observada en las apatitas biológicas [41]. En el caso de la hidroxiapatita que conforma los dientes, los estudios de microscopía electrónica de transmisión han demostrado que ésta corresponde a una celda unitaria hexagonal [42].

La estructura de la HAP hexagonal tiene los calcio y los grupos hidroxilos localizadas en canales paralelos. La sustitución de iones puede ocurrir rápidamente en estos canales, y esto puede contar para el alto grado de sustituciones que se observa en ésta. Estas son las principales razones por las que normalmente la HAP hexagonal es una fase no estequiométrica.



*Figura 4. Esquema de la forma hexagonal de la hidroxiapatita, mostrando su orientación con respecto al eje a y c.*

El estudio de la estructura y composición química de la HAP del esmalte y dentina son necesarios para caracterizar y entender las propiedades de estos tejidos. Recientemente en un estudio realizado en el Instituto de Física de la UNAM se demostró que el esmalte dental presenta propiedades de conductividad eléctrica alrededor de 300°C, demostrando así que el esmalte dental presenta una transición de aislante a conductor. Esta transición es reversible, ya que al momento de enfriar la muestra de esmalte, éste vuelve a su estado de aislante. Experimentos adicionales han demostrado que se debe este cambio al movimiento de los iones  $\text{OH}^-$  los cuales son arrancados fácilmente de la estructura de la HAP [42].

# **CAPÍTULO 2**

## **TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN**

### **2.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y de Alta Resolución (HRTEM)**

El microscopio electrónico es un equipo que funciona en forma análoga a un microscopio de luz, con la principal diferencia que el sistema de iluminación es un haz de electrones y no de fotones. Esto hace que sea un equipo más complejo que el microscopio de luz.

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) trabaja con los electrones que pasan a través de la muestra, formando la imagen o el patrón de difracción de ésta. La imagen se obtiene generalmente en el modo de contraste de amplitud: solo un haz pasa por la apertura objetiva. Cuando se usa el haz transmitido, la imagen se llama campo claro; cuando es el haz difractado la imagen se llama campo oscuro. Si el TEM cuenta con la resolución adecuada, también se pueden obtener imágenes de contraste de fase, usando para esto dos haces. En este caso se usa la Ley de Bragg para su interpretación.

Existen TEM's cuya resolución es tal que permite obtener imágenes donde se observan las posiciones atómicas de la muestra. En este caso pasan N haces a través de la apertura objetiva. Estos microscopios son llamados TEM de alta resolución (HRTEM).

La técnica de HRTEM ha sido empleada para demostrar el proceso de desmineralización y remineralización en cristales de HAP de lesiones de caries de esmalte y en caries artificial. Por medio de esta técnica se han logrado imágenes en las que es posible determinar que el cristal de HAP suele presentar dos tipos de disolución: una afectando la periferia y otra afectando el centro del cristal. Estos estudios se han realizado en dientes con caries natural y artificial. En los estudios *in vitro* los dientes se someten a soluciones desmineralizantes y remineralizantes para poder analizar los cambios estructurales que se generan durante el proceso, y así se ha llegado a la conclusión que estos son procesos que ocurren constantemente de manera simultánea o alterna en zonas expuestas del esmalte a la cavidad oral [27, 43, 44].

En dentina se ha utilizado esta técnica para investigar la ultraestructura de la dentina intertubular en caries inducida y, al igual que en el esmalte, para determinar la cristalografía del tejido. [24, 45]

En este proyecto esta técnica nos permitió encontrar evidencia de que en las zonas afectadas se encuentran cristales dañados por la caries y observar alteraciones en su estructura. También nos permitió determinar un tamaño de cristal en los cuatro polvos.

### **2.2 Difracción de Rayos X (XRD)**

En la difracción de rayos X (XRD) un haz de rayos X interacciona con la muestra y un detector registra los máximos presentados cuando se obedece la Ley de Bragg. En este caso el detector es movable y los resultados se registran en un diagrama donde se grafica la intensidad de la señal en función del ángulo 2-theta. Este diagrama (o difractograma) es indexado de acuerdo a las tarjetas que se encuentran en la base de datos de este equipo.

La XRD es una técnica ampliamente aplicada para la caracterización fosfatos de calcio ya que nos permite obtener información de carácter cualitativo y cuantitativo de fases presentes en el material. También nos da información sobre su estructura cristalina, tamaño promedio de cristal y determinación de imperfecciones en la estructura.

#### **2.2.1 Refinamiento Rietveld**

Este método es una herramienta para obtener con mayor precisión parámetros de red, posiciones atómicas, tamaños de cristal, micro deformaciones, y cuantificar fases cristalinas presentes en la muestra a partir del espectro de difracción de rayos X.

Para la obtención de una estructura cristalina, primero se procede a obtener el difractograma de rayos X de la muestra que se está analizando. En seguida se identifican todas las fases presentes y se recaba la información sobre la

cristalografía de cada una de ellas. Con esta información cristalográfica y un modelo para el arreglo experimental se calcula un espectro de difracción que se compara con el experimental. Finalmente, los parámetros involucrados en el modelo se modifican, empleando la técnica de mínimos cuadrados, hasta que la diferencia entre el difractograma teórico y el experimental es mínima.

La técnica ha sido utilizada en estudios de síntesis de hidroxiapatita para determinar los parámetros de red de la estructura así como el tamaño promedio de cristal [46- 48]. No hay estudios previos de caries en los cuales se utilice el refinamiento. La información que se obtenga en el presente trabajo será para determinar los parámetros de red, tamaño promedio de cristal, número de fases presentes y si hay deficiencias en alguno de los componentes de la HAP.

### **2.3 Espectroscopia de energía dispersa de rayos X característicos (EDS)**

Es una técnica de análisis químico con el que cuenta el microscopio electrónico de barrido (SEM) y que nos proporciona información de la composición química del material a partir de la generación de rayos X característicos. Al interaccionar el haz electrónico con la muestra, se generan rayos X los cuales son detectados con un fotomultiplicador y la intensidad registrada es graficada en función de la energía que presenta el haz de rayos X generado.

El análisis del espectro generado permite el análisis químico de los componentes de la muestra. El análisis cuantitativo en la mayoría de los casos puede obtenerse con una precisión del 1-2% de la cantidad presente de un elemento dado, excepto en el caso de la detección de elementos muy ligeros como el oxígeno, donde el rango de error sube hasta el 5%. Otra característica de la técnica es que permite por medio de mapeos químicos la distribución elemental en un área específica a estudiar dando una información detallada de la composición de diferentes zonas. En estudios de la caries realizados previamente, la técnica EDS permitió identificar diversos elementos y su distribución en los dientes [5, 20, 27]. El hecho de contar con la información sobre la composición de los polvos del material cariado y sano



permitirá dar una interpretación a los resultados en las variaciones de los parámetros de red.

### **2.4 Análisis Termo-gravimétrico (TGA)**

La técnica del Análisis Termo-gravimétrico (TGA) nos permite obtener información de la forma en que el peso de un material varía en función de la temperatura. De esta manera se coloca un material de peso conocido, se calienta el material registrándose una pérdida de peso.

En la curva de TGA se representa el peso en el eje de ordenadas y la temperatura en el de las abscisas. La variación de peso se puede representar bien en miligramos o en porcentaje de muestra original. En el momento que se obtenga un cambio de fase, se registrara un cambio en la pendiente de la curva.

La información que se genera del análisis puede ser cualitativo e identificación, ya que los termogramas son muy característicos de un material. También se obtiene un análisis cuantitativo, donde los escalones correspondientes a la pérdida de peso pueden ser utilizados para determinar la cantidad de cada componente en el material.

El principio de operación implica la colocación de dos crisoles de aluminio, uno con la muestra a investigar y otro con alúmina como referencia, ambos en la celda de calentamiento que se encuentra en el instrumento. Dicha celda es calentada por un flujo de calor constante que es controlado eléctricamente. La muestra y la referencia se mantienen a idéntica temperatura pero con un sistema de calentamiento independiente

Por medio de la calorimetría se pueden estudiar las propiedades térmicas de los componentes orgánicos de lo dientes (colágena por ejemplo), principalmente aquellas que resultan de su degradación y combustión total, lo que ofrece la posibilidad de conocer la relación que guarda con la HAP, debido a que la estabilidad térmica de una proteína tiene una estrecha relación con sus

características estructurales, como son las interacciones químicas que estabilizan a la molécula así como el ambiente que la rodea.

Los estudios previos registrados en la literatura sobre tratamientos térmicos en dientes cariados son escasos ya que la mayoría se enfoca en la caracterización de HAPs. *Larmas et al* [49] aplicaron este método para analizar esmalte y dentina sanos y cariados y compararlos con los resultados obtenidos en HAPs, logrando determinar que a 280°C se da la descomposición de las proteínas lográndose un máximo de descomposición a los 340°C. Las curvas en dentina fueron muy similares a las reportadas previamente en el tejido sano.

Esta técnica de TGA nos permitirá registrar las variaciones en el materialariado producido por la descomposición del material orgánico así como la pérdida del agua. Estos resultados se comparan con la información obtenida por DRX y FTIR.

La importancia de conocer la cantidad de agua en los tejidos se refleja en las técnicas adhesiva de restauración; esto se debe a que las resinas contenidas en los adhesivos/*primers* dentales se encuentran disueltas en acetona, alcohol o agua y la selección de un tipo u otro de adhesivo va a depender de las características de la estructura dental remante.

### **2.5 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)**

Esta técnica permite determinar las estructuras moleculares a partir del análisis de las señales asociadas a los modos vibracionales de los grupos funcionales presentes en la muestra tanto en la fase mineral como en la fase orgánica.

La radiación infrarroja es un movimiento ondulatorio que se caracteriza por su frecuencia y por su longitud de onda. La frecuencia de la radiación infrarroja alcanza valores considerablemente grandes ( $10^{12}$  a  $10^{14}$  Hz) por lo que se utiliza el número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ).

La región del infrarrojo se subdivide en tres regiones: próximo o cercano ( $13333\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ), medio ( $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ )- donde aparecen las bandas de absorción debidas a las vibraciones fundamentales de las moléculas- y lejano ( $400\text{-}10\text{cm}^{-1}$ ).

Los fotones que transporta la radiación infrarroja no tienen energía suficiente para provocar transiciones electrónicas pero si pueden conseguir vibraciones de los enlaces covalentes de las moléculas. La energía necesaria para provocar una transición vibracional depende del tipo de átomo y del tipo de enlace que los mantiene unidos.

Las bandas de absorción características de casi todos los grupos funcionales se encuentran entre  $4,000$  y  $800\text{ cm}^{-1}$ . Una banda de absorción es la región del espectro en que aparece una absorción de radiación, se ha visto que determinados grupos atómicos cuando están presentes en una molécula, dan lugar siempre a ciertas bandas de absorción.

La técnica de Espectroscopia Infrarroja (IR o FTIR) consiste en el registro de las vibraciones (modos de vibración) producidas cuando la radiación infrarroja interacciona con una muestra. Al interaccionar el haz infrarrojo con una molécula de la muestra, ésta vibrará en un modo conocido, registrándose la intensidad de la vibración en función de la longitud de onda del haz infrarrojo que la produjo. La información que se registra es a nivel molecular debido a que los grupos funcionales presentes en la muestra van a vibrar con una energía característica siempre en la misma frecuencia y lo cual es determinado por la masa de los átomos, enlaces químicos y su energía. De este modo, la técnica FTIR nos dará información sobre las moléculas que conforman la muestra en estudio [50, 51].

El análisis de infrarrojo es un método confiable y de amplia utilización en estudios de síntesis y caracterización de hidroxiapatita biológica y sintética [52].

# **CAPÍTULO 3**

## **METODOLOGÍA**

Para el estudio se recolectaron 25 dientes, los cuales fueron extraídos por razones periodontales y ortodónticas extraídos de pacientes cuyo rango de edad es entre los 20-37 años.

### 3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Dientes permanentes con lesión de caries clase primer y segundo grado de profundidad, definiendo *caries de primer grado* cuando sólo está involucrado el esmalte. En *caries de segundo grado* la lesión cariosa involucra esmalte y dentina, hasta su tercio medio de espesor.
- En esmalte: la zona a analizar es la que presenta color blanco opaco y/o grisáceo como consecuencia del proceso de caries (incipiente).
- En dentina: la zona a analizar es la que presenta pigmentación color amarillo-marrón como consecuencia del proceso de caries (zona desmineralización y zona traslúcida)

Otros criterios que se tomaron cuenta son:

- Dientes que no hayan sido restaurados.
- Dientes posteriores: molares y premolares.
- Dientes libres de lesión cariosa (para tomarlos como referencia).

#### 3.1.1 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Dientes que presentaron algún tipo de preparación cavitaria.
- Dientes con algún material de restauración.
- Dientes con caries de tercer grado

#### 3.1.2 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Contaminación de la muestra durante su preparación.

### **3.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:**

Se definieron 4 muestras en polvo en este trabajo de investigación: polvo de esmalte sano, polvo de esmalte afectado por la lesión cariosa, polvo de dentina sana y polvo de dentina afectada. La cantidad total de material en cada muestra fue de 150 mg.

La manipulación que se le dio a cada diente y como se obtuvo el material en polvo se describe a continuación:

#### **3.2.1 Preparación de muestras**

##### **a) Polvo de esmalte afectado:**

Los dientes utilizados para obtener el polvo de esmalte corresponde a los clasificados con caries grado uno.

Una vez extraídos y posterior a un lavado con agua, se realizó una limpieza de la superficie de cada uno de los dientes extraídos. El proceso de limpieza se realizó con un cepillo para profilaxis para contra-ángulo eliminando de ésta manera restos orgánicos (sangre y saliva) que con el lavado no se hubiesen desprendido.

Para una buena visualización y delimitación de la zona de interés, fue necesario cortar al diente con un disco de diamante en láminas de 1.5 mm de espesor. Estos cortes fueron en sentido longitudinal al diente. Es importante mencionar que previo a los cortes, se embebió en acrílico autopolimerizable la porción radicular del diente con la finalidad de lograr un buen montaje en el portamuestras de la cortadora.

Como parte del proceso de limpieza, a cada uno de los segmentos dentales se le hizo un desbaste de la superficie con una fresa de diamante de grano fino para eliminar restos orgánicos incrustados en la superficie del esmalte, el desbaste se llevó a cabo con un micromotor dental. Para este proceso fue necesario utiliza un microscopio estereoscópico Zeiss utilizando aumento de 6.5X.

Debido a que sólo nos enfocáramos en la parte coronal del diente se hizo un corte en sentido transversal a nivel del tercio cervical separando así la corona de la raíz. Posteriormente, para eliminar partículas contaminantes que hayan quedado en la superficie después de cortar y desbastar, los segmentos dentales se metieron en ultrasonido (BRANSON 1200) con agua bidestilada durante 3 ciclos, cambiando el agua al terminar cada ciclo. Después, se dejaron en un desecador, donde permanecieron por 2 días. Una vez pasado este tiempo y bajo la lente del estereomicroscopio, se separó la zona del esmalte afectado (coloración blanco-grisáceo-opaca sin llegar a la unión amelodentinaria. Finalmente, la muestra se muele en un mortero de ágata.

### ***b) Polvo de dentina afectada:***

Se utilizaron dientes que presentaban caries de segundo grado. El procedimiento de limpieza de la superficie fue similar al realizado en las muestras de esmalte (descrito anteriormente). A diferencia de las muestras de esmalte, en los dientes con caries de segundo grado se utilizó un detector de caries (Ultradent, Sable Seek), emulando la forma en que se realiza en el paciente. Siguiendo las indicaciones del fabricante se colocó una gota de detector de caries, esperado 60 segundos y lavando posteriormente con agua bidestilada, repitiendo el procedimiento de colocación del detector dentro de la cavidad hasta que únicamente se diera una ligera pigmentación, y que además el tejido remanente tuviera una consistencia más suave que la dentina normal, pero más rígida que la dentina reblandecida correspondiente al cuerpo de la lesión. La cavidad se limpió con cucharilla de dentina/ excavadores.

Una vez limpia la cavidad se embebió la raíz en acrílico autopolimerizable (metil-metacrilato) y se hacen cortes de 1.5 mm con un disco de diamante. Después, con una fresa de diamante y en pieza de alta velocidad se separa las zonas de interés las cuales están pigmentadas de color amarillo-marrón.

Los fragmentos son lavados con agua bidestilada en un ultrasonido a 3 ciclos. Se dejaron en una desecadora 2 días para finalmente molerlos en el mortero de ágata.

### **c) Polvos de esmalte y dentina de dientes sanos.**

Para obtener los polvos de dientes sanos (esmalte y dentina), se llevó a cabo la misma metodología descrita anteriormente para esmalte y dentina afectados, el polvo se obtuvo de las mismas zonas.

La cantidad total de cada una de las cuatro muestras (esmalte sano, esmalte afectado, dentina sana y dentina afectada) fue de 150 +/-1) mg.

### **3.2.2 Tratamiento térmico**

Para el tratamiento térmico de las muestras se utilizaron varias técnicas (equipos) y por lo tanto cada una requirió una preparación específica de la muestra a analizar.

De la cantidad total de la muestra que fue de 150 mg: 140 (+/-1) mg se calentaron en una evaporadora en diferentes rangos de temperatura, 5 mg se utilizaron en el análisis de TGA y 2 mg para FTIR. El material utilizado en TGA y FTIR no se recupera una vez hecho el análisis. No obstante, los 140 mg calentados en la evaporadora, y que posteriormente se llevan a analizar a XRD y EDS, si son recuperados.

#### **a) Evaporadora:**

Las muestras se calentaron en una evaporadora diseñada y construido en el Instituto de Física, la cual permitió calentar los materiales en vacío ( $10^{-4}$  torr) en el rango de temperatura de temperatura ambiente a 2000°C. En este proyecto se utilizó un filamento de tungsteno el cual permite alcanzar temperaturas mayores a 1500°C.



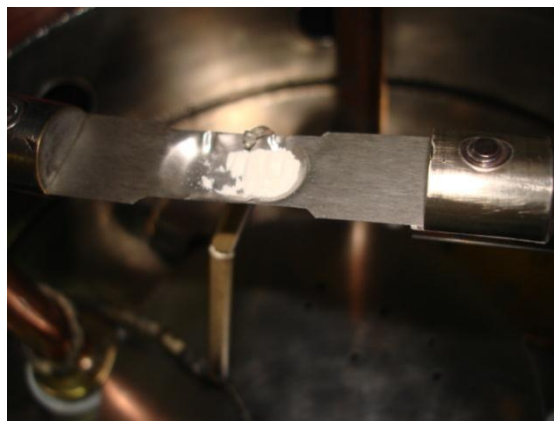


Figura 5. Imagen del interior de la cámara de calentamiento en la que se aprecia la muestra en polvo.

En el tratamiento térmico de cada muestra se utilizaron 140 mg los cuales se calentaron a 100, 200, 300, 400 y 500°C (figura 5). De temperatura ambiente se llevó a 100°C y se estabilizó por una hora, se llevó al microscopio de barrido para obtener su análisis químico; y posteriormente se analizaron por XRD. Una vez hecha la difracción, las muestras se llevaron nuevamente a la evaporadora para calentarlas a 200°C y así sucesivamente hasta llegar a los 500°C, dejándolo 1 hora en cada temperatura. Antes de cada calentamiento, se generó vacío en la cámara de la evaporadora.

Este tratamiento térmico también ayudó a eliminar el material orgánico presente en cada una de las muestras.

### **b) TGA:**

Un análisis térmico comprende el estudio de la evolución de las propiedades de una muestra cuando es calentado a altas temperaturas. Los efectos del calor sobre los materiales pueden ser varios y producir cambios en muchas de sus propiedades. La base de la termogravimetría está en las modificaciones en el peso de la muestra en función de la temperatura.

Para este análisis se utilizaron 5 mg por cada una de las cuatro muestras, éstos se analizaron en un equipo SDT Q600 de TA Instruments. Cada muestra se pulverizó

en un mortero de ágata. Posteriormente se colocó el polvo en el analizador térmico en un crisol de alúmina. Con una atmósfera de nitrógeno y una rampa de calentamiento de 10°C/mi. El intervalo de calentamiento de las muestras fue de temperatura ambiente hasta 600°C. Las curvas obtenidas se trabajaron en el programa Origin 8.0.

### **c) FTIR:**

Para obtener los espectros de FTIR en un rango de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , la muestra se mezcló con KBr en una proporción de 2 mg de muestra por 400 mg de KBr (grado infrarrojo). La mezcla se realiza en un mortero de ágata y el polvo se introduce en la cedilla de acuerdo a las especificaciones del equipo de radiación infrarroja NICOLET NEXUS 470. La técnica que utiliza el equipo es el de reflectancia difusa (DRIFT).

Para realizar el análisis FTIR con tratamiento térmico, se usó una cámara para generar un ambiente inerte con un flujo de Argón de 99.9% de pureza. La temperatura de la muestra se elevó al valor deseado (por ejemplo, 100°), se dejó estabilizar durante 1 hora, se tomó el espectro y posteriormente se llevó a la siguiente temperatura (200°), y así sucesivamente hasta llegar a los 400°C, (límite de temperatura que permite el equipo). Las curvas obtenidas se trabajaron en el programa Origin 8.0.

### **3.2.3 Análisis químico de las muestras**

#### **a) XRD**

Para la obtención de los espectros de rayos X se usó un difractómetro BRUKER modelo D8-Advance usando una radiación monocromática producida por blanco de Cu ( $\text{K}\alpha$ ) con  $\lambda=0.154\text{nm}$ . Con la finalidad de tener un gran número de picos de difracción es recomendable medir el difractograma en el mayor intervalo posible de ángulo. Para este trabajo, los patrones de difracción observados fueron escaneados utilizando pasos de  $0.02^\circ$  ( $2\theta$ ) y 25 s como tiempo de cuenta, basado en la geometría Bragg-Brentano. Para este análisis se utilizaron los 140 mg

correspondientes de cada. La indexación de los picos se llevó a cabo con la tarjeta PDF #24-0033.

Se hicieron 6 análisis por cada muestra, la primera medición se hizo previa al tratamiento térmico. Posteriormente se hicieron 5 mediciones más, una por cada intervalo de temperatura (desde 100 hasta los 500°C).

### **b) Refinamiento por el método de Rietveld**

Utilizando el software FULLPROF, la estructura cristalina de la HAP de las 4 muestras fue refinada tomando como base el difractograma de rayos X obtenido en cada intervalo de temperatura, el primer refinamiento fue del difractograma obtenido de la muestra sin tratamiento térmico, repitiendo el procedimiento por cada medición obtenido hasta los difractogramas obtenidos de las muestras calentadas a 500°C.

El primer paso para realizar el refinamiento Rietveld fue la identificación de las fases cristalinas presentes en el material, una vez identificadas las fases, se ingresan los datos correspondientes a cada fase encontrada como son: estructura cristalina, grupo espacial, parámetros de red, así como posiciones de los átomos en la celda unitaria.

Para usar este software se necesito contar con la medición de la muestra con extensión \*.dat y el modelo teórico inicial, el cual se encuentra en un archivo con extensión \*.PCR. Este archivo \*.PCR contiene los siguientes datos: Título de la muestra a refinar, título del fichero PCR, variables de control, datos del experimento, variables de convergencia, átomos en la celda y parámetros de microestructura. Para lograr convergencia, es importante que los valores iniciales de los parámetros involucrados en el modelo sean correctos antes de empezar su refinamiento. Además, se debe seguir un orden apropiado para refinar los parámetros, primero se hace un modelado de la estructura trabajándose principalmente sobre los parámetros relacionados con la forma del cristal.

### c) EDS

El análisis químico de las muestras fue realizado en un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío (SEM-LV) Jeol 5600LV el cual tiene adaptado un equipo de análisis EDS de la marca NORAN. Esta técnica nos da información sobre la composición de cada uno de los polvos además del tipo de elementos presentes y su porcentaje.

No obstante el proceso de calibración queda sujeto al personal de servicio, algunos parámetros instrumentales importantes a considerar durante un análisis químico por EDS son: tiempo de medición, número total de cuentas, spot size y voltaje de aceleración, ya que si se modifican estos valores pueden generarse variaciones en los resultados. Por ello es importante mencionar que previo al análisis de los polvos de esmalte y dentina se determinaron los parámetros de operación del SEM y EDS que nos darían una cuantificación confiable de la proporción Ca/P así como de las abundancias relativas de los elementos presentes en los polvos. Para ello se analizó una muestra en polvo de HAPs con una relación molar Ca/P de 1.67.

La muestra de HAPs se preparó de la siguiente forma: con el polvo HAPs se formó una pastilla con un diámetro de 3 mm y un espesor de 2 mm. Los espectros mostraron los picos correspondientes a los elementos propios de la HAP. Esta misma metodología se siguió para las 4 muestras después de cada calentamiento posterior al análisis por XRD. Los valores de Ca/P obtenidos fueron de  $2.0 \pm 0.3$ .

Una vez definidos los parámetros de instrumentación: amplificación de 35X, spot size de 40, voltaje de aceleración de 25 kV, distancia de trabajo de 17 mm, 17 mil cuentas y sistema de bajo vacío (15 Pa), se procedió a la obtención del análisis químico de las 4 muestras.

### **d) TEM**

La muestra se deposita en una rejilla de cobre de 300 mesh, sobre la cual se le coloca previamente una película de polímero (formvar) al 2.5 % para que sostenga las partículas del material. Para depositar la muestra sobre la rejilla, se mezcló 0.2 mg del polvo en agua bidestilada y se depositó una gota de la solución sobre una rejilla con un capilar. Debido a que la muestra y el formvar son materiales no conductores es necesaria que la rejilla junto con la muestra sea recubierta con una delgada capa de carbón el cual, al ser material conductor, permite una buena interacción del haz electrónico con la muestra.

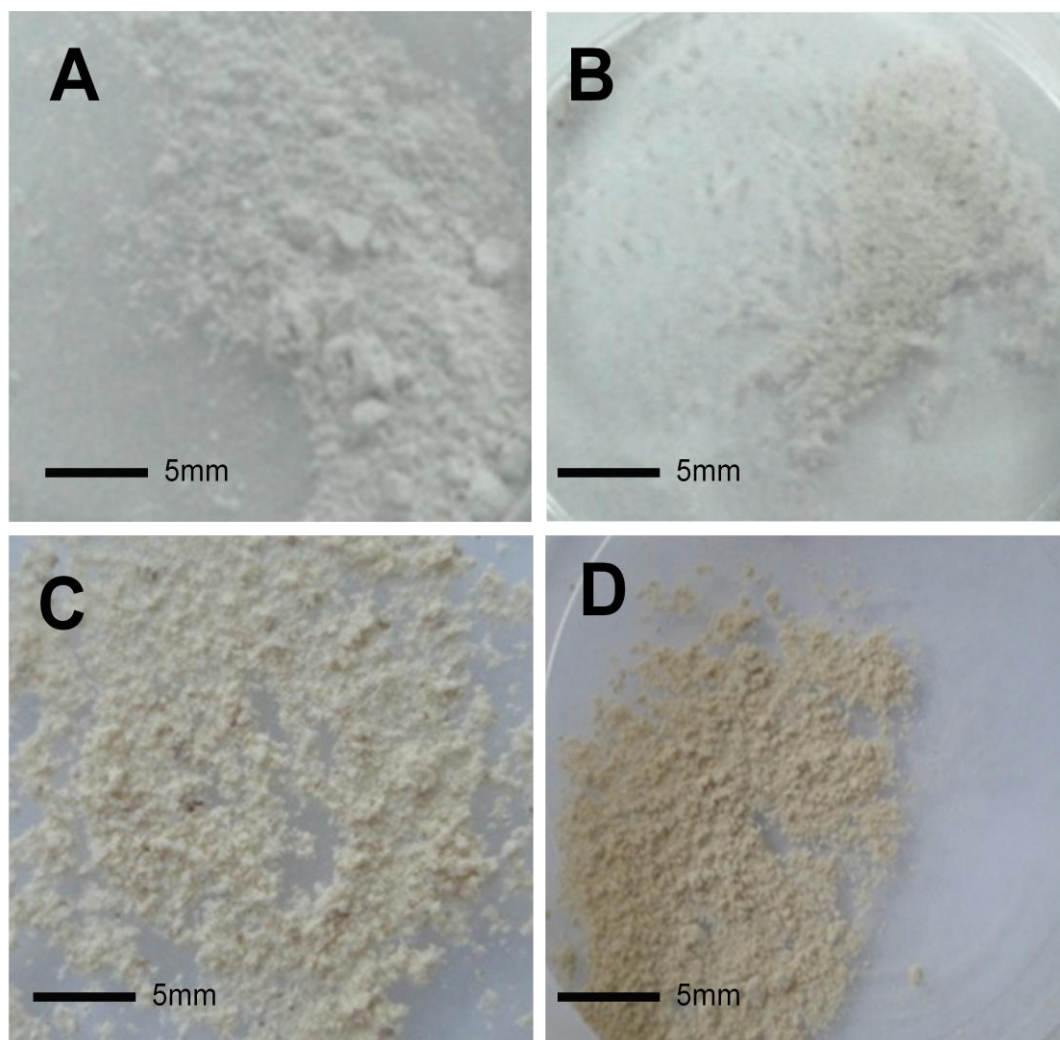
Las muestras se observaron primero en el microscopio de transmisión Jeol 100CX con la finalidad de asegurarnos que si tienen las características adecuadas (tamaño y distribución de partículas en la rejilla) para ser observadas en microscopía de alta resolución Jeol 2010-FEG cuya resolución es de 0.19 nm.

# **CAPITULO 4**

## **RESULTADOS**

### 4.1 Microscopía Óptica (MO)

En la figura 5 se observan los 4 polvos obtenidos: el esmalte sano con color blanco (A) y (B) esmalte cariado con color blanco opaco a grisáceo. La dentina tiene una coloración amarillenta con respecto al esmalte, no obstante es posible identificar una diferencia de tonalidad entre la dentina sana (C) y la dentina afectada (D) en la que el color tiende a ser marrón.



*Figura 5. Imagen de MO. Se aprecian los diferentes colores y tonalidades entre el esmalte sano (A) y esmalte afectado (B). Por la composición de la dentina es más evidente el contraste entre el material sano (C) y el afectado (D).*

### 4.2 Información química

#### 4.2.1 EDS

Los resultados a temperatura ambiente nos indican que los cuatro polvos están compuestos por los mismos elementos en diferente porcentaje. Los análisis fueron por zona, en cada pastilla se analizaron 3 zonas con un área de escaneo de 1 mm<sup>2</sup>, y los resultados se muestran en la tabla I. Como es posible observar, adicional al oxígeno (O), fósforo (P) y calcio (Ca), elementos que componen a la hidroxiapatita, se encontraron otros elementos considerados minoritarios con base al porcentaje con el cual están presente en la muestra. Estos elementos son magnesio (Mg), sodio (Na), carbono (C), y cloro (Cl).

Otra información que se obtiene de los resultados por EDS es la relación Ca/P. Este valor fue más alto en las muestras de esmalte y dentina afectados, siendo de 2.28 y 2.35 respectivamente. Con respecto a las muestras de esmalte y dentina sanos, su valor fue de 2.11 y 2.30 respectivamente. Es importante hacer notar que el valor de la relación Ca/P de los 4 polvos fue mayor que el correspondiente a la HAP (1.67). Los elementos presentados en la tabla I para esmalte y dentina sanos a temperatura ambiente están en concordancia con los ya reportados previamente [38]. No obstante, en el material afectado no se registró ninguna señal correspondiente al silicio (Si), lo que contrasta fuertemente con lo reportado previamente en la literatura [5, 27, 48].

	Ca/P	EDS
<b>Esmalte sano</b>	2.11 ±0.11	HAP elementos + Mg, Cl, Na y C
<b>Esmalte afectado</b>	2.28± 0.14	HAP elementos + Mg, Cl, Na y C
<b>Dentina sana</b>	2.30 ±0.05	HAP elementos + Mg, Cl, Na y C
<b>Dentina afectada</b>	2.35 ±0.18	HAP elementos + Mg, Cl , Na y C

*Tabla I. Resultados de EDS de los 4 polvos. Además de los elementos constituyentes de la HAP fue posible detectar elementos minoritarios (Mg, Cl, Na y C). Los polvos afectados presentan una relación Ca/P mayor con respecto a los polvos sanos.*



La presencia de Na, Mg, Cl y C se debe a las sustituciones que se dan en la celda unitaria de la HAP, donde el ión  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser sustituido por el ión sodio ( $\text{Na}^+$ ) y el magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ); el  $\text{PO}_4^{3-}$  por carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ); el  $\text{OH}^-$  por carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) y por el ión cloro ( $\text{Cl}^-$ ) [26]. Es bien conocido que la HAP biológica es deficiente en Ca y rica en C con sustituciones de  $\text{CO}_3^{2-}$  por  $\text{PO}_4^{3-}$ . Sin embargo, esto produce una relación Ca/P menor de 1.67 [4].

### 4.2.2 XRD

La figura 6 presenta los difractogramas correspondientes a cada uno de los 4 polvos: esmalte (sano y afectado) y dentina (sana y afectada) obtenidos a temperatura ambiente. Los índices ( $hkl$ ) corresponden a ficha de rayos X (PDF) número 024-0033, la cual contiene todos los datos cristalográficos de la HAP. Como se observa en esta figura, todos los picos de difracción corresponden con las reflexiones propias de la HAP y no se detectó alguna fase de fosfato de calcio adicional, como lo reportan algunos autores [24, 4]; quienes sí observaron en sus resultados fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP).

Las diferencias entre los difractogramas de esmalte y dentina son bien conocidas y están explicadas con base a la intensidad y ancho de los picos; es decir, a mayor intensidad y más delgados sean éstos nos habla de un cristal de mayor tamaño y más cristalino como ya se explicó en el capítulo 2 punto 2.2 (Técnicas de caracterización). Los difractogramas de ES y EA son muy parecidos entre sí, no obstante se observan algunas pequeñas diferencias entre ellos, como lo es la disminución de los picos correspondientes a los planos (100), (113) y (203).

En la dentina, las diferencias entre el polvo del material sano y del material afectado son más evidentes: hay una mayor definición de los planos en el espectro de la dentina afectada, principalmente los picos de los planos (102), (210), (212), (112), (300) y (311); lo que parece indicar, que la dentina afectada tiene menos cantidad de material orgánico que la dentina sana. Una probable explicación de esto es que durante la agresión del proceso de caries puede darse la obliteración de los túbulos dentinarios con material mineralizado.

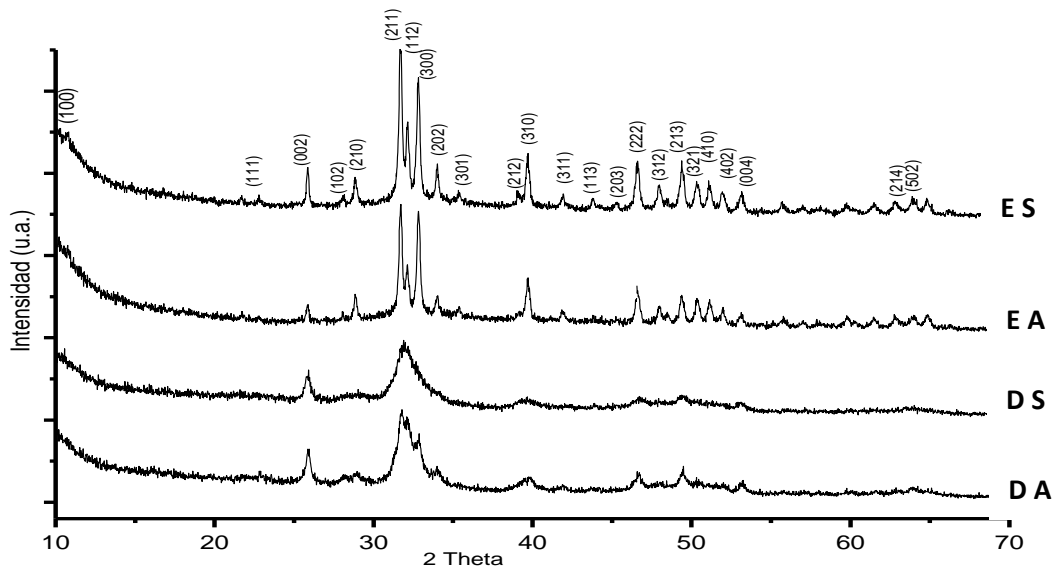


Figura 6. Difractograma de los polvos de esmalte (ES y EA) y dentina (DS y DA) sin tratamiento alguno.

### 4.2.3 FTIR

Los espectros de FTIR de los polvos obtenidos a temperatura ambiente, los cuales nos dan información sobre los grupos funcionales presentes en esmalte y dentina, son característicos de apatitas biológicas. Estos presentan las vibraciones del OH<sup>-</sup> a 699 cm<sup>-1</sup> y 3500-3600; estas últimas corresponde también al estiramiento del enlace O-H del agua. En la figura 7, los grupos fosfatos se observan a 1900-2200, 1000-1200 y 650-602cm<sup>-1</sup>.

Las principales diferencias entre esmalte sano y el esmalte afectado se presentan en la reducción de las bandas de H<sub>2</sub>O, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> entre 1750 y 950 cm<sup>-1</sup>. La diferencia principal entre el material sano y el material afectado de la dentina se presenta en la observación de las bandas de CH<sub>2</sub> a 2928; está banda es asociada a la presencia de material orgánico. Sin embargo, la reducción de las bandas de H<sub>2</sub>O y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> es lo que resulta en una mayor definición de las bandas de material orgánico en la región 2928 cm<sup>-1</sup> y de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> en la dentina.

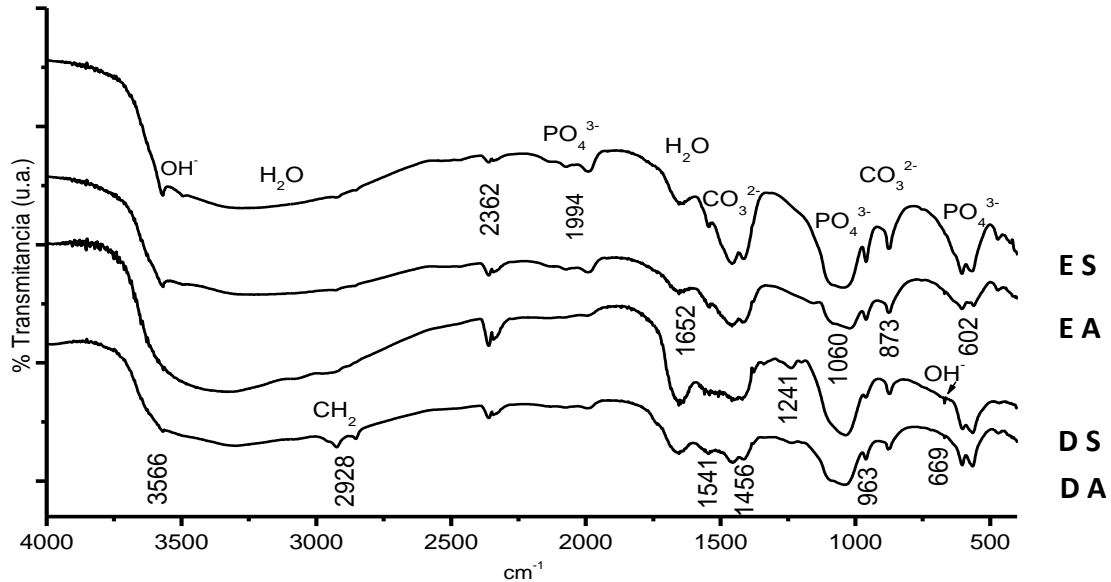


Figura 7. Espectros de FTIR de esmalte y dentina a temperatura ambiente. Se aprecian las bandas características del esmalte y dentina de dientes humanos encontrando diferencias en intensidad de bandas.

### 4.3 Tratamiento térmico de las muestras

Como fue explicado previamente en el procedimiento experimental, las muestras fueron calentadas a diferentes intervalos de temperatura con la finalidad de obtener información sobre el comportamiento de los materiales a diferentes temperaturas.

## Resultados

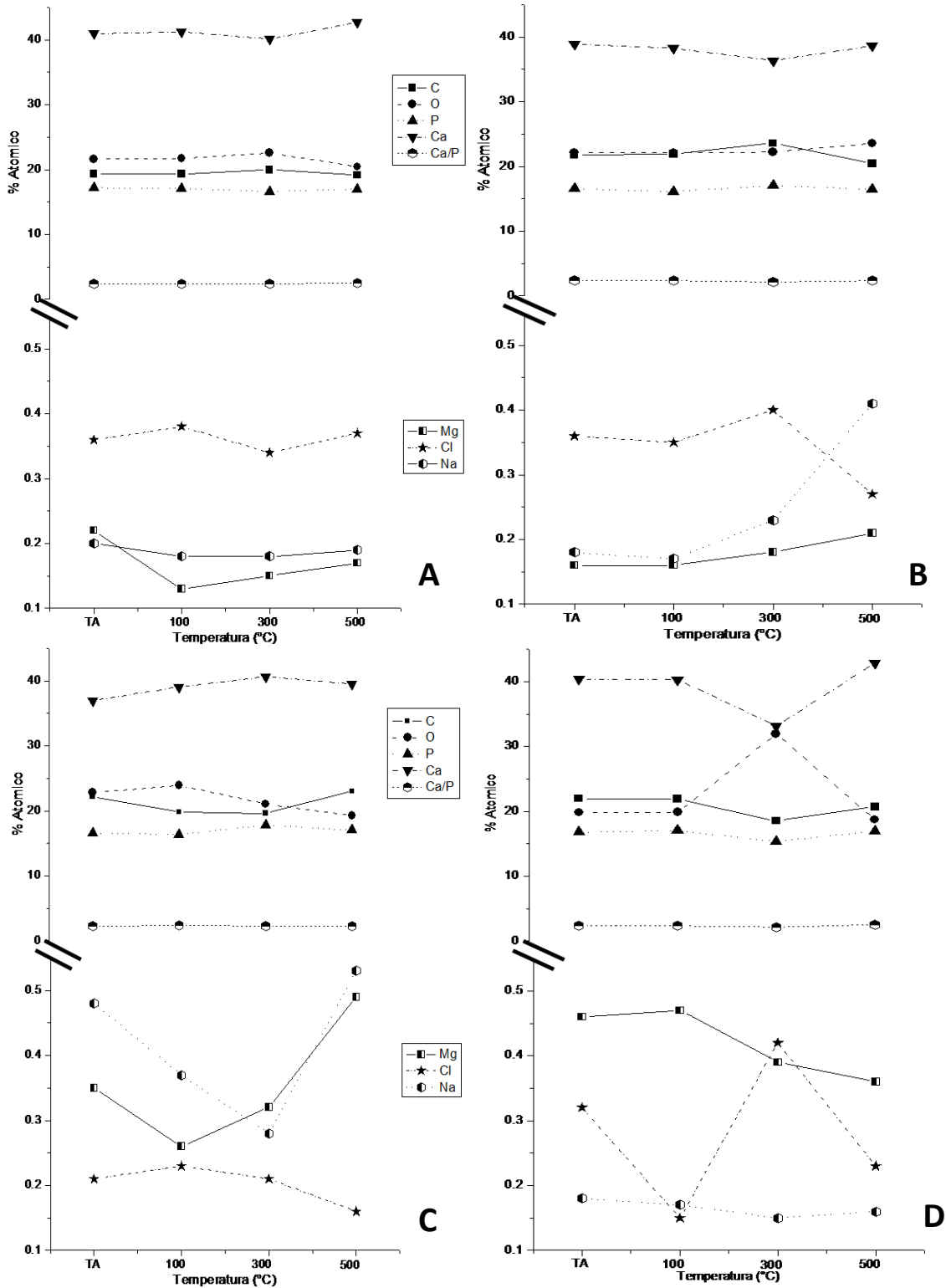


Figura 8. Análisis químico por EDS de las muestras de esmalte sano (A) y afectado (B) y de la dentina sana (C) y afectada (D) tratadas térmicamente. En la relación Ca/P no hubo variación significativa con respecto a la temperatura.

### **4.3.1 EDS**

La figura 8 presenta el comportamiento de los elementos registrado por EDS en los materiales sanos y cariados en función de la temperatura. Se observa en esta figura que la relación Ca/P no presentó una variación significativa con respecto a la temperatura. Las concentraciones de los elementos minoritarios Mg, Cl y Na fueron los únicos que presentaron fluctuaciones en su composición, pero su porcentaje se presentó entre 0.1 y 0.5%, valores que se encuentran muy por debajo del porcentaje de error de detección que presenta el equipo de EDS (1-2%), motivo por el cual no fueron considerados en el análisis.

### **4.3.2 TGA**

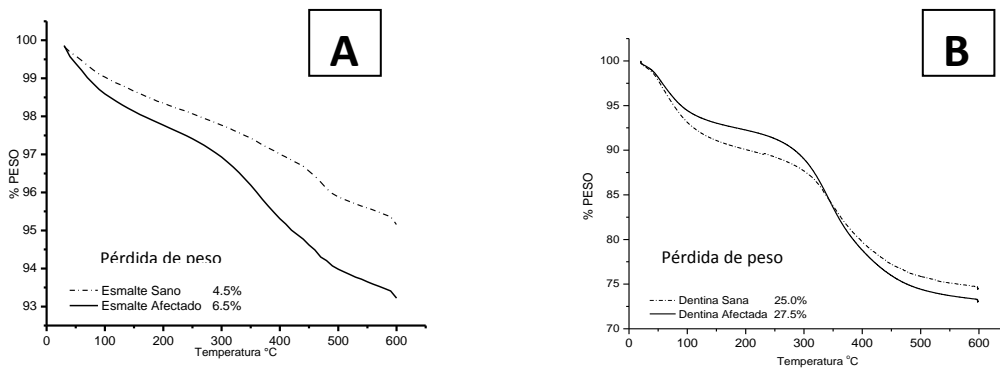
La figura 9 muestra las curvas de TGA de los polvos de esmalte sano y afectado y de la dentina sana y afectada. Estas curvas que muestran tres regiones principales de pérdida de peso entre ellos (siendo más definidas en la dentina): de temperatura ambiente hasta 300°C, de 300°C a 450°C y de 450 a 600°C aproximadamente. La primera región corresponde a la eliminación del agua adsorbida [27-51], lo que se soporta con los resultados de FTIR durante el tratamiento térmico. Alrededor de 200°C se inicia la descomposición del material orgánico. En la segunda región se da una pérdida importante de masa atribuida a la combustión de la parte orgánica. La tercera región se asocia a la expulsión del agua integrada en la celda de la HAP [33] y la descomposición del carbonato [51]. La presencia de un mayor porcentaje de material orgánico en el esmalte afectado, es claramente exhibida por estas curvas. La pérdida total de peso en el polvo de esmalte afectado fue de 6.5% mientras que en el esmalte sano fue de 4.5%. En dentina afectada fue de 27.5% y en la dentina sana fue de 25.0%. La pérdida de peso registrada en la dentina sana y en la dentina afectada es muy similar.

### **4.3.3 XRD**

Los patrones de difracción de los polvos de esmalte sano y el de esmalte afectado se presentan en la figura 10 después de ser sometidos durante una hora a la temperatura especificada en cada caso (de 100°C a 500° C). Las diferencias que

## Resultados

se presentaron en esmalte sano fueron el incremento del plano (100) y la aparición del plano (110). Un ligero incremento de el plano (200) y desaparición del plano (212) fueron también observados. En esmalte afectado, las diferencias fueron los incrementos de los planos (100) y (200), la aparición del plano (110), y desaparición del plano (212). Esto puede implicar una mejor definición de la señal correspondiente a la celda unitaria de la HAP.



*Figura 9. TGA de esmalte (A) y dentina (B) de 100°C a 600°C. Se puede apreciar que en el material afectado hay una mayor pérdida de peso, asociado a la presencia de un mayor contenido de componente orgánico y agua. El 100% corresponde a los 5 mg de la muestra.*

En lo que corresponde a la dentina sana (figura 11), una vez completado el tratamiento térmico, se observó una mejor definición de los picos de difracción, principalmente en los planos (211), (112), (300) y (202). Se presume que esto es debido a la eliminación de material orgánico. En dentina afectada, las diferencias fueron la aparición del plano (102) y desaparición del plano (301). Al llegar a los 500°C, el difractograma de la dentina sana se asemeja al difractograma de la dentina afectada obtenido a temperatura ambiente. Esto sugiere que el material de la dentina afectada está constituido en mayor proporción de material inorgánico.

4.3.4 FTIR

El espectro de FTIR obtenido de los polvos tratados a diferentes temperaturas desde temperatura ambiente hasta 400°C son mostradas en la figura 12. A diferencia con los espectros de difracción de rayos X mostrados en las figuras 6 y 7, el calentamiento del polvo fue llevado a cabo *in situ* en un equipo de FTIR.

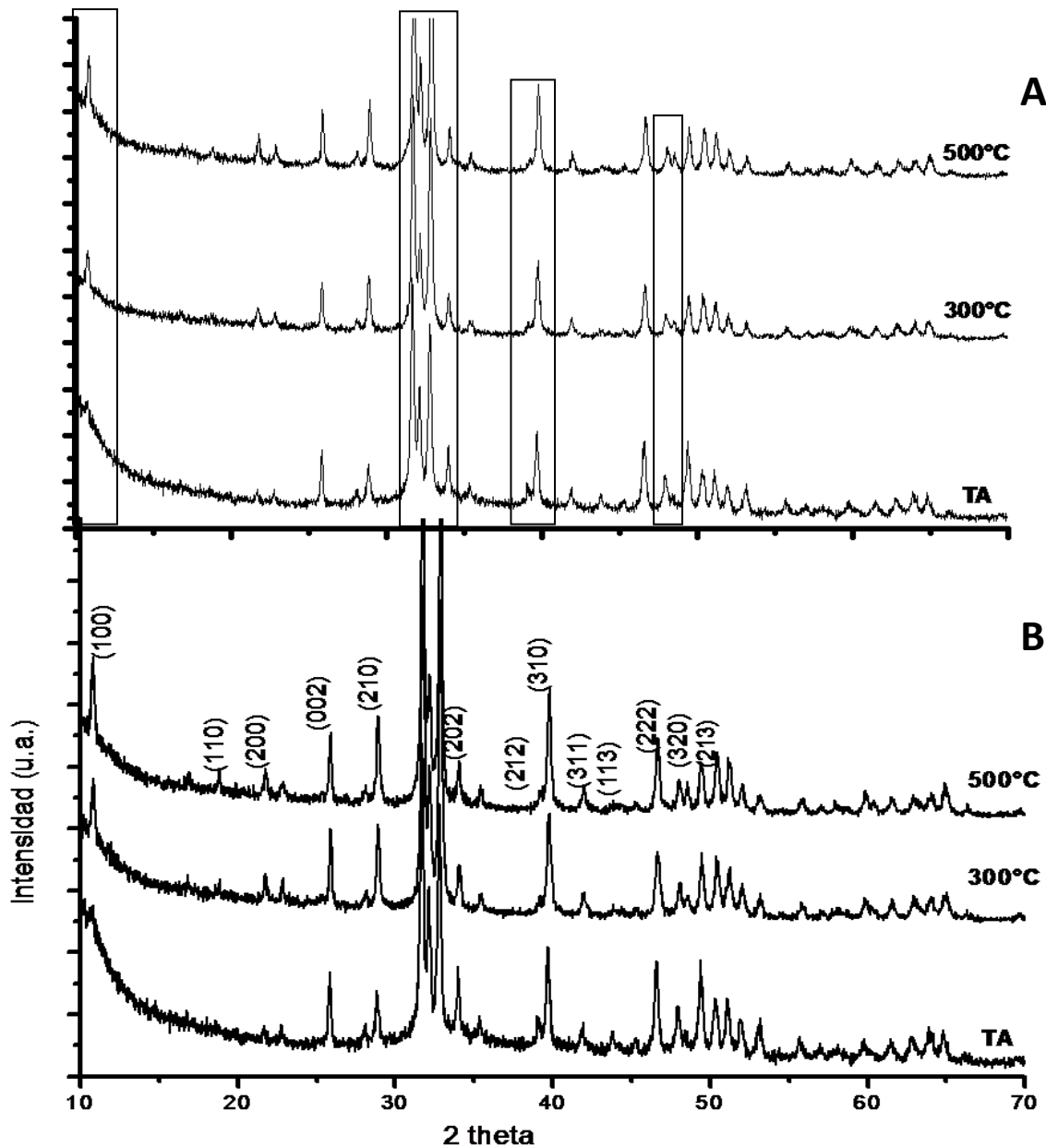


Figura 10. Difractogramas del esmalte sano (A) y afectado (B) sometido a tratamiento térmico hasta 500°C. Los recuadros indican los cambios generados en la estructura de estos materiales.

## Resultados

La observación en la figura 12 de las bandas de  $\text{OH}^-$  a  $3569\text{ cm}^{-1}$  es debido a la reducción de la banda principal de agua absorbida, la cual desaparecerá completamente después de  $500\text{ }^\circ\text{C}$  [53]. En estos espectros se observan también en mayor detalle las bandas  $\text{PO}_4^{3-}$  a  $2000\text{ cm}^{-1}$ .

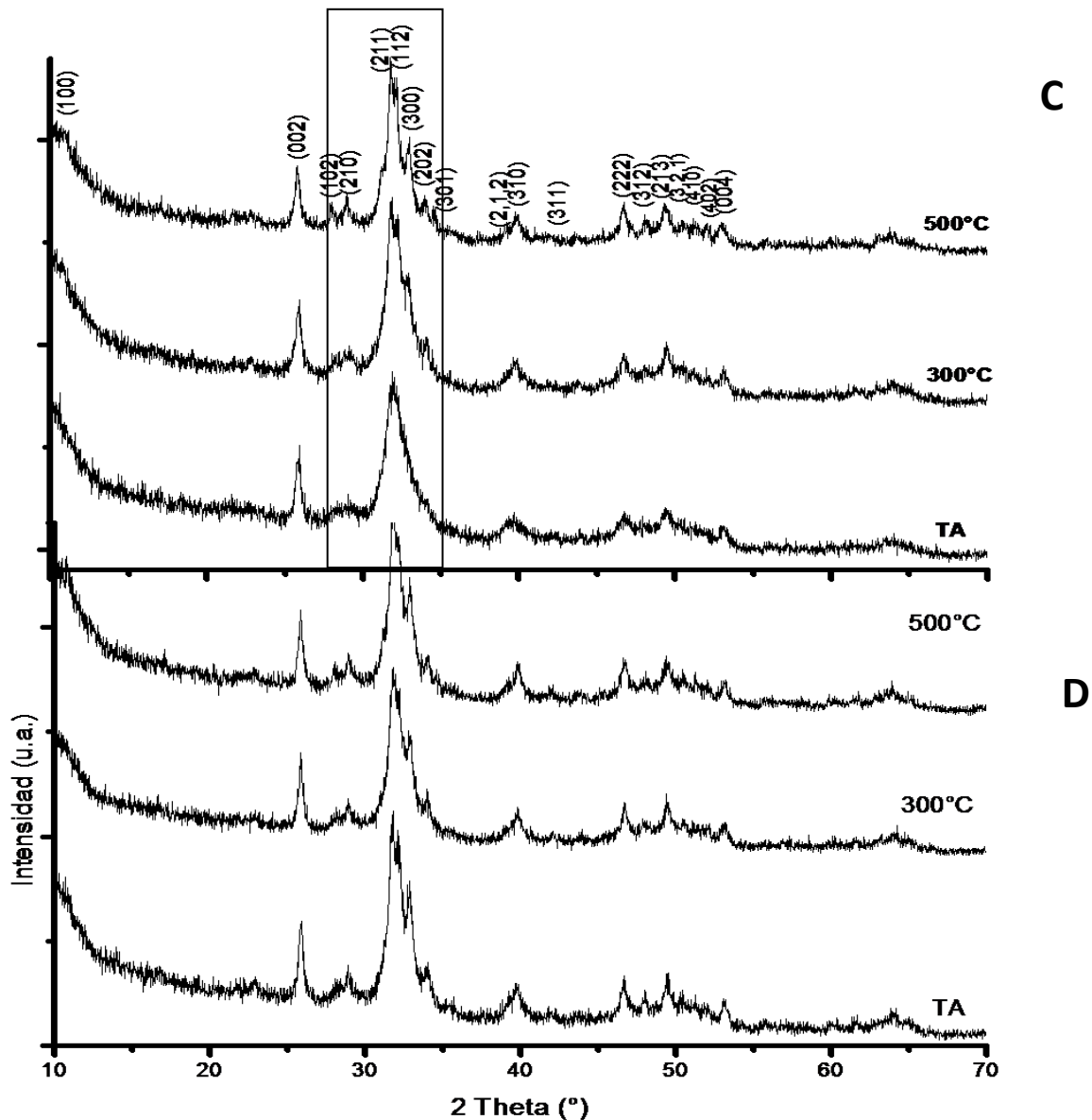
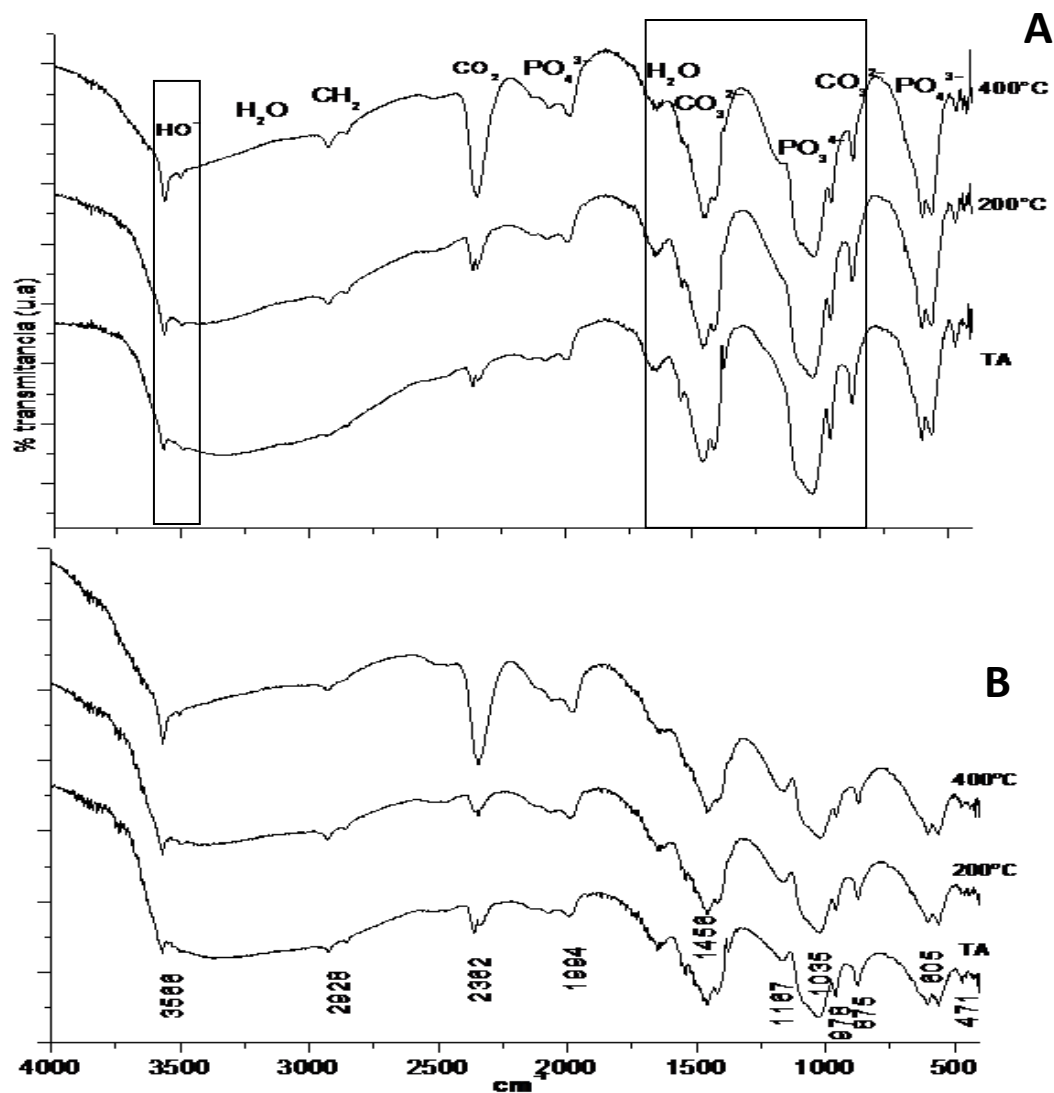


Figura 11. Difractogramas de polvos de dentina sana (C) y afectada (D) con tratamiento térmico de  $100^\circ\text{C}$  a  $500^\circ\text{C}$ . Las principales diferencias entre los dos polvos son la definición de los planos (211), (112), (300) and (202) en la DS, mientras que en la DC, tiende a desaparecer el plano (301).



## Resultados

Conforme se elimina el agua de la muestra, las bandas de  $\text{CH}_2$  a  $2928\text{ cm}^{-1}$  se hacen más evidente, la definición de las bandas de  $\text{PO}_4^{3-}$  a  $2000\text{ cm}^{-1}$  y la ligera reducción de las bandas  $\text{PO}_4^{3-}$  a  $958\text{ cm}^{-1}$  son también observadas.



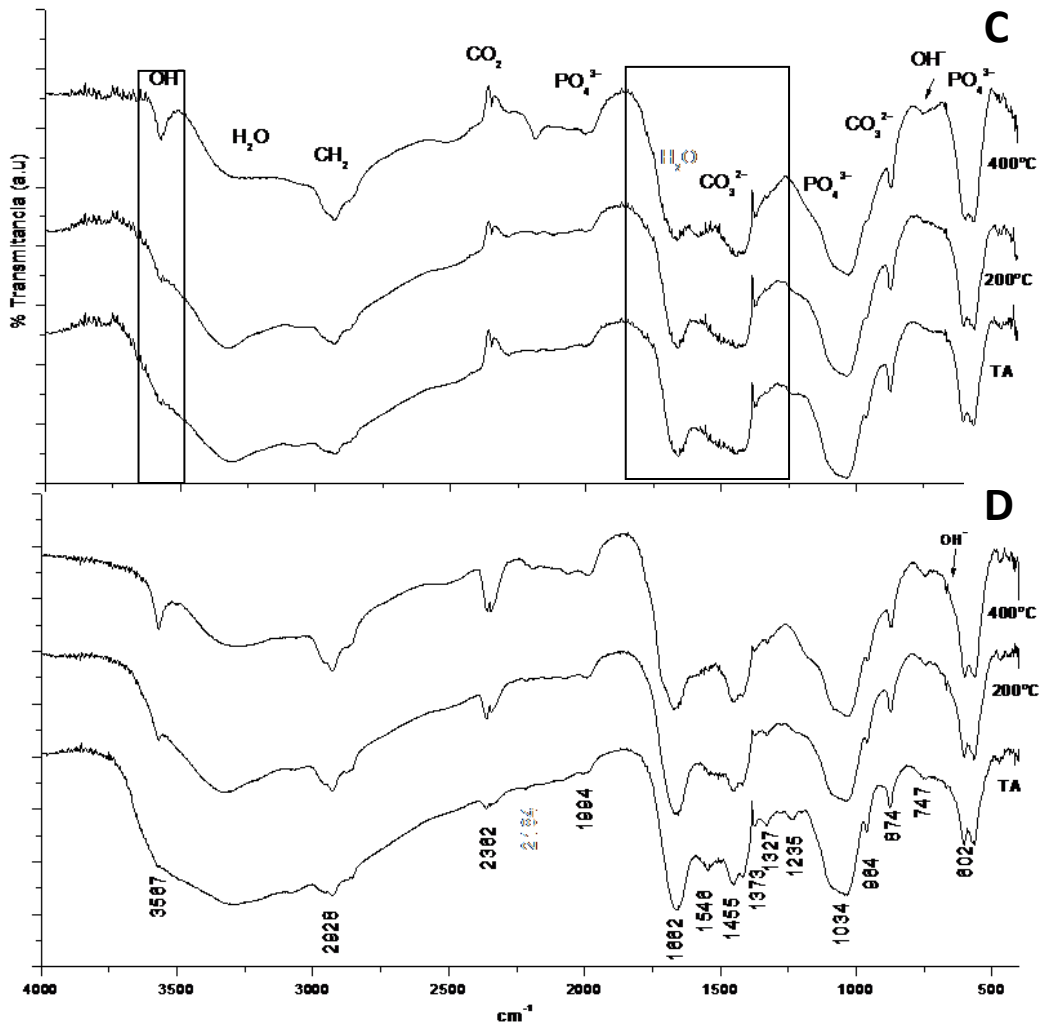


Figura 12. Espectros de esmalte sano (A) y afectado (B); dentina sana (C) y afectada (D), con tratamiento térmico de 100°C a 400°C. Se observa la pérdida gradual de agua, lo que permite una mayor definición de las bandas del OH.

#### 4.4 Variaciones de los parámetros de red

Los difractogramas de rayos X de los materiales sanos y afectados fueron refinados por el método de Rietveld mediante el programa de refinamiento FULLPROF. A partir de este procedimiento se obtuvieron los parámetros de red “a” y “c” de la HAP hexagonal así como el tamaño promedio de cristal en cada caso. Para este refinamiento se tomaron como base los datos cristalográficos que presenta la tarjeta de PDF No. 24-0023 donde  $a = 0.9432$  nm y  $c = 0.6881$  nm. Los resultados se muestran en la figura 13.

## Resultados

Durante el tratamiento térmico de los polvos del esmalte y dentina se observó que el valor del parámetro “a” disminuye ligeramente al aumentar la temperatura (figura 13). En el caso de los valores del parámetro “c”, en el polvo de esmalte la tendencia es a disminuir conforme se incrementa la temperatura, sin embargo en los polvos de dentina la tendencia es ir en aumento.

Para explicar este comportamiento, tomemos en cuenta las sustituciones de los iones  $\text{CO}_3^{2-}$  por  $\text{PO}_4^{3-}$  y de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Mg}^{2+}$  que se dan en la celda unitaria de la HAP. En el caso de la dentina se da la sustitución de  $\text{CO}_3^{2-}$  por  $\text{PO}_4^{3-}$  y en el caso de esmalte la sustitución de  $\text{OH}^-$  y la sustitución de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Mg}^{2+}$  [54].

SUBSTITUCIONES	RADIO IÓNICO (Å)	PARÁMETROS DE RED (Å)	
		eje a	eje c
<b>Para calcio <math>\text{Ca}^{2+}</math></b>	0.99	9.443	6.882
Potasio, $\text{K}^+$	1.33	(+)	(nc)
Sodio, $\text{Na}^+$	0.97	(nc)	(nc)
Magnesio, $\text{Mg}^{2+}$	0.66	(-)	(-)
<b>Para OH</b>	eliminación del OH sin sustitución		(-)
Fluoruro, $\text{F}^-$	1.36	(+)	(nc)
Cloro, $\text{Cl}^-$	1.81	(+)	(-)
<b>Para <math>\text{PO}_4^{3-}</math></b>			
Carbonato, $\text{CO}_3^{2-}$		(-)	(+)
(nc)= no cambios	(+) = aumento	(-) = disminución	

Tabla II. Efectos cualitativos de algunos elementos sustitutos en los parámetros de red de las apatitas (RC Weast. 1983. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 62nd ed.)

La Figura 14 muestra las variaciones del tamaño de cristal en función de la temperatura determinado mediante el programa de refinamiento FULLPROF. El tamaño de cristal para el esmalte fue en promedio 45 nm y el de la dentina fue en

promedio 9 nm. Ambos tamaños de cristal se mantuvieron constante durante el calentamiento.

### **4.5 TEM**

Al observar por TEM los polvos de estos materiales, principalmente en el modo de alta resolución (HRTEM), lo primero que se observa claramente es la diferencia de tamaño entre los cristales de HAP del esmalte y dentina, lo cual confirma la información de difracción de rayos X con respecto a las diferentes intensidades entre los picos de los difractogramas.

En la figura 15 se aprecian cristales de HAP de dentina sana (figura 15A) y dentina cariada (figura 15B y figura 15C). El contraste mostrado en la figura 15A es el comúnmente reportado para el caso del cristal de HAP (arreglo hexagonal a lo largo del eje de zona [0001]). La diferencia de contraste mostrado en la figura 15B presenta claros indicios de la disolución del cristal durante el proceso de caries. La figura 15C fue obtenida por a través de la técnica de contraste Z para una mejor apreciación de la desmineralización del cristal. En esta imagen es posible ver al cristal de un color muy claro, lo que indica una estructura altamente mineralizada, no obstante las regiones oscuras en el centro del mismo cristal nos sugieren menor cantidad del material mineralizado.

## Resultados

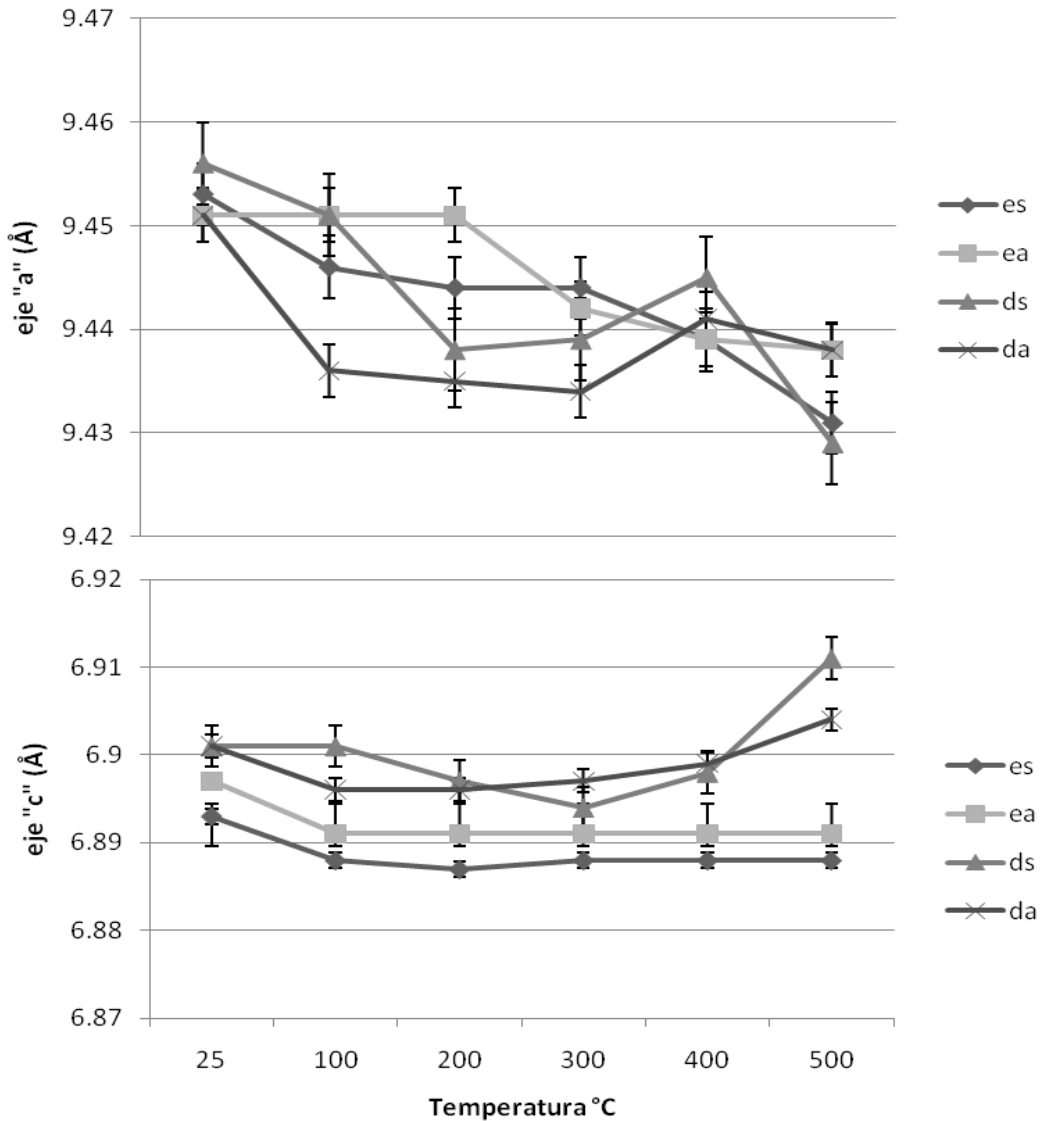


Figura 13. Comportamiento de los parámetros de red en función de la temperatura a partir de los datos obtenidos por el método de Rietveld de los difractogramas de las figuras 10 y 11. En el esmalte, tanto el afectado como sano, muestran una ligera disminución del eje "a" y del eje "c" mantiene cierta constancia. En el caso de la dentina, hay una ligera disminución del eje "a" y en el eje "c" presenta inicialmente un descenso y aumenta después de los 300°C.

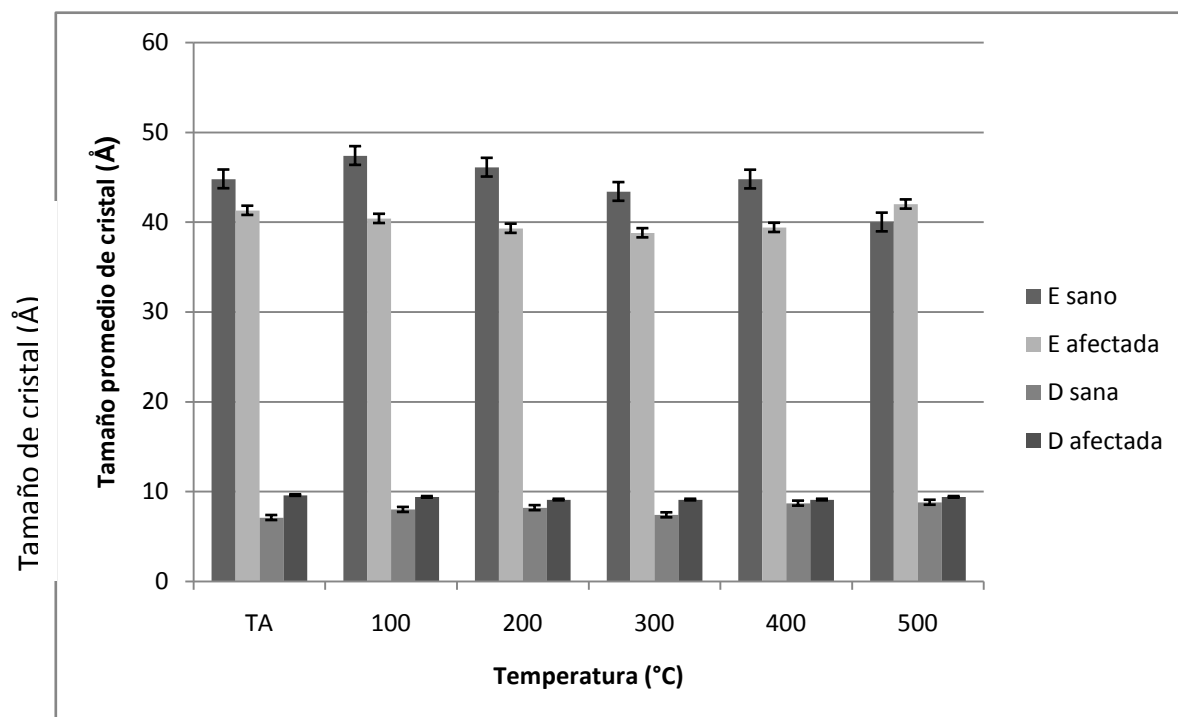
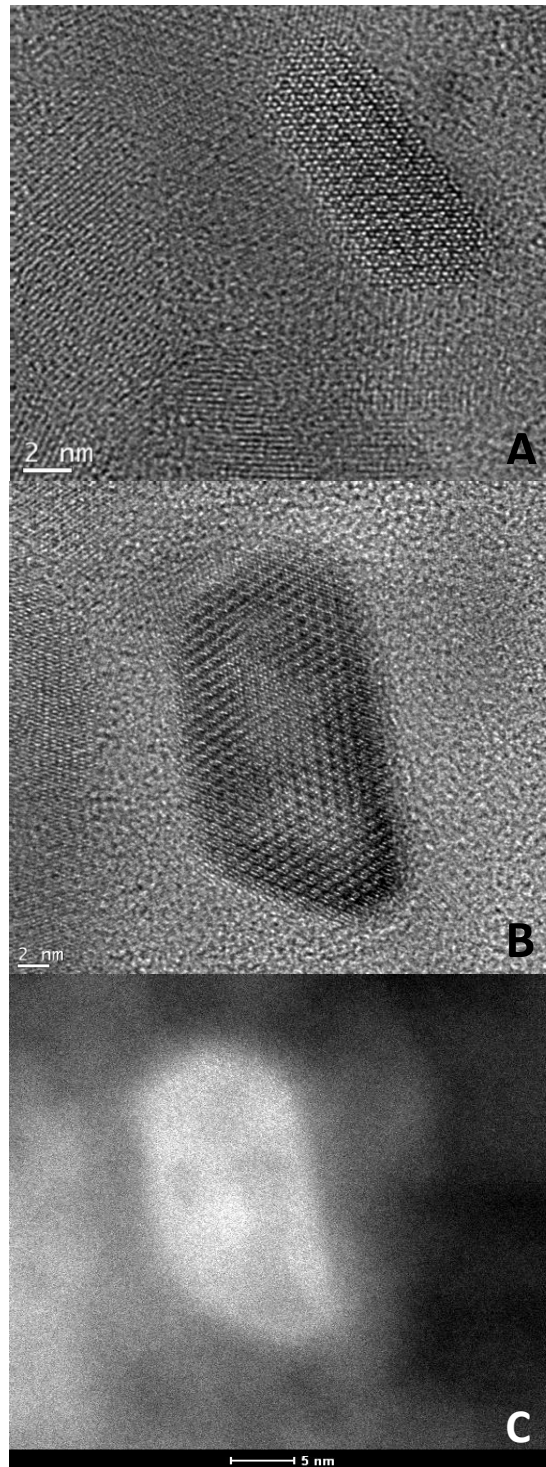


Figura 14. Gráfico que muestra las variaciones del tamaño de cristal en función de la temperatura. Los tamaños promedio del cristal de HAP fueron determinado mediante el programa de refinamiento FULLPROF.



*Figura 15. Imagen de TEM de alta resolución (A y B) e imagen de contraste Z (C) de un cristal parcialmente disuelto observado en el polvo de dentina afectada. El mismo contraste de disolución fue observado en el polvo de esmalte cariado. (A) dentina sana, (B y C) dentina afectada.*

# **CAPÍTULO 5**

## **DISCUSIÓN**



En el diagnóstico de la caries el método visual es el más utilizado y se basa en el principio de la diferencia de color presente en las zonas del diente cariado. Específicamente para la caries de dentina, además del método visual, se utilizan los detectores de caries. Actualmente se considera que estos métodos no son 100% eficaces, manteniéndose la disyuntiva de qué tanto tejido pigmentado se debe eliminar al hacer la preparación cavitaria y que características químicas y estructurales tiene dicho tejido pigmentado.

### ***Composición química***

Para responder algunas de estas interrogantes, en este trabajo se obtuvieron los polvos de esmalte y dentina afectados, específicamente de la zona pigmenta (como consecuencia del proceso de caries), determinada como zona afectada o capa interna [1-4, 22].

Los mismos elementos fueron registrados en las cuatro muestras de polvo: los elementos mayoritarios de la HAP (calcio (Ca), fósforo (P), y oxígeno (O)), así como elementos minoritarios sodio (Na), magnesio (Mg), cloro (Cl) y carbono (C). Esta composición química concuerda en cierto modo con lo reportado previamente en la literatura por LeGeros y Feki et al [27, 37].

Es importante mencionar que en los análisis hechos por medio de EDS a las 4 muestra en el presente estudio, no se detectaron elementos silicio (Si) y azufre (S). No obstante que en estudios previos realizados por *Tiznado* y *LeGeros*, si se reportó la presencia de silicio (Si) y azufre (S) [5, 27]. Estos elementos fueron asociados a la presencia de bacterias presentes en la zona infectada de la lesión cariosa en el estudio hecho por *Tiznado* [5]. El por qué no se reportan en nuestras muestras, puede deberse a que en el tratamiento de limpieza que le dimos a nuestras muestras (emulando lo realizado en clínica) se eliminó la zona infectada de la lesión cariosa; zona en la que se concentran en mayor proporción las bacterias. Sin embargo, no podemos asegurar en éste estudio que la zonas pigmentadas están libres de bacterias.

A pesar de los elementos traza encontrados, por medio de XRD se determinó que las muestra está compuesta de cristales de hidroxiapatita, ya que no se encontró otra fase, lo cual fue sustentado posteriormente con el refinamiento por el método Rietveld de cada uno de las muestras de polvo. Este resultado contrasta con lo reportado por Zavgorodniy [24], el cual reporta la presencia de una fase de witlockita ( $\beta$ -TCP) al analizar con técnica de TEM muestras de dentina cariada. LeGeros [27], ha reportado la formación de witlockita en estudios *in vitro* se da siempre y cuando las concentraciones de Mg y el pH sea el indicado para la precipitación en esta fase, ya que se sabe que la deposición del tipo de fosfato de calcio va a depender en gran medida de las condiciones que privan *in situ*. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que esta no es nuestra situación.

La presencia de elementos como Na, Mg Cl y C es justificado por el hecho de que la hidroxiapatita dental no es estequiometrica, sino que presenta sustituciones en su celda unitaria [14-23, 51]. Por ejemplo la sustitución del  $\text{Ca}^{2+}$  puede darse con iones de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , y  $\text{K}^+$ ; el ion  $\text{OH}^-$  puede sustituirse por  $\text{Cl}^-$  y  $\text{CO}_3^{2-}$ , el ion  $\text{PO}_4^{3-}$  puede sustituirse por  $\text{CO}_3^{2-}$ . Por otro lado, los resultados obtenidos por XRD en las muestras tratadas térmicamente indican variaciones en los parámetros de red de la HAP hexagonal. Estas variaciones en composición deben ser tomadas en cuenta debido a que pueden incrementar la reactividad de la hidroxiapatita y ser más susceptible a la caries (mayor tendencia a la desmineralización de la fase inorgánica del diente) dependiendo del tipo de impureza y su concentración, un ejemplo muy estudiado es la resistencia que le confiere al diente el ion  $\text{F}^-$  al diente, esta “impureza” aumenta la resistencia a la desmineralización.

### **Relación Ca/P**

El valor de la relación Ca/P en las muestras de polvo del esmalte y de la dentina cariados fue más alto (2.28 y 2.35 respectivamente) que en las muestras de polvo del esmalte y de la dentina sanas (2.11 y 2.30 respectivamente) lo que sugiere una mayor concentración de carbonato en las muestras cariadas, esto quizá generado por la sustitución de iones  $\text{CO}_3^{2-}$  por  $\text{PO}_4^{3-}$ . Estos datos son importantes ya que altas concentraciones de  $\text{CO}_3^{2-}$  se asocian con variaciones en parámetros

de red, LeGeros [27]. Estudios realizados en hidroxiapatita sintética han reportado que la incorporación de carbonato a la celda unitaria implica un incremento en la solubilidad del cristal, asociado a un menor tamaño del cristal, LeGeros [27], la presencia de carbonato en la HAP altera las propiedades físicas y químicas del material y ha sido mostrado que un alto contenido de carbonato está asociado con un tamaño de grano pequeño, una reducción en la cristalinidad y como se mencionó anteriormente, un incremento en el grado de disolución de las apatitas [55], lo cual indicaría que las muestras cariadas presentarían una mayor velocidad de disolución en ambientes ácidos con respecto a las muestras sanas, esto es, una pérdida de iones de la estructura de la HAP. Si esta constante de disolución se mantiene, eventualmente se formaría una cavidad en el lugar. Esto representa un buen objetivo para trabajos futuros dentro de esta línea de investigación.

### **Comportamiento térmico**

Es importante mencionar que no se asocia ningún cambio de fase en la hidroxiapatita debido al tratamiento térmico que se le dio a los polvos, se llega a presentar cambio de fase a partir de los 800°C. No obstante LeGeros reporta la formación de witlockita a partir de los 700°C [27, 56].

Cuando los materiales son calentados *ex situ*, la HAP del esmalte cariado presenta un comportamiento similar al observado en esmalte sano a lo largo del eje "c", esto es, disminuye hasta los 100°C (remoción del agua adsorbida) y, luego presenta un ligero incremento (remoción del material orgánico). El total de los cambios observados en el eje "c" entre la temperatura ambiente y 500°C fue aproximadamente 0.05%. Con respecto al eje "a", la HAP de esmalte sano y cariado muestra un ligero decremento de 0.28% en total. Grandes diferencias son observadas en el caso de la dentina: a lo largo del eje "c", es registrado un ligero decremento en el intervalo de temperatura ambiente hasta 300°C (removiendo el agua adsorbida del material) y un incremento de 300 a 500°C; esto representa un incremento total de 0.6% aproximadamente.

A lo largo del eje “a”, la HAP en la dentina muestra una disminución de 0.29% en total. Sin embargo, en todos los casos, al llegar a 500°C los valores del eje “a” son muy cercanos (parecidos) a los reportados para la HAP (0.9432 nm) mientras que en el caso del eje “c”, el valor a 500°C es mayor al reportado de la HAP (0.6881 nm). De acuerdo a lo indicado en la tabla II, este comportamiento indica una fuerte relación con el contenido de los iones de  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  presentes en las muestras. Una difusión de átomos de carbono dentro de la celda unitaria HAP es también posible.

### ***Índice de cristalinidad, método cualitativo de observar los cambios en los espectros de XRD y FTIR***

Un método que nos permitirá conocer los cambios registrados en los espectros de XRD y FTIR, es el concepto de índice de cristalinidad. El índice de cristalinidad (CI) es un concepto ampliamente usado en las ciencias arqueológicas con la idea de medir el porcentaje de cristalinidad y de amorfización de los fosfatos cálcicos en dientes y huesos. Para esto se han usado los espectros XRD y FTIR.

Person et al [57] sugirió que para medir el índice de cristalinidad en los espectros de XRD,  $(CI)_{XRD}$ , de la HAP se usen los tamaños relativos de los picos de (202), (300), (211) y (112) de la siguiente manera: la altura del pico (211) es medida desde la línea base hasta el punto más alto del pico, y la altura de los otros picos se mide desde el punto más alto de cada pico hasta el “valle” que los separa del siguiente pico. Por lo tanto el valor de  $(CI)_{XRD}$  está dado por:

$$(CI)_{XRD} = \frac{a(112) + b(300) + c(202)}{h(211)} \quad (1)$$

Esta relación indica que mientras más grande sea el valor de  $(CI)_{XRD}$ , más alta es la cristalinidad de la muestra; en el caso del esmalte dental el  $(CI)_{XRD}$ , presenta valores de 0.8 y en el caso de la dentina es de 0.2 indicando una mayor cristalinidad en el esmalte con respecto a la dentina.

## Discusión

Con respecto a los espectros de FTIR Weiner y Bar-Yosef [58] indicaron que estos espectros pueden darnos una idea de la cristalinidad de las muestras si utilizamos el desdoblamiento que presentan las bandas de la HAP en 605 y 565  $\text{cm}^{-1}$ . Este valor se denomina  $(CI)_{FTIR}$  y se calcula dibujando una línea base entre 750 y 500 $\text{cm}^{-1}$  y midiendo las alturas de los picos en 605, 565 y 595  $\text{cm}^{-1}$  partir de la línea base dibujada. Este último es el punto más bajo entre los dos. El índice  $(CI)_{FTIR}$  se calcula usando la relación:

$$(CI)_{FTIR} = \frac{A_{565} + A_{605}}{A_{595}} \quad (2)$$

Valores altos de  $(CI)_{FTIR}$  indican un mayor orden cristalino dentro de la muestra. Por ejemplo en el caso del hueso sano se ha reportado un índice de 2.8 por Shemesh [59].

Las tablas III y IV, presentan los valores obtenidos a partir de los resultados presentados en la sección anterior tanto para el caso de  $(CI)_{FTIR}$  y  $(CI)_{XRD}$  en función de la temperatura. Estas tablas indican de forma cuantitativa variaciones entre los espectros de XRD y FTIR. En primera instancia los valores calculados para esmalte y dentina presentan la diferencia existente entre la estructura de estos materiales.

Temperatura °C	Esmalte sano	Esmalte afectado	Dentina sana	Dentina afectada	HAP
25	1.21±0.04	1.17±0.04	indeterminado	0.44±0.04	0.44±0.04
100	1.16	1.12	0.40±0.04	0.33	0.35
200	1.16	1.08	0.38	0.36	0.33
300	1.15	1.17	0.39	0.33	0.34
400	1.12	1.19	0.29	0.39	0.32

**Tabla III.** Valores de  $(CI)_{XRD}$  calculados con la relación (1) de los difractogramas XRD presentados en las figuras 10 y 11 y que corresponden a las muestras después de ser calentadas durante una hora desde temperatura ambiente (TA) a 400 °C. Nótese que se ha incluido los valores calculados para una muestra de HAPs.

En la tabla de  $(CI)_{XRD}$  se observa que los valores para el esmalte son mayores a 1 mientras que para dentina es alrededor de 0.4, lo cual indica una mayor

cristalinidad en el esmalte con respecto a la dentina. En la tabla IV los valores de  $(CI)_{FTIR}$  son similares, entre 2 y 3.

La variación entre los valores de  $(CI)_{XRD}$  de los espectros de XRD del esmalte y la dentina respectivamente son mínimos en función de la temperatura, mientras que la variación de los valores de  $(CI)_{FTIR}$  de los espectros de FTIR, aunque si se presenta, también son mínimos.

Temperatura °C	Esmalte sano	Esmalte afectado	Dentina sana	Dentina afectada	HAP
25	2.41	2.88	2.23	2.50	2.82
100	2.39	2.67	2.19	2.48	2.60
200	2.33	2.10	2.11	2.27	2.45
300	2.42	2.70	2.17	2.21	2.33
400	2.29	2.40	2.12	2.24	2.25

**Tabla IV.** Valores de  $(CI)_{FTIR}$  calculados con la relación (2) de los espectros FTIR presentados en las figuras 12 y 13 y que corresponden a las muestras después de ser calentadas durante una hora de temperatura ambiente 400 °C. Nótese que se ha incluido los valores calculados para una muestra de HAPs.

Con el objetivo de tener una mejor idea sobre la variación que deberían presentar los valores de estos índices, realizamos el estudio similar en una muestra de HAPs y cuyos valores de CI también se presentan en las tablas III y IV. En el caso de los valores de  $(CI)_{XRD}$  se observa un comportamiento aproximadamente constante en función de la temperatura, mientras que en el caso de los valores de  $(CI)_{FTIR}$  se ve que estos valores disminuyen en función de la temperatura.

Por lo tanto el significado de los valores de  $(CI)_{XRD}$  y  $(CI)_{FTIR}$  deben representar parámetros diferentes. Esto se observa desde el origen mismo de su definición. El  $(CI)_{XRD}$  está relacionado con el tamaño del cristal que conforma una muestra, mientras que el  $(CI)_{FTIR}$  está relacionado con el entorno químico que rodea a la

molécula, su estructura química y tipos de enlace de las moléculas que conforman la muestra. Es decir, por ejemplo, la molécula de  $PO_4$ , en su estado de equilibrio, forma un tetraedro donde el átomo de fósforo está rodeado por los átomos de oxígeno. Al modificar este arreglo, por medio de cambios en la temperatura o deformaciones que se originen en la molécula por posibles sustituciones, el tetraedro mostrará deformaciones, y por consiguiente, su estructura química (será modificada).

Por lo tanto en el caso de HAPs el  $(CI)_{XRD}$  no debe presentar variación considerable ya que el tamaño del cristal debe de ser constante en el rango de temperatura estudiado. Sin embargo, por otro lado, el  $(CI)_{FTIR}$  sí debe de presentar variaciones al aumentar la temperatura ya que las moléculas presentarán mayor movimiento, y por lo tanto una mayor deformación de su simetría.

Por lo anterior la tabla III, indica que la dentina está conformada por un tamaño de cristal de HAP más pequeño que el tamaño de cristal del esmalte, pero entre el esmalte sano y afectado, no existe una diferencia significativa en el tamaño de cristal. Lo mismo sucede en el caso de la dentina sana y dentina afectada. Por otro lado y de acuerdo con la tabla IV se deduce que las moléculas de HAP en el esmalte son más simétricas (i.e. sus moléculas presentan menos deformación) que en la dentina, pero que el esmalte sano es el más simétrico de todos y la dentina sana es la menos simétrica de todas.

### ***Tamaño de cristal, material orgánico y contenido de agua***

El tamaño de cristal es mayor en la dentina cariada que en la sana mientras que la dentina sana muestra ligeramente un mayor contenido de material orgánico y agua que en dentina cariada, lo cual concuerda con los estudios de Larmas et al. [49]. No obstante, ambos espectros son muy similares posterior al calentamiento del polvo de dentina sana por arriba de los  $100^\circ C$ , después de que el agua adsorbida es removida.

Los difractogramas de la dentina cariada muestran picos bien definidos en el rango  $2\theta$  de  $17$  a  $37^\circ$ , mientras que el espectro de la dentina sana es menos

definido. Ésta diferencia, por lo tanto, puede ser atribuida a la diferencia de tamaño de cristal, así como al contenido de material orgánico y agua.

En el caso del esmalte, el esmalte cariado pierde más peso que el esmalte sano, una indicación del mayor contenido de material orgánico en el primero que en el segundo.

Para lograr una caracterización completa de los materiales en polvo estudiados en este trabajo es necesario hacer tratamientos térmicos bajo condiciones controladas obteniendo de esta manera más datos de la estructura y química del material. En el caso de los tejidos dentales (esmalte y dentina) al tener un porcentaje de material orgánico y agua en su composición con el calentamiento de las muestras éstos se perderán. Sin embargo, estudiar estas pérdidas por diferentes técnicas de análisis nos dará información sobre su función dentro del material

En la cavidad bucal no se presentan temperaturas elevadas en los rangos utilizados dentro del estudio (500°C) de manera natural. No obstante, es necesario hacer experimentos de este tipo debido a que el comportamiento de los materiales a diferentes temperaturas nos permite conocer parámetros térmicos que pueden tener influencia directa sobre la estructura y comportamiento en diferentes ambientes.

Al calentar las muestras nos da información sobre su estructura y comportamiento a temperatura ambiente. Si durante el tratamiento térmico los cuatro polvos presentaron diferencias en su comportamiento, lo que indica que debe tenerse también un comportamiento diferente bajo tratamientos odontológicos. Esto representa un resultado importante en el área odontológica.

Es necesario recordar aquí, por ejemplo, que el tratamiento del diente con el equipo laser o con la pieza de mano elevan considerablemente la temperatura de éste. Se ha reportado que al trabajar con el equipo laser se ha observado, no solo una transición de fase en el esmalte dental, sino la fundición del esmalte, y para fundir el esmalte se requiere una temperatura por arriba de los 1500°C. Esto indica



que el conocer el comportamiento térmico del diente es un dato fundamental en el trabajo clínico.

Además, se ha reportado que el contenido de agua tiene un efecto importante en el corte producido por medio del rayo laser, se mejora la limpieza del corte y se disminuye considerablemente la temperatura. Por lo tanto, si las muestras de tejido afectado presentan mayor contenido de agua, podríamos inferir entonces que habría una mayor capacidad de “corte” en estas zonas cuando se utiliza el láser en la preparación de cavidades.

Por otro lado, los sistemas adhesivos y los solventes que contienen agua, acetona o alcohol actúan favoreciendo la volatización del agua presente en el sustrato. No obstante, un mayor contenido de agua parece influir en la fuerza de adhesión de la resina al sustrato. Está considerado que en una dentina o superficie con mayor contenido de agua es conveniente utilizar sistemas adhesivos con solventes como acetona y/o alcohol para que ayuden a dar una estabilidad del sustrato, por el contrario, en superficies con menor contenido de agua, es conveniente utilizar adhesivos con agua como solvente, para evitar un colapso de tejido acondicionado.

Es claro que los resultados obtenidos en esta investigación permiten abrir nuevas líneas de investigación.

### CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis hemos analizado las diferencias estructurales y químicas de los polvos obtenidos de zonas afectadas del esmalte y de la dentina de la pieza dental humana y su respuesta al tratamiento térmico, y podemos concluir que el material inorgánico que conforma las zonas afectadas del tejido dental humano presenta características estructurales y químicas diferentes al material inorgánico de las zonas sanas. Estas diferencias se ven reflejadas en el comportamiento térmico que presentan cuando estos materiales se someten a un proceso de calentamiento. Las principales diferencias que se encontraron entre las muestras afectadas y las muestras sanas son:

- La dentina está conformada por un tamaño de cristal de HAP más pequeño que el tamaño de cristal del esmalte, pero entre el esmalte sano y afectado, no existe una diferencia significativa en el tamaño de cristal. Lo mismo sucede en el caso de la dentina sana y dentina afectada.
- La estructura de las moléculas de HAP en el esmalte están menos deformadas (son más “simétricas”) que en la dentina, pero el esmalte sano es el que presenta las estructuras moleculares más simétricas de todos y la dentina sana es la que presenta la estructura molecular mas deformada de todas. Este resultado está directamente relacionado con las impurezas observadas en estos materiales.

A pesar de lo anterior, estas diferencias no son del todo significativas en el trabajo clínico, por lo cual podemos inferir que podemos conservar la zona pigmentada de los dientes cariados durante la preparación cavitaria.

# REFERENCIAS

- [1] Kidd E. A. M., Joyston-Bechal S., Beighton D. (1993) "The use of a caries detector dye during cavity preparation: a microbiological assessment" *British Dental Journal* 174:245-248.
- [2] Yip H. K., Stevenson A. G., Beeley J.A. (1994) "The specificity of caries detector dyes in cavity preparation" *British Dental Journal* 176: 417-421.
- [3] Ansari G., Beeley J. A., Reid J. S., Foye R. H. (1999) "Caries detector dyes -an in vitro assessment of some new compounds" *J Oral Rehabilitation* 26: 453-458.
- [4] Pugach M. K., Strother J., Darling C. L., D. Fried, S. A. Gansky, S. J. Marshall and G. W. Marshall, (2009) "Dentin caries zones: mineral, structure and properties" *J Dent Res* 88: 71-76.
- [5] Tiznado-Orozco G. (2004) "Análisis estructural y químico del esmalte y dentina cariados" Tesis de M. en C. UNAM.
- [6] Yin Y., Yun S., Fang J., Chen Haifeng (2009). "Chemical regeneration of human tooth enamel under near-physiological conditions". *Chemical Communications*. RSC Publishing. DOI: 10.1039/b911407f.
- [7] Li, L., Pan H., Tao J., Xu X., Gu X., Tang R. (2008) "Repair of enamel by using hidroxyapatite nanoparticles as the building blocks" *Journal Mat Chem* 18: 4079-4084.
- [8] Pitts, N. B., Stamm, J. W. (2004) "International Consensus Workshop on Caries Clinical Trials (ICW-CCT) Final Consensus statements: Agreeing Where the Evidence Leads" *J. Dent. Res* 83:C125-C128.

## Referencias

---

[9] Zero D. Fontana M. (2009) "The biology, prevention, diagnosis and treatment of dental caries: Scientific advances in the United States" *JADA* Vol. 140.

[10] Medina J. C. (2006) "Evaluación de los métodos de diagnóstico utilizados en la detección de caries dental por odontólogos venezolanos" *Acta Odontológica Venezolana* 44(2).

[www.actaodontologica.com/ediciones/2006/2/detección\\_caries\\_dental.asp](http://www.actaodontologica.com/ediciones/2006/2/detección_caries_dental.asp)

[11] Weerheijm K.L., Groen H. J. (1999) "The residual caries dilemma" *Community Dent Oral Epidemiol* 27: 436-441.

[12] Ferreira A., Zero D. (2006). "Diagnostic tools for early caries detection" *JADA* Vol. 137:1675-1684.

[13] Ismail A. I., Sohn W., Tellez M., Amaya A., Sen A., Hasson H., Pitts N. B. (2007). "The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries". *Community Dent Oral Epidemiol* 35:170-178.

[14] Robinson C., Shore R. C., Brookes S. J., Strafford S., Wood S. R., Kikham J. (2000) "The chemistry of enamel caries" *Crit Rev Oral Biol Med* 11: 481-495.

[15] Selwitz R. H. (2008) "*The permeability of artificial dentine carious lesion*" *Arch Oral Biol* 53: 744-750.

[16] Daculsi G., LeGeros R. Z, Jean A., Kerebel B. (1987) "Possible physico-chemical processes in human dentine caries" *Journal of dental Research* 66(8):1356-1359.

## Referencias

---

- [17] Daves C. (2003) "What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid" *J Can Dent Assoc* 69 (11):722-724.
- [18] Featherstone J. D. B. (2004) "The Continuum of Dental Caries Evidence for a Dynamic Disease Process" *J Dent Res* 83(Spec Iss C):C39-C42.
- [19] Thylstrup A., Fejerskov O. (1988) "Caries" Ed. Doyma, S.A. Barcelona. Pp 338.
- [20] Moreno E. C., Aoba T. (1991) "Comparative solubility study of human dental enamel, dentin and HA" *Calcif tissue Int* 49:6-13-617.
- [21] Jenkins N. (1983) "Fisiología y bioquímica bucal". Limusa. Buenos Aires. Pp624.
- [22] Fusayama T. (1988) "Clinical guide for removing caries using a caries-detectin solution" *Quintessence International* 19 (6): 397-401.
- [23] Anderson P. (2004). "Demineralization in enamel and hydroxyapatite aggregates at increasing ionic strengths" *Archives of Oral Biology* 49:199-207.
- [24] Zavgorodniy A. V.; Rohanizadeh R and Swain, M. V, (2008). "Ultrastructure of dentine carious lesion" *Arch. Oral Biology* 53: 124-132.
- [25] Dreizen (1957) "Experimental observations on melanoidin formation in human carious teeth" *J Dent Res* 36: 233.

## Referencias

---

- [26] Reyes-Gasga J., Alvarez- Fregoso O., Vargas-Ulloa L.E. (1999) "Conductivity in human tooth enamel" *Journal of Material Science* 34: 2183-2188.
- [27] Le Geros R. Z. 1991. "Calcium phosphates in oral biology and medicine", Howard M. Myers. San Francisco, California.
- [28] Simmer, J. P. et al. (2001) "Dental enamel formations and its impact in clinical dentistry" *Journal of Dental Education* 65(9):896-905.
- [29] Eanes E. D. (1979) "Enamel Apatite: chemistry, structure and properties" *J Dent Res* 58: 829-835.
- [30] Weatherell J. A., Robinson C., Halsworth A. S. (1974) "Variations in the chemical composition of human enamel" *J Dent Res* 53: 180-192.
- [31] Gutierrez-Salazar M. P., Reyes-Gasga J. (2003) „Microhardness and chemical composition of human tooth" *Materials Res* 6: 367-373.
- [32] Sønju Clasen A.B., Ruyter I. E. (1997) "Quantitative determination of A and B carbonate in human deciduous permanent enamel by FTIR" *Adv Dent Res* 11:523.
- [33] LeGeros R. Z., Bonel G., LeGeros R. (1978) "Types of "H<sub>2</sub>O" in human enamel and in precipitated apatites" *Calcif Tissue Inter* 26: 111-118.
- [34] Margolis H. C., Lee C. Y., Moreno E. C. (1991) "Comparative solubility study of human dental enamel, dentin and hydroxyapatite" *Calcify Tissue Int* 49:6-13.

- [35] Reyes-Gasga J. (2008). "Structural and thermal behavior of human tooth and three synthetic hydroxyapatites from 20° to 600°C" *J Phys D: Appl Phys* 41:225407.
- [36] Gómez Ortega J. L., Elizondo Villarreal N. (2004) "Visualización cristalográfica de la hidroxiapatita" *Ingenierías* 7: 24.
- [37] Feki H., Savariault J.M., Ben Salah A., Jemal M. (2000) "Sodium and carbonate distribution in substituted calcium hydroxyapatite" *Solid State Science* 2 (5): 577-586.
- [38] Tang Y. (2009) "Zinc Incorporation into hydroxylapatite" *Biomaterials* 30: 2864-2872.
- [39] Kinney J. H. (2003) "The mechanical properties of human dentine: a critical review and re-evaluation of dental literature" *Crit rev Oral Biol Med* 24:827-830.
- [40] Ragazzoni E. (2007) "2D mapping of texture and lattice parameters of dental enamel" *Biomaterials* 28: 2908-2914.
- [41] Arellano Jiménez J. (2009) Tesis de Doctorado. "Análisis por microscopía electrónica y difracción de rayos X de la estructura del fosfato octacálcico obtenido por precipitación y de la hidroxiapatita obtenida por hidrólisis del mismo" UNAM.
- [42] Reyes-Gasga J. (2001) "Estudio del esmalte dental humano por microscopía electrónica y técnicas afines" *Rev LatinAm Met Mat* 21:2



## Referencias

---

- [43] Brès E. F., Barry J. C., Hutchison J. L. (1984) "A Structural basis for the dissolution of the apatite crystals of human tooth enamel" *Ultramicroscopy* 12: 367-372.
- [44] Brès, E.F., Waddington, W.G., Voegel, J.C. and Frank, R.M. (1986) "Theoretical detection of dark contrast line in twinned apatite crystals and its possible correlation with the chemical properties of human dentin and enamel crystals" *Biophysical Journal* 50: 1185-1193.
- [45] Zavgorodniy A. V., Rohanizadeh R., Bulcock S., Swain M. V., (2008) "Ultrastructural observations and growth of occluding crystals in carious dentine" *Acta Biomaterialia* 4: 1427-1439.
- [46] Araújo J.C., Saderb M.S. (2009) "Maximum substitution of magnesium for calcium sites in Mg- $\beta$ -TCP structure determined by X-ray powder diffraction with the Rietveld refinement" *Materials Chemistry and Physics* (Article in press).
- [47] Wilson R.M., Elliot J.C., Dowker E.P., Smith R.I. (2004) "Rietveld structure refinement of precipitated carbonate apatite using neutron diffraction data" *Biomaterials* 25: 2205-2213.
- [48] Ogawa K., Yamashita Y., Ichijo T., and Fusayama T. (1983) "The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentine" *J Dent Res* 62: 7-10.
- [49] Larmas M. A., Hayrynen H., Lajunen L. H. (1993) "Thermogravimetric studies on sound and carious human enamel and dentine as well as hydroxyapatite" *Scand J Dent Res* 101:185-191.

## Referencias

---

- [50] Chakraborty S., Bag S., Pal S., Mukherjee A. K. (2006) "Structural and microstructural characterization of bioapatites and synthetic hydroxyapatite using X-ray powder diffraction and Fourier transform infrared techniques" *J Appl Cryst* 39:385-390.
- [51] Weast R. C. (2002) Handbook of Chemistry and Physics. 64th ed. Boca Raton Fl. CRC Press. Pp 7-4.
- [52] Lozano L. F., Peña-Rico M. A., Heredia A., Ocotlán-Flores J., Gómez-Cortés A., Velázquez R., Belio I. A., Bucio L. (2003) "Thermal analysis study of human bone" *J Mat Sci* 38: 4777-4782.
- [53] Elliot J.C. (1994) "Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates". Elsevier:Amsterdam Pp389. ISBN 0-444-81582-1.
- [54] LeGeros R. Z., Trautz O.R., LeGeros J. P. (1968) "Carbonate substitution in the apatite structure" *Bull Soc. Chim Fr. (Special Issue)*56:1712-1718
- [55] Peroos Sherina, Du Zhimei. (2006) "A computer modeling study of the uptake, structure and distribution of carbonate defects in hydroxy-apatite". *Biomaterials* 27:2150-2161.
- [56] Zyman Z. Z., Rokhmistrov D. V., Glushko V. I. (2009) "Thermal impurity reactions and structural changes in slightly carbonated hydroxyapatite" *J. Mater Sci. Mater Med* 20:1389-1399.
- [57] Pearson A., Bocherens H., Saliege J. F., Paris F., Zeitoun V., Gerard M. (1995) "Early diagenetic evolution of bone phosphate: An X-ray

## Referencias

---

diffractometry analysis".(1990) *J Archaeological Science*.ISBN-10:0444873813.

[58] Weiner S, Bar-Yosef O. "States of preservation of bones from prehistoric sites in the near east: A survey". *J Archaeological Science* 153:1523-1525.

[59] Shemesh A. (1990)"Crystallinity and diagenesis of sedimentary apatites". *Geochimica and Cosmochimica Acta* 54:2433-2438.

# **ANEXOS**

# GABY ESTHELA TIZNADO OROZCO

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA 2007-2010

### TRABAJOS PUBLICADOS

#### *PUBLICACIONES EN REVISTAS DE CIRCULACIÓN INTERNACIONAL*

1. “Structural and thermal behaviour of human tooth and three synthetic hydroxyapatites from 20 to 600°C. J. Reyes-Gasga, R. García-García, M. JArellano-Jiménez, E. Sánchez-Pastene, **G. E. Tiznado-Orozco**, I. M. Gil-Chavarría and G. Gómez-Gasga. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **41** Issue 22 (2008) 225407.
2. “Structural and thermal behaviour of carious and sound powders of human tooth enamel and dentine”. **G.E. Tiznado Orozco**, R. García-García and J. Reyes-Gasga. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 42(2009) 235408.

#### *PUBLICACIONES EN MEMORIAS DE CONGRESOS*

##### **Congresos Internacionales**

1. “Structural and thermal behavior of human tooth of human hydroxyapatite” J. Reyes-Gasga, R. Garcia-Garcia, **G. E. Tiznado-Orozco**, E. Sanchez-Pastenes and G. Gomez-Gasga. 11th Internacional Conference on Advanced Materials ICEM 2009. Rio de Janeiro, Brasil, 20-25 de Septiembre 2009. Symp. H- 528.
2. “Structural, chemical and thermal analysis of carious powder of enamel and dentine human tooth”. **G.E. Tiznado-Orozco**, J. Reyes-Gasga, R. García-García. 10th CIASEM 1<sup>st</sup> SAMIC 2009. Memorias publicadas en Acta Microscópica Vol. 18, Supp. C, P351. 2009.
3. “Análisis estructural del esmalte y dentina cariados”. **G.E. Tiznado Orozco**, J. Reyes Gasga. 9th Congreso CIASEM. CUSCO, Perú. Septiembre 23-28, 2007. Memorias publicadas en Acta Microscópica Vol 16, No. 1-2, (supp.2) Pags. 200-201. 2007.

## Congresos Nacionales

1. “Análisis estructural y químico del esmalte y dentina cariados”. **G. E. TiznadoOrozco**, J. Reyes-Gasga. Pag. 421. **XIX Congreso Nacional e Internacional de Posgrado e Investigación en Odontología**. Acapulco, Guerrero. Del 10 al 13 de Junio. 2007.
2. “Acerca del comportamiento térmico del esmalte dental humano y tres muestras de hidroxiapatita sintética para investigar y explicar la conductividad reportada en el esmalte dental humano” J. Reyes-Gasga, R. García-García, M. J: Arellano-Jiménez, E. Sánchez-Pástenes. **G. E. Tiznado-Orozco**, I. M. Gil-Chavarría. P15. **Congreso Interno del Instituto de Física, UNAM**. Septiembre 18-19, 2008.
3. “Análisis térmico de la hidroxiapatita sintética y de la hidroxiapatita natural” J. Reyes-Gasga, R. García-García, M. J: Arellano-Jiménez, **G. E. Tiznado-Orozco**, M. I. Gil-Chavarría. **5º Foro de ingeniería e investigación en materiales**. Morelia, Michoacán, México. Noviembre. 2008.
4. “Características estructurales del comportamiento inorgánico del esmalte y dentina de dientes humanos cariados”. **G. E. Tiznado-Orozco** y J. Reyes-Gasga. **IX Congreso Nacional de Microscopía de la Asociación Mexicana de Microscopía**. Simposia Ciencias Físicas e Ingenierías. P122. Guanajuato, Guanajuato, México. 9 al 13 de Noviembre. 2008.
5. “Características químico-estructural y comportamiento térmico de los polvos de esmalte y dentina sanos y cariados” **G. E. Tiznado-Orozco** y J. Reyes-Gasga. XVII Encuentro Nacional, VIII Iberoamericano de Investigación en Odontología. Centro Histórico, México, D. F. 27 al 30 de Octubre. 2009.
6. “Comportamiento térmico de la relación Ca/P y del Índice de Cristalinidad de la hidroxiapatita sintética y del esmalte y la dentina sana y cariada. J. Reyes-Gasga, R. García-García, **G. E. Tiznado-Orozco**, A. Sánchez-Sánchez y L. García-Montiel. **X Congreso Nacional de Microscopía de la Asociación Mexicana de Microscopía A.C.** Simposia de Biomateriales y Polímeros. Morelia, Michoacán, México. 2010.

## ASISTENCIA A CONGRESOS

1. XIX Congreso Nacional e Internacional de Posgrado e Investigación en Odontología. Reunión anual de la IADR. Acapulco, Guerrero. 10 al 13 de Junio. 2007.

2. IX Congreso Nacional de Microscopía Electrónica de la Asociación Mexicana de Microscopía A. C. Ciudad de Guanajuato, Guanajuato, México. 9 al 13 de Noviembre del 2008.
3. Congreso Interno del Instituto de Física, UNAM, México, D.F. Septiembre 18-19, 2008.
7. XVII Encuentro Nacional VIII Iberoamericano de Investigación en Odontología. Centro Histórico, México, D. F. 27 al 30 de Octubre. 2009.

### **PARTICIPANTE EN PROYECTOS REALIZADOS**

1. “Síntesis, caracterización estructural y química de la interfase hidroxiapatita-fosfato octocálcico”. Programa de apoyo a proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT). Proyecto No. IN117906-2. Enero 2006-Diciembre 2007. Corresponsable con el Dr. Ramiro García García.
2. “Interfase hidroxiapatita-fosfato octocálcico”. Programa de apoyo a proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT). Proyecto No. IN111808-2. Enero 2008-Diciembre 2009. Corresponsable con el Dr. Ramiro García García.

### **ACTIVIDADES ACADÉMICO-ADMINISTRATIVAS**

1. Ayudante de profesor. Patología General e Inmunología Clínica. Facultad de Odontología. Semestre 2007-2.
2. Ayudante de profesor. Patología General e Inmunología Clínica. Facultad de Odontología. Semestre 2008-1.
3. Ayudante de profesor. Patología General e Inmunología Clínica. Facultad de Odontología. Semestre 2008-2.
4. Ayudante de profesor. Patología General e Inmunología Clínica. Facultad de Odontología. Semestre 2009-1.