



Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Odontología

**“Efecto de los Compuestos Fluorados en el Esmalte Dental
Subsuperficial en Condiciones de pH Cíclico”**

T E S I S

**Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS**

Presenta:

C.D.E.O. Cecilia Carlota Barrera Ortega

Director: Dr. Miguel Ángel Araiza Téllez

Asesor: Dr. Roberto Ysacc Sato Berrú

México D.F., Octubre 2011.



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

En este gran trabajo se refleja parte de mi vida, su realización estuvo siempre bajo la mirada, cuidado y apoyo de personas e Instituciones que confiaron en mí y a ellos quiero manifestar mi gratitud.

A mi *Alma Mater* la Universidad Nacional Autónoma de México que me ha dado la oportunidad desde la preparatoria de lograr y continuar mi formación profesional.

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

A la Dra. Aida Borges Yáñez coordinadora del Programa de Salud Pública Bucal por la ayuda en el tratamiento estadístico de las pruebas de Microdureza y Análisis de Componentes Principales.

Al jefe del Laboratorio de Materiales Dentales, el Dr. Carlos Álvarez Gayosso así como a todo el personal del Laboratorio por las facilidades que me otorgaron para la realización del experimental.

Del Instituto de Física de la UNAM.

A la Dra. Rebeca Trejo Luna, por su apoyo en la prueba de Microdureza así como también al Sr. Melitón García Galindo; al Dr. Jesús Ángel Arenas Alatorre por su apoyo incondicional en las pruebas de caracterización que llevamos a cabo: Microscopía Electrónica de Barrido, Análisis Elemental, Difracción de Rayos X, Microscopía de Fuerza Atómica y todo lo referente a Cristalografía; a la Maestra Jacqueline Cañetas, Ing. Cristina Zorrilla, Ing. Mario Monroy, por su ayuda en las muestras observadas por MEB y EDS.

Del Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, UNAM.

Al Director José Manuel Saniger Blesa, a la Dra. América Rosalba Vázquez Olmos, al Dr. Roberto Ysacc Sato Berrú y al Dr. José Ocotlán Flores Flores por ser parte fundamental en el proceso del desarrollo y la obtención del experimental μ -Raman siendo un área de exploración nueva por el tipo de muestra utilizada.

Y por último, pero más importante, deseo manifestar mi agradecimiento para las personas que con su influencia hacen de mí un recipiente perfecto, donde se funde la paciencia, prudencia, tolerancia, madurez y la superación personal, familiar y profesional.

A Guadalupe Jiménez por acompañarme en el camino de mi vida; por el apoyo, confianza, solidez y lógica que me das día con día.

Al Dr. Miguel Ángel Araiza Téllez, porque con su dedicación, profesionalismo y paciencia, me ha demostrado que el límite de nuestros horizontes está en nuestra conciencia y que el conocimiento es inagotable.

*La ciencia apenas sirve más que para darnos una idea
de la extensión de nuestra gran ignorancia.*
Lamennais

ÍNDICE

I.	RESUMEN	1
II.	SUMMARY	2
III.	INTRODUCCIÓN	3
IV.	CONCEPTOS GENERALES	
A)	Formación y mineralización del esmalte dental	4
B)	Influencia del medio ambiente en la estructura del esmalte	7
C)	Compuestos Fluorados	9
1.	Soluciones	11
2.	Barnices	12
3.	Geles	13
D)	Valoración de cambios en la superficie del esmalte	14
1.	Técnicas Instrumentales Microscopía Electrónica de Barrido, Espectroscopía por Dispersión de Energía de Rayos X y Difracción de Rayos X	14
2.	Microdureza (MD) Dental	17
3.	μ -Raman	20
E)	Modelos in vitro (pH cíclico y lesión inicial)	24
1.	Modelo Ten Cate	24
2.	Modelos Modificados	25
V.	METODOLOGÍA	
A)	Planteamiento del Problema	26
B)	Justificación	26
C)	Objetivo General	27
D)	Objetivos Particulares	27
E)	Hipótesis	27
1.	Trabajo	27
2.	Nula	27
F)	Variables	
1.	Variable Independiente 1: Di-Fluor Silano (DFS)	
a)	Definición Conceptual	28
b)	Definición Operacional	28
c)	Escala de medición	28

2.	Variable Independiente 2:Fluoruro de Plata Amoniacal (FPA)	
a)	Definición Conceptual.....	28
b)	Definición Operacional	28
c)	Escala de medición	28
3.	Variable Independiente 3:Fluoruro Fosfato Acidulado (FFA)	
a)	Definición Conceptual.....	29
b)	Definición Operacional	29
c)	Escala de medición.	29
4.	Variable Dependiente 1: Microdureza dental subsuperficial	
a)	Definición Conceptual.....	29
b)	Definición Operacional	29
c)	Escala de Medición	29
5.	Variable Dependiente 2: Identificación de grupos OH ⁻ y PO ₄ ³⁻	
a)	Definición Conceptual.....	30
b)	Definición Operacional	30
c)	Escala de Medición	30
G)	Tipo de estudio.....	30
H)	Universo de Trabajo.	30
I)	Población en estudio.	30
J)	Selección y tamaño de la muestra.....	30
1.	Criterios de Participación.....	31
VI.	EXPERIMENTAL	
A)	Recursos	32
1)	Materiales.....	32
2)	Biológicos	32
3)	Reactivos Químicos.....	32
4)	Equipos	33
5)	Infraestructura	33
6)	Financiamiento	33
B)	Método	34
1.	Prueba Piloto.....	34
2.	Preparación de los especímenes	34
3.	pH Cíclico	35
4.	Montaje en soportes acrílicos.....	36
5.	Indentaciones	38
6.	Espectros μ -Raman.....	42

VII.	RESULTADOS	
1.	Microdureza.....	45
2.	μ -Raman.....	59
VIII	ANÁLISIS DE RESULTADOS	
1.	Microdureza.....	72
2.	Dispersión Raman	81
IX.	DISCUSIÓN	104
X.	CONCLUSIONES	111
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
XIII.	ANEXOS	117
XIV.	Trabajos presentados en eventos académicos.....	121

GLOSARIO

ACP	Análisis de Componentes Principales
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
DE	Desviación Estándar
DFS	Di-Fluor Silano
DRX	Difracción de Rayos X
DS	Diferencia significativa
FA	Fluorapatita
FFA	Fluoruro Fosfato Acidulado
f_g	Fuerza-gramos
NaF	Fluoruro de Sodio
FPC-FCA	Fosfo-Péptido de Caseína y Fosfato de Calcio Amorfo
FPA	Fluoruro de Plata Amoniacal
GC	Grupo Control
HA	Hidroxiapatita
HVN	Hardness Vickers Number
IR	Infra Rojo
M	Media
MD	Microdureza
MEB	Microscopio Electrónico de Barrido
Med	Mediana
mM	mili-Molar
pH	potencial de Hidrógeno
s	Segundos
Sig	Significancia
UAD	Unión Amelo-Dentinaria
μm	Micrómetros
$\mu\text{-R}$	Micro Raman
nm	Nanómetros

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema de la hidroxiapatita.	4
Figura 2.- Esquema de los prismas del esmalte.	5
Figura 3.- Diagrama del cristal de hidroxiapatita.	6
Figura 4.- Proyección de una superficie plana de hidroxiapatita.	7
Figura 5.- Esquema tridimensional de la molécula de fluorapatita..	10
Figura 6.- Fluoruro de Plata Amoniacal, Saforide™ (FPA).....	11
Figura 7.- Di-Flúor Silano, Fluor Protector™ (DFS).....	13
Figura 8.- Fluoruro Fosfato Acidulado, Sultán™ (FFA)	14
Figura 9.- Esquema del Microscopio Electrónico de Barrido	15
Figura 10.- Diagrama de interacción del haz de electrones.	17
Figura 11.- Esquema de la Indentación en modo Vickers..	18
Figura 12.- Microdurómetro	20
Figura 13.- Esquema del efecto bifotónico de Raman	21
Figura 14.- Modelo de pH cíclico	24
Figura 15.- Esquema del modelo de pH cíclico	36
Figura 16.- Muestra preparada para corte longitudinal.....	36
Figura 17.- Sección longitudinal de la muestra	37
Figura 18.- Horno de temperatura controlada	37
Figura 19.- Montaje de la muestra en cubos de acrílico	38
Figura 20.- Colocación del espécimen en el microdurómetro.....	38
Figura 21.- Distribución de indentaciones a 50, 100 y 150µm.....	39
Figura 22.- Distribución de indentaciones en sentido oclusal, medio y cervical.	39

Figura 23.- Indentación y diagonales horizontal (d_h) y vertical (d_v).....	40
Figura 24.- Grupo Sano visto por microdurómetro 40X.....	40
Figura 25.- Grupo FFA a 15 días de tratamiento	41
Figura 26.- Grupo FPA a 15 días de tratamiento	41
Figura 27.- Grupo DFS a 15 días de tratamiento.	42
Figura 28.- Muestra sobre portaobjetos del μ -Raman.....	43
Figura 29.- Distribución de microdureza a $50\mu\text{m}$ en sentido oclusal.....	46
Figura 30.- Distribución de microdureza a $100\mu\text{m}$ en sentido oclusal.....	47
Figura 31.- Distribución de microdureza a $150\mu\text{m}$ en sentido oclusal.....	47
Figura 32.-Distribución de microdureza a $50\mu\text{m}$ en sentido medio.....	48
Figura 33.- Distribución de microdureza a $100\mu\text{m}$ en sentido medio.....	48
Figura 34.- Distribución de microdureza a $150\mu\text{m}$ en sentido medio.....	49
Figura 35.- Distribución de microdureza a $50\mu\text{m}$ en sentido cervical.....	49
Figura 36.- Distribución de microdureza a $100\mu\text{m}$ en sentido cervical	50
Figura 37.- Distribución de microdureza a $150\mu\text{m}$ en sentido cervical.....	50
Figura 38.- Comportamiento del grupo DFS en sentido oclusal.....	51
Figura 39.-Comportamiento del grupo FPA en sentido oclusal.....	52
Figura 40.- Comportamiento del grupo FFA en sentido oclusal	52
Figura 41.- Comportamiento del grupo GC en sentido oclusal.....	53
Figura 42.-Comportamiento del grupo DFS en sentido medio.....	53
Figura 43.-Comportamiento del grupo FPA en sentido medio.....	54
Figura 44.- Comportamiento del grupo FFA en sentido medio.....	55
Figura 45.- Comportamiento del grupo GC en sentido medio.....	55

Figura 46.- Comportamiento del grupo DFS en sentido cervical	56
Figura 47.- Comportamiento del grupo FPA en sentido cervical.	57
Figura 48.- Comportamiento del grupo FFA en sentido cervical.	57
Figura 49.- Comportamiento del grupo GC en sentido cervical.....	58
Figura 50.- Espectros μ -Raman del grupo sano.	59
Figura 51.- Espectros μ -Raman del grupo DFS a 5 días.....	60
Figura 52.- Espectros μ -Raman del grupo DFS a 10 días.....	61
Figura 53.- Espectros μ -Raman del grupo DFS a 15 días.....	62
Figura 54.- Espectros μ -Raman del grupo FFA a 5 días	63
Figura 55.- Espectros μ -Raman del grupo FFA a 10 días	64
Figura 56.- Espectros μ -Raman del grupo FFA a 15 días	65
Figura 57.- Espectros μ -Raman del grupo FPA a 5 días.....	66
Figura 58.- Espectros μ -Raman del grupo FPA a 10 días.....	67
Figura 59.- Espectros μ -Raman del grupo FPA a 15 días.....	68
Figura 60.- Espectros μ -Raman del GC a 5 días.	69
Figura 61.- Espectros μ -Raman del GC a 10 días.	70
Figura 62.- Espectros μ -Raman del GC a 15 días	71
Figura 63.- Distribución de las observaciones del grupo tratado con DFS a 50, 100 y 150 μm de profundidad.	92
Figura 64.- Distribución de las observaciones del grupo tratado con FFAa 50, 100 y 150 μm de profundidad.	93
Figura 65.- Distribución de las observaciones del grupo tratado con FPA a 50, 100 y 150 μm de profundidad.	94

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Distribución del número de espectros (μ -Raman)	44
Cuadro 2.- Distribución del número de indentaciones (Microdureza).....	45
Cuadro 3.- Distribución de las medidas de tendencia central	75
Cuadro 4.- Distribución general de las indentaciones por grupo experimental	76
Cuadro 5.- Frecuencias de las medianas de todos los grupos (microdureza).	76
Cuadro 6.- Resultados de Chi-Cuadrada en profundidades	77
Cuadro 7.- Resultados de Chi-Cuadrada en los sentidos.	77
Cuadro 8.- Resultados de Chi-Cuadrada en pH cíclico.....	78
Cuadro 9.- Resultados de rangos de los valores de microdureza (HVN).	79
Cuadro 10.- Asociación estadística (Wilcoxon) con valores de microdureza y grupos experimentales	80

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.- Espectros de la Hidroxiapatita sintética	23
Gráfica 2.- Histograma de distribución no normal de microdureza.....	72
Gráfica 3.- Histograma de distribución de microdureza comparando sentidos con profundidades	73
Gráfica 4.- Distribución de microdureza de grupos experimentales en diferentes sentidos	74
Gráfica 5.- Distribución de la variable independiente con el modelo de pH cíclico.	75
Gráfica 6.- Espectros representativos de los grupos experimentales a 100 μm , durante 5 días de tratamiento	81
Gráfica 7.- Espectros representativos de los grupos experimentales a 100 μm , durante 10 días de tratamiento	82
Gráfica 8.- Espectros representativos de los grupos experimentales a 100 μm , durante 15 días de tratamiento	83
Gráfica 9.- Espectros μ -Raman representativos del grupo Sano.	84
Gráfica 10.- Espectros μ -Raman representativos del grupo DFS.	85
Gráfica 11.- Espectros μ -Raman representativos del grupo FFA.....	86
Gráfica 12.- Espectros μ -Raman representativos del grupo FPA.....	87
Gráfica 13.- Espectros μ -Raman representativos del GC.	88
Gráfica 14.- Dispersión del análisis de componentes principales (ACP) del grupo tratado con FFA	89
Gráfica 15.- Dispersión del análisis de componentes principales (ACP) del esmalte tratado con DFS	90
Gráfica 16.- Dispersión del análisis de componentes principales (ACP) del esmalte tratado con FPA	91
Gráfica 17.- Dispersión de los grupos tratados a 5 días a 50 μm	95

Gráfica 18.- Dispersión de los grupos tratados a 5 días a 100 μm	96
Gráfica 19.- Dispersión de los grupos tratados a 5 días a 150 μm	97
Gráfica 20.- Dispersión de los grupos tratados a 10 días a 50 μm	98
Gráfica 21.- Dispersión de los grupos tratados a 10 días a 100 μm	99
Gráfica 22.- Dispersión de los grupos tratados a 10 días a 150 μm	100
Gráfica 23.- Dispersión de los grupos tratados a 15 días a 50 μm	101
Gráfica 24.- Dispersión de los grupos tratados a 15 días a 100 μm	102
Gráfica 25.- Dispersión de los grupos tratados a 15 días a 150 μm	103

I. RESUMEN

Los compuestos fluorados promueven la incorporación del ión F^- en la molécula de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH_2)]$ mediante intercambio iónico por el grupo hidroxilo, transformándola en Fluorapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6F_2]$. **Objetivo:** Determinar el efecto de los compuestos fluorados sobre la subsuperficie del esmalte dental desmineralizado mediante la prueba de Microdureza y μ -Raman. **Método:** 65 molares fueron extraídos por indicación ortodóncica, fueron seccionados longitudinalmente (N=130) y se distribuyeron aleatoriamente para recibir los siguientes tratamientos; Fluoruro Fosfato Acidulado ([FFA] Sultán™, n=30); Di-Flúor Silano ([DFS] Fluor Protector™, n=30); Fluoruro de Plata Amoniacal ([FPA] Saforide™, n=30), y un grupo control que no recibió tratamiento (GC, n=30). Los especímenes estuvieron inmersos en pH cíclico durante 5, 10 y 15 días; un grupo de 5 dientes, también seccionado (Sano, n=10) no se le realizó lesión inicial y no estuvo en pH cíclico. Se determinó la microdureza (MD) en modo Vickers (25g_f/20seg), en sentido oclusal, medio y cervical y a 50, 100 y 150 μ m de profundidad. La prueba μ -Raman se determinó en un Espectroscopio μ -Raman mediante análisis puntual en la subsuperficie del esmalte a 50, 100, 150 μ m. Los datos fueron tratados estadísticamente con el programa SPSS v.15 con Kruskal-Wallis, Chi-Cuadrada y Wilcoxon para MD y para μ -R con el programa MATLAB™ R2010 con la prueba de Análisis de Componentes Principales (ACP). **Resultados:** En MD se obtuvieron los siguientes datos; 50 μ m (Med=110.0 \pm 66.53), 100 μ m (Med=112.0 \pm 68.96), 150 μ m (Med=116.0 \pm 73.04); en sentido oclusal (Med=112.0 \pm 66.91), en sentido medio (Med=112.0 \pm 69.13) y en sentido cervical (Med=116.0 \pm 72.65). Grupo Sano (Med=254.0 \pm 53.19), DFS (Med=110.0 \pm 55.10), FPA (Med=116.0 \pm 55.19), FFA (Med=93.20 \pm 66.12), GC (Med=107.0 \pm 60.42). A 0 días (Med=254.0 \pm 53.24), 5 días (Med=122.0 \pm 55.03), 10 días (Med=110.0 \pm 59.50) y 15 días (Med=81.8 \pm 60.78). En μ -R el rango de varianza fue; DFS (ACP₁ 91.50% vs ACP₂ 8.16%); FFA (ACP₁ 91.67% vs ACP₂ 7.95%); y FPA (ACP₁ 76.34% vs ACP₂ 19.25%). **Conclusiones:** En MD no hubo diferencias estadísticamente significativas en profundidad y sentido, pero si en días de tratamiento y en grupos experimentales. El FFA obtuvo los valores más altos de microdureza seguido del DFS y FPA. En μ -R, el FFA y DFS presentaron espectros que coinciden con el grupo Sano donde se observaron las bandas características del grupo PO_4^{3-} (963.2 cm^{-1}) y OH^- (3581.9 cm^{-1}).

Palabras clave: *esmalte, compuestos fluorados, microdureza, dispersión μ -Raman*

Trabajo financiado: Proyecto IN 113108, PAPIIT. DGAPA-UNAM.

II. SUMMARY

Fluorine in contact with hydroxyapatite [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$] promote the exchange of fluoride ion at the hydroxyl group, transforming it into fluorapatite [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$] and the properties of dental enamel. **Objective:** The aim of this study was to determine the effect of fluorine compounds on subsurface of demineralized dental enamel by Vickers microhardness test (Hv) and μ -Raman characterization. **Method:** Sixty five human molars extracted by orthodontic reasons were used. They were mesio-distally sectioned, and an initial lesion was produced in 120 samples by immersion in demineralizing solution of [$\text{CaCl}_2 + \text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{CH}_3\text{COOH}$] for 96 hours, at 4.4 pH at controlled temperature (37°C). Other group of dental enamel ($n=10$) without initial lesion was considered as baseline. Demineralized samples were distributed as follows: Positive Control Group [CG ($n=30$)] and experimental groups were treated with applications of Di-Fluoride Silane [DFS, Fluor Protector™ ($n=30$)], Diammine Silver Fluoride [DSF, Saforide™ ($n=30$)] and Acidulated Phosphate Fluoride [APF, Sultan™ ($n=30$)] following the manufacturer instructions; these samples were stored in alternating demineralizing (pH 4.4) and remineralizing (pH 7.0) solutions of [$\text{CaCl}_2 + \text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{KCl}$]. After experimental period each sample was longitudinally sectioned. Microhardness Vickers (HV) was determined in a Matuzawa MHT2 (25gf/20seg) and μ -Raman System (Nicolet, Almega XR™), at occlusal, middle and cervical locations and 50, 100 and 150 μm from surface to dentin enamel junction. Data were statistically treated with SPSS v.15 with Kruskal Wallis, Chi-square and Wilcoxon to HV, and Principal Component Analysis (PCA) to μ -Raman spectra were treated with MATLAB™ R2010. **Results:** HV following data were obtained, 50 μm (Med=110.0 \pm 66.53), 100 μm (Med=112.0 \pm 68.96), 150 μm (Med=116.0 \pm 73.04), in occlusal direction (Med=112.0 \pm 66.91), medium (Med=112.0 \pm 69.13) and cervical (Med=116.0 \pm 72.65). Healthy Group (Med=254.0 \pm 53.19), DFS (Med=110.0 \pm 55.10), DSF (Med=116.0 \pm 55.19), FPA (Med=93.20 \pm 66.12), CG (Med=107.0 \pm 60.42). At 0 days (Med=254.0 \pm 53.24), 5 days (Med=122.0 \pm 55.03), 10 days (Med=110.0 \pm 59.50) and 15 days (Med=81.8 \pm 60.78). μ -Raman spectra ($N=490$) in order to PCA in the range of variance for DFS (PCA₁ 91.50% vs PCA₂ 8.16%), FPA (PCA₁ 91.67% vs 7.95%PCA₂), and the DSF (PCA₁ 76.34% vs PCA₂ 19.25%). When compared the expression of functional groups, FPA and DFS spectra at 50, 100 and 150 μm showed intensity peaks corresponding to those identified in the non demineralized dental enamel, where the characteristic bands of the PO_4^{3-} (900 cm^{-1}) and OH^- (3500 cm^{-1}) were identified. **Conclusions:** HV no significant differences in depth and meaning, but in days of treatment and experimental groups. The APF was the highest microhardness values followed by DFS and DSF. The FPA and DFS have the effect of recovering the mineralization of dental enamel, with the exception of the DSF. Functional groups OH^- and PO_4^{3-} were identified in the subsurface.

Keywords: enamel, fluoride compounds, microhardness, Raman spectroscopy

Work supported by Project IN-113108, PAPIIT.DGAPA-UNAM.

III. INTRODUCCIÓN

El F⁻ pertenece al grupo de los halógenos [Cl⁻, Br⁻, I⁻ y At⁻], es el elemento químico más electronegativo en la tabla periódica, y su actividad química le permite combinarse casi con cualquier elemento, así como con radicales orgánicos. En la naturaleza se encuentra en compuestos minerales tales como la fluorita, criolita y la apatita. En los tejidos biológicos mineralizados: huesos y dientes, se encuentra en la forma de hidroxiapatita fluorada $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\text{-F}_2$.

En los sistemas biológicos mineralizados se ha encontrado que el fluoruro administrado de manera tópica, comprimidos o pastas fluoradas, participa de manera importante en los mecanismos de mineralización de la unidad fundamental del esmalte (prismas de hidroxiapatita), modificando la composición química, e incrementando la resistencia a la disolución en un ambiente ácido.

Con la finalidad de inhibir la formación de lesiones desmineralizadas y la evolución a lesiones cariosas, en la actualidad se aplican compuestos fluorados a la superficie externa del esmalte. Sin embargo, la falta de información sobre los diferentes vehículos o concentraciones de los compuestos fluorados, así como la extensión del efecto en el esmalte, lleva a que el uso de estos compuestos sea exagerado y por momentos ineficaz en odontología preventiva. Con esta perspectiva, en la siguiente investigación se comparan 3 diferentes compuestos fluorados aplicados al esmalte dental desmineralizado con el propósito de evaluar la microdureza del esmalte dental subsuperficial en sentido superior medio e inferior, a 50, 100 y 150 μm de profundidad y en pH cíclico a 5, 10 y 15 días de tratamiento. Se identificarán los grupos funcionales presentes en la hidroxiapatita (grupo OH⁻ y grupo PO₄³⁻) y así podremos determinar que compuesto fluorado tiene mayor efecto sobre la microdureza del esmalte dental subsuperficial, e identificar los grupos funcionales OH⁻ y PO₄³⁻ que se encuentra en la hidroxiapatita.

IV. CONCEPTOS GENERALES

A) Formación y mineralización del esmalte dental.

El esmalte dental es el tejido más duro del organismo debido a que estructuralmente está constituido por millones de prismas altamente mineralizados que lo recorren en todo su espesor, desde la unión amelo-dentinaria (UAD) a la superficie externa o libre en contacto con el medio bucal.⁽¹⁾

El esmalte dental está constituido por una matriz inorgánica (95%) de cristales de hidroxiapatita (HA) $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH_2)]$ (Fig. 1) y una matriz orgánica (3%). Por su composición y características es semejante a otros tejidos mineralizados del cuerpo, como el hueso, la dentina y el cemento periodontal.⁽²⁾

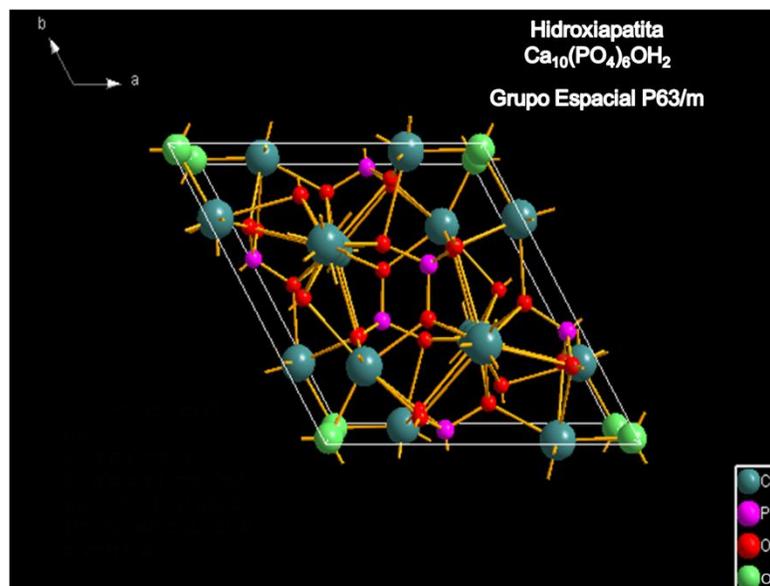


Figura1.- Esquema de la hidroxiapatita. Fuente Diamond 3.1a TM Crystal Impact GbR, Bonn, Germany.

A continuación se mencionan las características que hacen al esmalte un tejido único.⁽³⁾

- Embriológicamente deriva del órgano del esmalte.
- No participa el colágeno en su composición química.
- Los cristales de HA son susceptibles a la acción de los ácidos.

- Los ameloblastos involucionan por apoptosis durante la erupción dental.
- El esmalte maduro no contiene células por eso se considera como sustancia extracelular altamente mineralizada.
- Es incapaz de repararse, aunque existe el fenómeno de remineralización.

El esmalte por su superficie externa está en relación directa con el medio bucal, en el cuello dentario, el esmalte se relaciona con la encía por medio de la unión dentogingival. El espesor del esmalte no es constante y varía en las distintas piezas dentarias y aun en las distintas zonas de un mismo diente. En general, el espesor decrece desde el borde incisal o de las cúspides hacia la región cervical. El espesor máximo es de 2 a 3 mm (Fig. 2) con una orientación de los prismas que depende de la zona del diente.

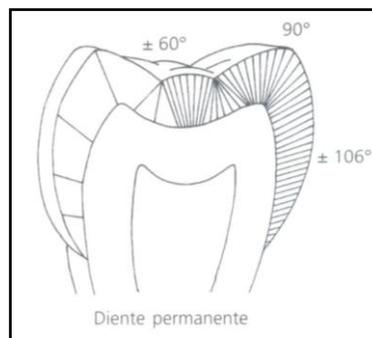


Figura 2.- Esquema de la disposición de los prismas del esmalte y los ángulos que forman con la superficie externa.⁽³⁾

Algunas propiedades físicas del esmalte son:

- Dureza.- Está relacionada directamente con el grado de mineralización.
- Elasticidad.- Es muy escasa y depende de la cantidad de agua y de sustancia orgánica que posee. Es un tejido frágil y la mayor elasticidad se presenta en el cuello del diente por tener mayor contenido de sustancia orgánica.
- Color y Transparencia.- Es translúcido dependiendo de las estructuras subyacentes, en especial de la dentina, en zonas de mayor espesor el tono es grisáceo y en zonas más delgadas es blanco amarillento. La

transparencia se atribuye a variaciones en el grado de calcificación y homogeneidad del esmalte.

- d) Permeabilidad.- Es extremadamente escasa y solo algunos iones presentes en el medio permiten una difusión pero es sólo hasta 30 μm en la subsuperficie.
- e) Radiopacidad.- Es muy alta por su alto grado de mineralización.

A continuación se mencionan las fases de la composición del esmalte:

- a) Matriz orgánica.- Es de naturaleza proteica, y en ésta se encuentran las amelogeninas, enamelinas, ameloblastinas y tuftelinas.
- b) Matriz inorgánica.- Está constituida por sales minerales cálcicas básicamente fosfatos y carbonatos. Los cristales alcanzan una longitud de 100-1000 nm, un ancho de 30-70 nm y una altura de 10-40 nm (Fig.3).

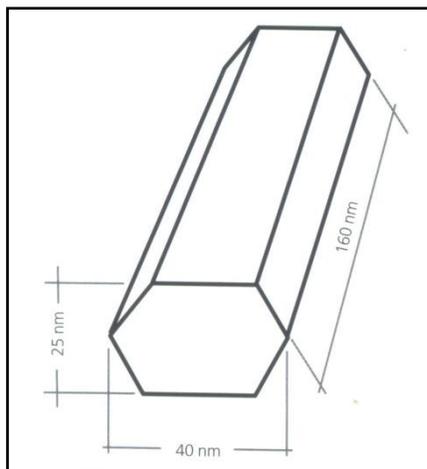


Figura 3.- Diagrama del cristal de hidroxiapatita.⁽³⁾

Los cristales de hidroxiapatita están constituidos por celdas unitarias con una configuración cristalográfica de tipo hexagonal, en cuyos vértices existen iones calcio y en el centro se localiza el grupo hidroxilo (Fig. 4).

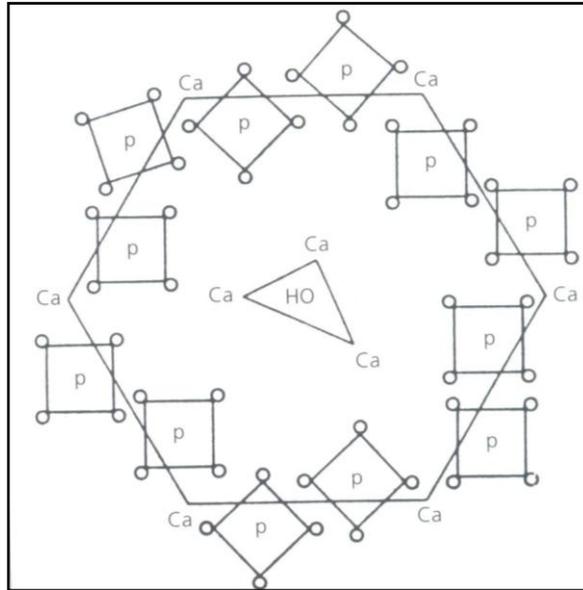


Figura 4.- Proyección de una superficie plana de los iones que conforman la estructura cristalina de la HA. ⁽³⁾

- c) Agua.- Es el tercer componente de la composición química del esmalte. Se localiza en la periferia del cristal constituyendo la denominada esfera de hidratación. Por debajo y hacia el interior en el cristal, se ubica la denominada esfera de iones y compuestos absorbidos, en la que el catión²⁺ puede ser sustituido por Na⁺, Mg²⁺, e H₃O⁺ y el anión OH⁻ por F⁻ Cl⁻ etc. El porcentaje de agua disminuye progresivamente con la edad.

B) Influencia del medio ambiente en la estructura del esmalte.

La caries dental es una enfermedad infecciosa, que causa la destrucción local de los tejidos duros del diente, y se asocia a la dieta, la acumulación de microorganismos y las condiciones de la saliva. El desarrollo de una lesión de caries clínicamente visible es una consecuencia de la interacción de varios factores de la cavidad oral y los tejidos dentales.⁽⁴⁾ Fermentación de carbohidratos por las bacterias de la placa dental que conduce a la formación de diversos ácidos inorgánicos, causando una disminución en el pH. Cuando el pH de la cavidad oral alcanza un valor crítico de 5.5, sucede una subsaturación de Ca⁺² y PO₄⁻³ y se producen iones. La tendencia es, por lo tanto, la pérdida de los iones de los dientes con el medio ambiente, lo que se

denomina desmineralización; ésta puede dar lugar a lesiones de caries. Cuando el pH se vuelve superior a 5.5 a través de la acción amortiguadora de la saliva, sucede una sobresaturación de Ca^{+2} y PO_4^{-3} en el medio. En esta situación, la tendencia es incorporar los iones al diente, este fenómeno se conoce como remineralización.⁽⁵⁾

Existe un constante intercambio iónico entre los tejidos dentales y el medio ambiente, buscando siempre el equilibrio. Los estudios han demostrado que el uso de fluoruros provoca una disminución de la caries. Una serie de investigaciones han demostrado la importancia de los fluoruros en la desmineralización y la remineralización, en el control de la aparición de caries, cuando el fluoruro está presente constantemente en el medio bucal.⁽⁶⁾

Cabe mencionar que la saliva y sus componentes mucosos mantienen los dientes húmedos y recubiertos para ayudar a su preservación por virtud de la presencia de iones de calcio y de fósforo, protegiendo así al esmalte de disolución por ácidos; la saliva tiene constituyentes orgánicos e inorgánicos. Un litro de saliva humana consta de 994 g de agua, 1 g de sólidos en suspensión y 5 g de sustancias disueltas de las cuales 2 g son de materia orgánica y 3 g de materia inorgánica. Los iones de sodio y potasio son los constituyentes inorgánicos más abundantes en saliva. Las concentraciones del ión Sodio y de ión Cloruro aumentan con la velocidad del flujo salival. Dentro de los constituyentes inorgánicos de la saliva se encuentran los siguientes:⁽⁷⁾

- Sodio 14.8 mg/L
- Potasio 22.1 mg/L
- Calcio 3.1 mg/L
- Magnesio 0.6 mg/L
- Cloruro 10.0 mg/L
- Fósforo 193.0 mg/L
- Azufre 149.0 mg/L

Dentro de los componentes orgánicos de la saliva se encuentran la Glucosa (200 mg/L), Colesterol (80 mg/L), Creatina (10 mg/L), Urea, (200 mg/L), Ácido Úrico (15 mg/L), y otros componentes de la glándula parótida.⁽⁷⁾

La remineralización es el proceso natural de reparación de las lesiones cariosas. Se sabe de la remineralización por lo menos hace cien años. Sin embargo, es sólo en las últimas décadas que la importancia terapéutica de la remineralización ha sido en general aceptada. Administrar de forma tópica el fluoruro en varios vehículos ha producido importantes reducciones en la prevalencia y la incidencia de caries dental. Cuando el desafío bacteriano es alto o los componentes de la saliva faltan, la remineralización es insuficiente para detener o revertir el proceso de caries. Hay una necesidad de encontrar formas para mejorar el proceso de remineralización y la transferencia de tales conocimientos es la terapéutica clínica.⁽⁸⁾

La desmineralización y la remineralización son procesos de la caries dental que a menudo se describen como el único evento físico-químico. Aunque esto permite una comprensión más fácil, descripción y mecanismo de este proceso de la enfermedad, la caries dental es mucho más compleja. La caries dental es una enfermedad multifactorial que incluye la participación de bacterias cariogénicas y otros componentes salivales (proteínas, enzimas, calcio, fósforo, flúor) y las fuentes alimentarias de fermentación, hidratos de carbono (sacarosa, glucosa). La integridad del esmalte se altera después de la formación de una biopelícula dental (película adquirida y placa dental), y el proceso de la caries se produce a lo largo de la interfaz entre la biopelícula dental y la superficie del esmalte.⁽⁹⁾

C) Compuestos Fluorados

La mayoría de los tratamientos y protocolos para el estudio de la prevención o reducción de la pérdida de esmalte se han estudiado en las condiciones de una lesión inicial (erosión), tales como el uso de aplicaciones tópicas en muestras de dientes, aplicaciones individuales de algunos fluoruros, etc. y esto se ha demostrado para proteger de manera significativa el esmalte dental frente a un desafío ácido. Sin embargo, *in vitro* e *in situ* las pruebas de la persistencia de un efecto en las medidas preventivas son necesarias y pueden proporcionar información útil, por ejemplo, durante el desarrollo de productos, con el fin de determinar regímenes apropiados.

(10)

El flúor (F^-), es el elemento más electronegativo, y por esto tiene la capacidad de combinarse casi con cualquier elemento químico así como con radicales orgánicos. Los tejidos biológicos mineralizados en el cuerpo humano: huesos y dientes, están compuestos de una fase inorgánica (hidroxiapatita, HA), la cual en presencia del fluoruro reacciona convirtiéndose en fluorapatita [$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$]. (FA), la cual es una fase cristalina (Fig.5) con mayor resistencia a los ácidos.⁽¹¹⁾

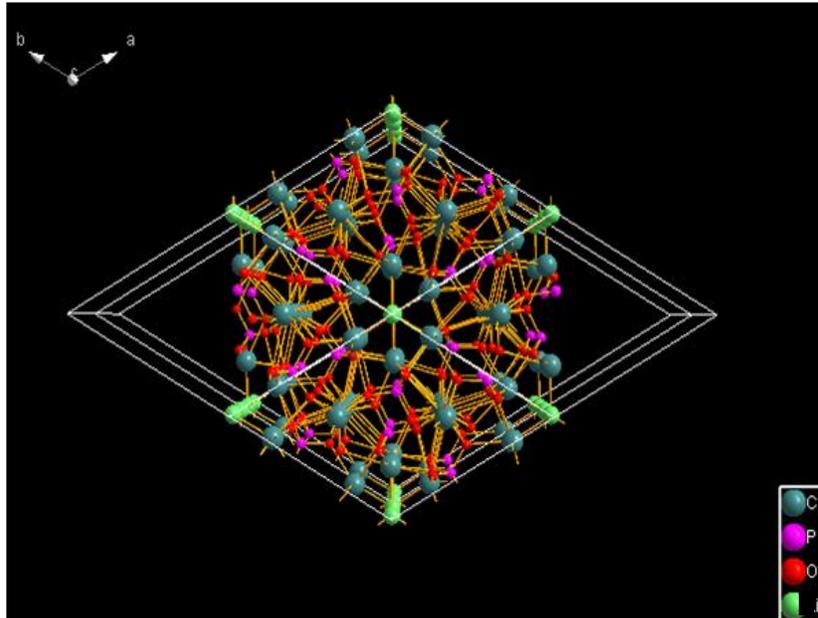


Figura 5.- Esquema tridimensional de la molécula de fluorapatita.
Fuente Diamond 3.1a TM Crystal Impact GbR, Bonn, Germany.

En odontología se utiliza el fluoruro para revertir el proceso de desmineralización dental, mediante el aumento del gradiente de flúor en el medio bucal, ya sea de origen intrínseco o extrínseco. El efecto más importante del fluoruro es el control de la enfermedad de la caries dental, el incremento del pH bucal, así como el aumento de la resistencia a la desmineralización ácida y la interferencia con la formación y funcionamiento de la placa dental.⁽³⁾ El fluoruro es incorporado a diversos vehículos, que en el caso del uso terapéutico en odontología, los más utilizados son los geles, barnices y soluciones.⁽¹¹⁾

1. Soluciones

Se tienen referencias del uso de antimicrobianos con compuestos de plata y son referidos desde hace 100 años, por la aplicación de nitrato de plata para la prevención y tratamiento de algunas enfermedades, en concentraciones <50 ppm, adicionado con la habilidad del fluoruro para su uso en la prevención de caries. Además del control del dolor y la infección con solo una aplicación de un minuto, una vez por año y siendo una técnica no invasiva es el indicado para detener el proceso y la prevención de caries.⁽¹²⁾

El Fluoruro de Plata Amoniacal (FPA), $[Ag(NH_3)_2F]$, es un compuesto que salió al mercado en 1970, su composición es a base de plata amoniacal (380 mg por 1 ml) es empleado con la finalidad de detener el avance de la lesión cariosa,⁽¹³⁾ aunque hay poca evidencia que corrobore este efecto. Se le comercializa con el nombre de Saforide™ (J. Morita, Japón) (Fig. 6). Según el fabricante, tiene tres indicaciones.⁽¹⁴⁾

- 1) Control del avance de la primera etapa de la caries.
- 2) Control de la segunda etapa de la caries.
- 3) Disminución de la hiperestesia dentinaria.



Figura 6.- Fluoruro de Plata Amoniacal, Saforide™. Fuente directa

En la literatura se menciona sobre el uso del fluoruro de plata amoniacal ya que inhibe y detiene la caries siendo el resultado de la unión de iones de plata y proteínas

(proteínas bacterianas y de dentina cariosa infectada), que promueven una coagulación instantánea y forman proteínas de plata. Así como también la inhibición de enzimas bacterianas (tripsina y colagenasa) consistentes de proteínas. El fluoruro ayuda en la remineralización de dentina afectada.⁽¹⁴⁾

2 Barnices

La aplicación de barniz en las superficies dentales se ha demostrado que promueve la absorción de fluoruro por el esmalte. Sin embargo, el concepto del mecanismo cariostático del fluoruro ha cambiado considerablemente en las últimas décadas. Además de la incorporación del fluoruro en la red cristalina, los barnices y otros tópicos concentrados interactúan con la saliva y la película adquirida en la forma de fluoruro de calcio (CaF_2) compuestos en el esmalte dental. Sin embargo, según estudios a partir de la década de 1980, el CaF_2 fue estabilizado por proteínas de la biopelícula y fosfato aunado a un pH neutro, cuando el pH de la placa, CaF_2 comienza a disolverse y liberar iones de flúor, actuando así como una fuente prolongada de fluoruro después de la aplicación. Hoy en día, esto se considera el factor más importante en la prevención de caries para los fluoruros concentrados tópicos, incluidos los barnices de fluoruro.⁽¹⁵⁾

El Di-Fluor Silano (DFS) [NaF], es el primer producto de barniz fluorado comercial, fue introducido por Schmidt en 1964 bajo el nombre comercial de Duraphat™ (Woolf Pharma Cia Eschwege FRG) que contiene 5% de fluoruro de sodio en un vehículo de resina.⁽¹⁶⁾ Se le conoce como Fluor Protector™ (Fig. 7). Es un barniz poliuretánico⁽¹⁷⁾ que contiene fluoruro (0.1%) en la forma de flúor silano (al 0.9%), la dosis única es de 0.4 ml (0.4 mg F^-)⁽¹⁸⁾, es agrio y endurece en presencia de aire, formando una película delgada y transparente. Los barnices son normalmente aplicados con cepillos pequeños o jeringas. El uso de este barniz fluorado es aceptado ampliamente en Europa, sin embargo, no ha sido aceptado por el *Council on Dental Therapeutics* de la *American Dental Association*, todavía no están disponibles en los Estados Unidos.⁽¹⁹⁾



Figura7.- Di-flúor Silano, Fluor Protector™. Fuente Directa.

3 Geles

Los compuestos fluorados en presentación de gel son todavía de uso común en muchos países, desde 1987 se han utilizado tanto el gel como el barniz de flúor para prevenir la caries de manera significativa. En pruebas *in vitro* en las aplicaciones con geles fluorados se ha demostrado que la absorción de fluoruro es más rápida particularmente con el fluoruro fosfato acidulado (FFA) y se produce durante los primeros cuatro minutos.⁽²⁰⁾

El uso del Flúor Fosfato Acidulado (FFA), (Fig. 8) desmineraliza la superficie del esmalte (pH 3.5) proporcionando iones calcio⁽²¹⁾. Estos iones interactúan con el flúor produciéndose un precipitado de fluoruro de calcio, que funciona como reservorio de fluoruros haciendo al esmalte dental más resistente a la caries.⁽²²⁾

Una vez aplicado el gel, se producen fenómenos de recristalización del esmalte dental más la incorporación del fluoruro dentro de su trama cristalina lo que hace a este esmalte más resistente a la caries dental. Los estudios clínicos en los que se utilizan aplicaciones de fluoruro fosfato acidulado son en general muy favorables, lográndose una reducción de caries del 20 al 40%.⁽²¹⁾



Figura8.-Fluoruro Fosfato Acidulado Sultán™ Fuente directa.

D) Valoración de cambios en la superficie del esmalte

1. Técnicas Instrumentales: Microscopía Electrónica de Barrido, Espectroscopía por Dispersión de Energía de Rayos X y Difracción de Rayos X

El Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) permite la observación y la caracterización de materiales heterogéneos orgánicos e inorgánicos en escala nanométrica (nm), y micrométrica (μm). La popularidad del MEB, se deriva de su capacidad de obtener un aspecto tridimensional de las imágenes de la superficie de una gama muy amplia de materiales. Las imágenes del MEB se utilizan en una amplia variedad de medios de comunicación de las revistas científicas. Aunque el uso principal del MEB es la obtención de imágenes topográficas en el rango de aumentos 10-100.000X. En el MEB, el área a examinar o el micro-volumen a analizar es irradiado con un haz de electrones finamente enfocados, que pueden ser barridos en una trama a través de la superficie de la muestra para formar las imágenes, pueden ser estáticas o bien se puede obtener un análisis en la posición según la muestra. Los tipos de señales producidas por la interacción del haz de electrones con la muestra son los electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X

característicos. Estas señales se obtienen a partir de los volúmenes de emisión específicos dentro de la muestra y se puede utilizar para examinar muchas de las características de la muestra (topografía de la superficie, composición, etc.) (Fig.9).

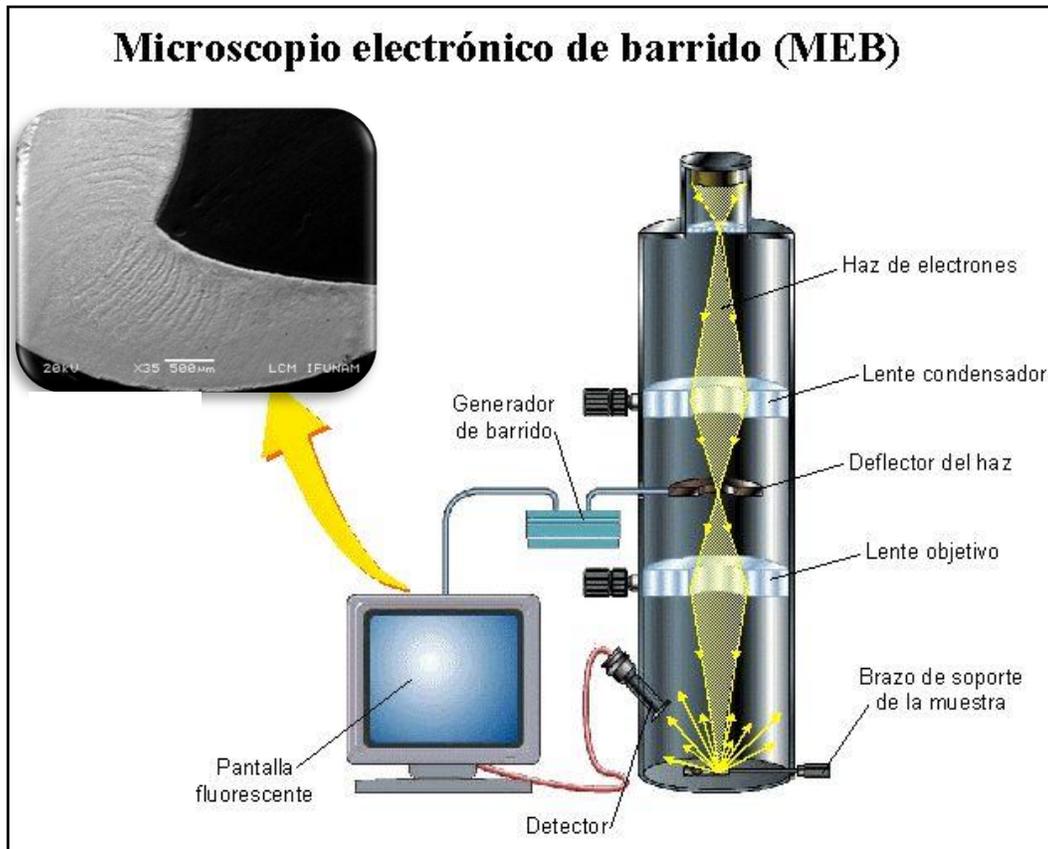


Figura 9.-Esquema de los componentes internos del microscopio electrónico de barrido.

<http://www.google.com.mx/imgres?imgurl=http://almez.pntic.mec.es/~jrem0000/dpbq/1bch/tema1/micros-barr.JPG>

La capacidad de obtener un aspecto tridimensional de las imágenes se debe a la gran profundidad de campo del MEB, así como el efecto de relieve, el contraste de la sombra de electrones secundarios y retrodispersados.⁽²³⁾ En el MEB, los rayos X característicos también son emitidos como resultado de un bombardeo de electrones. El análisis tiene la característica de la radiación X emitida a partir de la muestra y su identificación puede ser cualitativa y cuantitativa elemental de las regiones de una muestra nominal de 1 μm de diámetro y 1 μm de profundidad en condiciones normales de operación.⁽²³⁾

La Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X (EDERX) es una técnica consistente en hacer pasar un haz de rayos X a través de un cristal de la sustancia sujeta a estudio. Esta técnica de tecnología relativamente sencilla, separa los rayos X característicos producidos por la interacción del haz electrónico, de acuerdo a su energía, mediante el uso de un detector cristalino en estado sólido.

La Difracción de Rayos X (DRX) por los electrones es mucho más fuerte que la de los núcleos, las intensidades de los rayos X dispersados son casi exclusivamente determinados por la distribución de los electrones. Los avances técnicos que se iniciaron en la década de 1960, aún continúan y han hecho de esta técnica una herramienta única para el mapeo de la distribución de cargas principalmente en cristales. Sus mayores limitaciones se deben a la necesidad de trabajar con sistemas cristalinos, por lo que no es aplicable a disoluciones, muestras biológicas, a sistemas amorfos y gases.⁽²⁴⁾

Los diferentes tipos de interacción entre los electrones primarios y la muestra conducen a las señales mostradas en la figura 10.

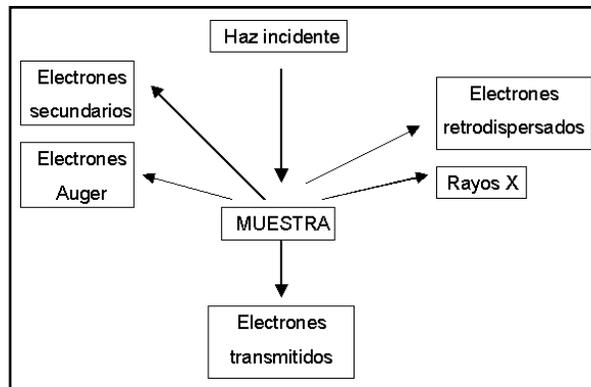


Figura10.- Tipos de señales producidas por la interacción del haz de electrones con la materia dentro de un MEB. Fuente directa.

2. Microdureza (MD) Dental

La dureza es una propiedad mecánica de los materiales, consistente en la dificultad que existe para rayar o crear marcas en la superficie mediante la penetración de una punta. La dureza se mide utilizando un durómetro para el ensayo de penetración. Dependiendo del tipo de punta empleada y del rango de cargas aplicadas, existen diferentes escalas, adecuadas para distintos rangos de dureza.⁽²⁵⁾

Las escalas de uso actual son las siguientes:

- Brinell
- Shore
- Rockwel
- Webster
- Knoop
- Rosiwall
- Vickers
- Mohs

El término microdureza (MD) se refiere a indentaciones hechas con una carga no superior a 1 kg de fuerza (f). Existen métodos de prueba estándar comunes para expresar la microdureza de un material. Cada uno de ellos se divide en un rango de escalas, definidas por una combinación de las cargas aplicadas y la geometría del indentador.⁽²⁵⁾

El método de prueba de dureza Vickers (HVN por sus siglas en inglés [Hardness Vickers Number])⁽²⁶⁾ consiste en marcar el material de prueba con un indentador de diamante (Fig. 11), que tiene forma de una pirámide recta con una base cuadrada y un ángulo de 136° entre caras opuestas⁽²⁷⁾, sometidas a una carga de 1 a 100 kg/f.

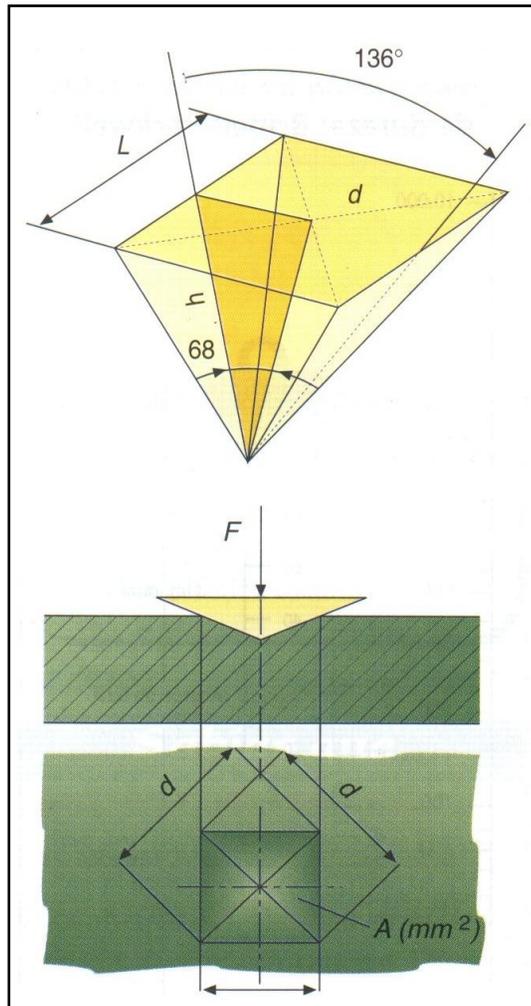


Figura 11.-Esquema de la Indentación en modo Vickers. Fuente ASTM International Designation: E 384-06. (*Standard Test Method for Microindentation Hardness of Materials*. United States: s.n, 2007).

La carga normalmente aplicada en el esmalte dental es de 10, 25 y 50 g por 10, 20 y 30 s, utilizando el indentador Vickers.⁽²⁸⁾ Las dos diagonales de la indentación en la superficie del material después de la remoción de la carga se miden usando un objetivo del microscopio incorporado al microdurómetro.⁽²⁹⁾ Se calcula el área de la

superficie de la muesca que forma una pendiente. Es adecuado para aplicarse con el fin de determinar la microdureza de áreas pequeñas y para materiales muy duros.⁽²⁵⁾

La fórmula de microdureza (MD) es la siguiente:⁽²⁸⁾

$$HVN = \frac{(1.845)F}{d^2}$$

Donde:

HVN es el número de microdureza Vickers

1.845; es la constante de microdureza.

F; es la carga aplicada en gramos.

d^2 ; es la distancia media de las diagonales (horizontal y vertical).

Las pruebas de microdureza se usan mucho y tienen una aplicación importante en odontología. La prueba de microdureza puede evaluar el grado de mineralización de un sustrato dental. Una fuerza específica aplicada durante un tiempo y una distancia específicas proporcionan datos importantes.⁽²⁵⁾

Se utiliza un aparato que tiene como aditamento diferentes puntas de diamante, al aplicar una carga definida, la punta de diamante se hace incidir sobre una superficie, luego se retira la punta y se mide, localizando el indentador con ayuda de los objetivos de microscopio (40X, 10X), luego se determina la diagonal de la muesca que se dejó sobre la superficie, este aparato es conocido como Microdurómetro (Fig. 12). Se utiliza en estudios que evalúan la capacidad de remineralización del esmalte y la dentina después de diferentes tratamientos como ocurre en situaciones no equilibradas de desmineralización y remineralización.⁽²⁹⁾



Figura 12.- Microdurómetro (Matsuzawa MHT2™, Japan). Fuente directa.

3. μ-Raman

La Espectroscopía μ -Raman, es una técnica que se utiliza para identificar y caracterizar de manera no destructiva y sin contacto, la composición química de compuestos orgánicos e inorgánicos mediante la identificación de grupos funcionales sin destruir las muestras y sin llevar a cabo una preparación especial. Esta técnica se puede emplear en cualquier estado de agregación de la materia.⁽³⁰⁾ Con la ayuda del microscopio óptico asociado al equipo es posible identificar aisladamente partículas del orden de la micra. Existen informes de la aplicación de esta técnica para identificar la cristalinidad del esmalte dental humano.⁽³¹⁾

La obtención del espectro se realiza mediante un láser que genera el haz de luz incidente sobre la muestra, que se enfoca por un objetivo convencional óptico en el área de interés. El mismo objetivo absorbe fotones dispersados Rayleigh (elásticos) y Raman (inelásticos). La radiación se descompone por un monocromador, se analiza con un fotomultiplicador y se registra con un módulo de grabación. Cuando una estructura poliatómica se ilumina por un rayo láser (radiación monocromática del espectro visible), se observan varios fenómenos: la reflexión de la luz, absorción,

transmisión y dispersión de fotones. En el caso de la dispersión inelástica, los fotones esparcidos obtienen una energía aditiva gracias al intercambio energético entre los fotones incidentes y los niveles cuantificados de energía de la estructura poliatómica. El mecanismo de este fenómeno es el siguiente: como resultado de la acción de los fotones incidentes, que tienen una energía más alta que la del estado vibrante de la estructura poliatómica, el material irradiado obtiene temporalmente un nivel inestable y después vuelve a uno de los estados permitidos, emitiendo un fotón de energía más alta que los fotones iniciales ⁽³⁰⁾ la misma longitud de onda que incide a la molécula será igual en la dispersión Rayleigh (elástico), no así en la dispersión Raman (inelástico) como se muestra en la figura 13 a y b.

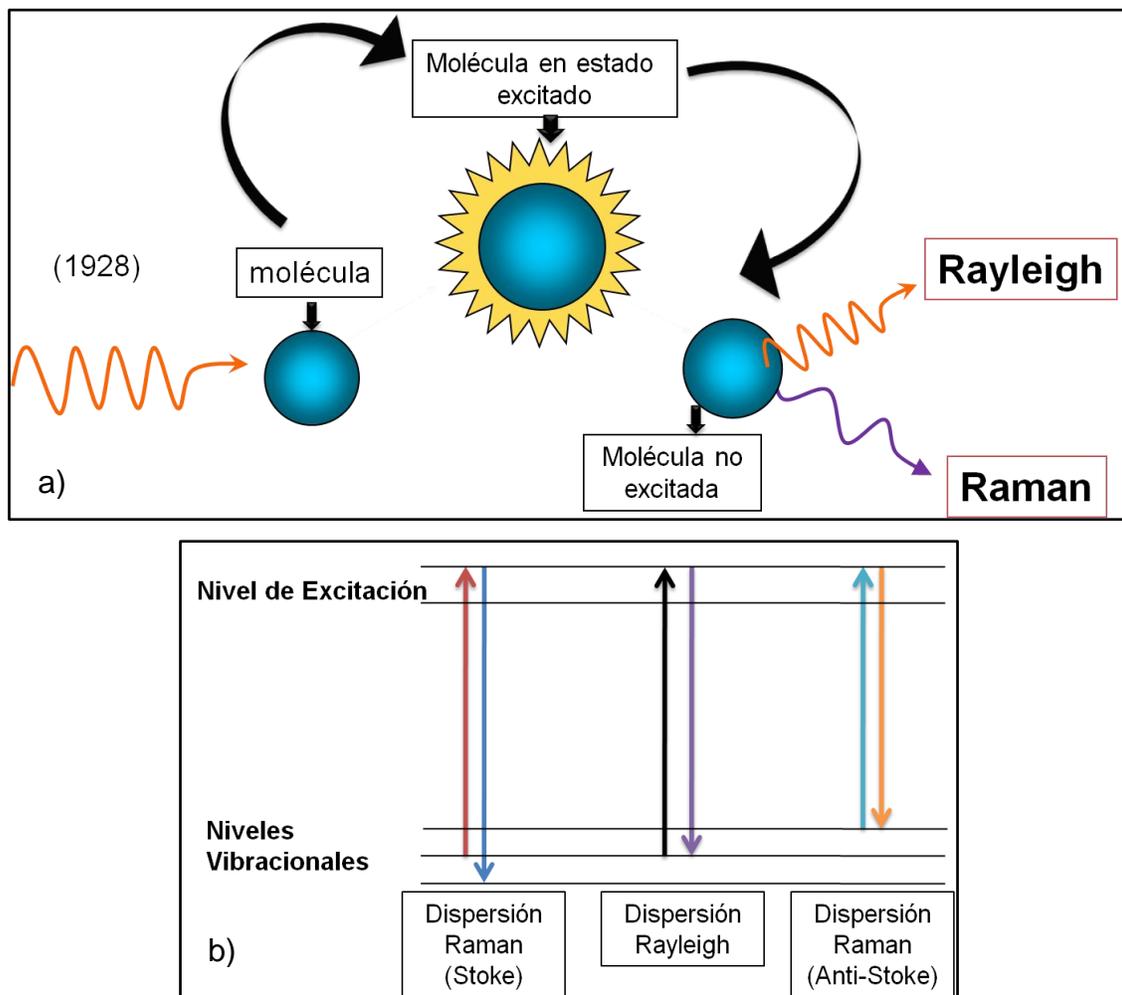


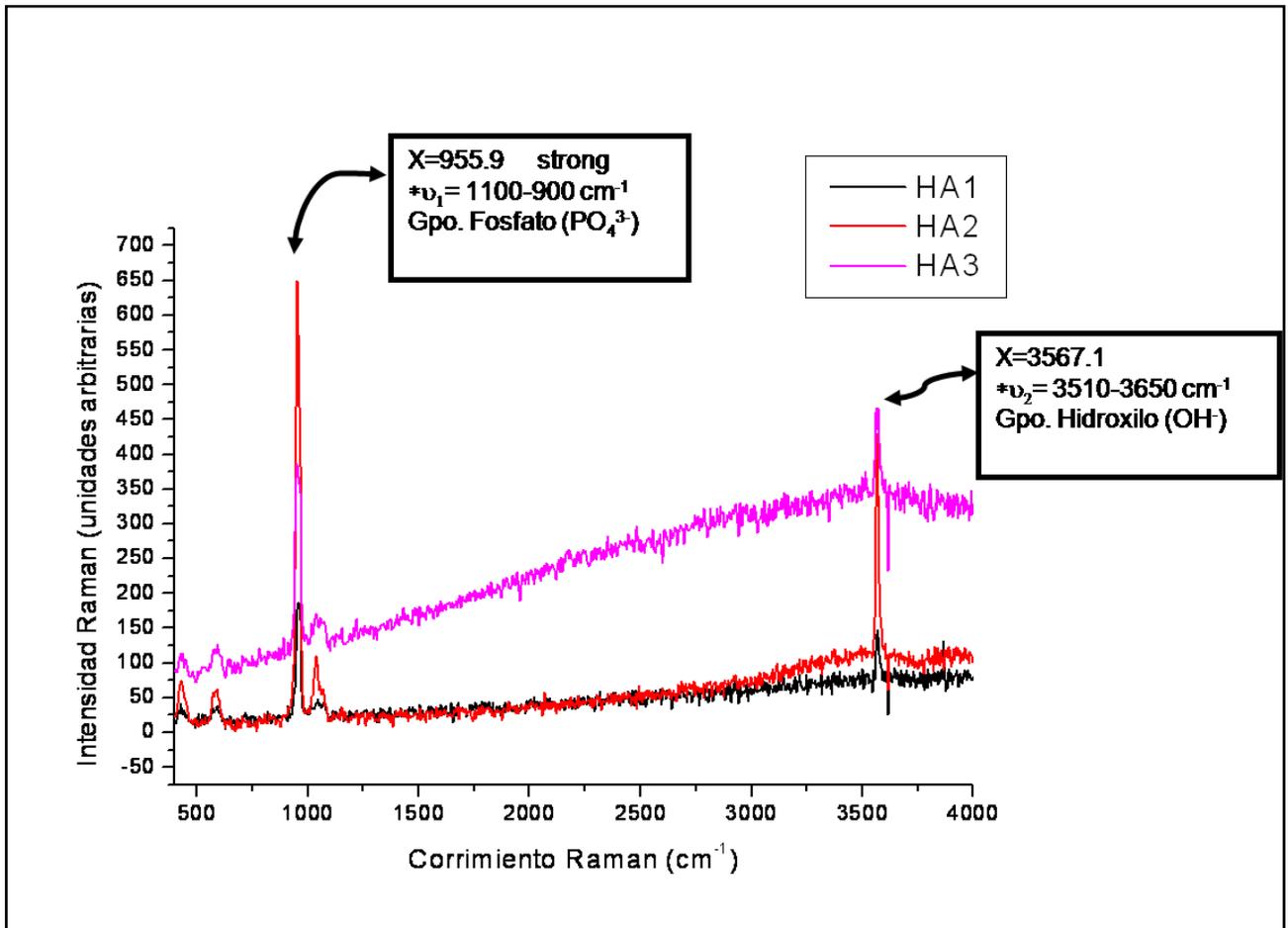
Figura 13a.- Esquema representativo del efecto bifotónico sobre una molécula y las dos dispersiones resultantes(elásticas e inelásticas), b) Esquema de los niveles de energía. Fuente directa

La espectroscopía μ -Raman es muy utilizada para los análisis químicos de materiales biológicos y sintéticos, de la misma manera ha innovado dentro de la medicina ya que en recientes estudios se ha obtenido los espectros de diferentes tejidos humanos, ADN, glóbulos blancos (leucocitos), esto de manera *in vitro* y más recientemente *in vivo* en estudios de lesiones premalignas en el pecho y placas ateroscleróticas.^(32; 33)

En odontología se estudian las apatitas naturales, con fosfatos de calcio, que al agregarle un grupo OH^- forma Hidroxiapatita (HA), un F^- forma fluorapatita (FA), un Cl^- y forma Clorapatita (CA); las dos primeras se encuentran en hueso, dentina y esmalte y gracias a esta técnica de caracterización podemos observar cada uno de estos grupos expresados en las bandas.^(34; 35)

En la gráfica 1 se puede observar las bandas características de la HA sintética donde en el intervalo de vibración $1100\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ podemos identificar el grupo PO_4^{3-} (955.9 cm^{-1}) en su expresión “fuerte” y en el rango de vibración $3510\text{-}3650\text{ cm}^{-1}$ se ubica el grupo OH^- (3567.1 cm^{-1}).

Gráfica 1.- Espectros de la Hidroxiapatita sintética (HA) con las bandas características del grupo PO_4^{3-} y el grupo OH^- .



Fuente directa

E) Modelos in vitro (pH cíclico y lesión inicial)

1. Modelo Ten Cate

La importancia clínica de la remineralización ha sido demostrada convincentemente por Becker Dirks⁽³⁶⁾ en 1966, quien demostró que el 50% de las manchas blancas observadas en los jóvenes, desaparecen posteriormente como probable resultado del potencial de remineralización de la saliva. Ten Cate diseñó un modelo de pH cíclico para estudiar la pérdida y ganancia de minerales en lesiones artificiales del esmalte dental,⁽³⁷⁾ este sistema de pH cíclico es la mejor reproducción de la situación *in vivo*. Las muestras fueron sujetas a una secuencia de soluciones desmineralizantes de 2.2 mM Ca, 2.2 mM P, 50 mM de CH₃COOH a un pH 5.0 a 37°C una solución remineralizante de 1.5 mM Ca, 0.9 mM P, 130 mM KCl a un pH 7.0 a 37°C. Se realizaron 3 ciclos diferentes de cambio de soluciones.⁽³⁶⁾

- 21 hrs de remineralización por 3 hrs de desmineralización.(Fig. 14)
- 24 hrs de remineralización por 0 hrs de desmineralización.
- 16 hrs de remineralización por 8 hrs de desmineralización.

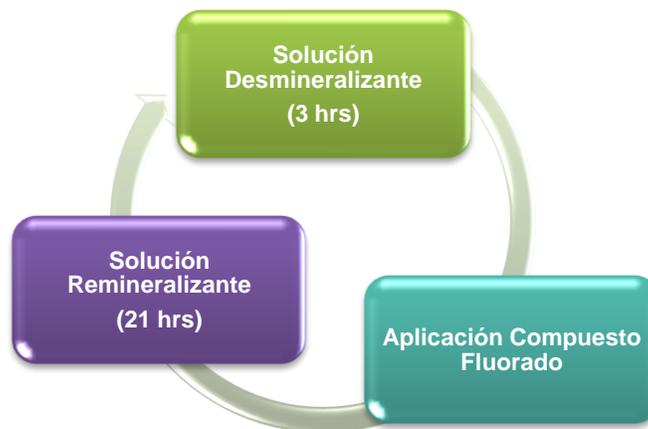


Figura 14.- Esquema de un modelo de pH cíclico. Fuente directa.

2. Modelos Modificados

Gómez de Ferraris⁽³⁾ define el pH cíclico como un conjunto de condiciones que preservan la superficie del esmalte y producen lesiones iniciales de caries que se pueden evaluar usando medición en la superficie (*Surface Micro Hardness*, SMH) o en cortes sagitales (*Cross Sectional Micro Hardness*, CSMH). El pH cíclico *in vitro* es la manera de imitar las condiciones fluctuantes de pH en la boca.⁽³⁶⁾

El pH cíclico consiste en una composición de varios líquidos involucrados durante los periodos de desmineralización y remineralización, también sirve para comparar los efectos de diferentes periodos de tiempo 5, 10 y 15 días de desmineralización y remineralización sobre el esmalte desmineralizado, y así comparar los efectos de pequeñas cantidades del fluoruro en solución bajo condiciones de pH cíclico de composición constante.⁽³⁸⁾

Independientemente del progreso en los experimentos *in vitro* o *in vivo* respecto al estudio de la caries, las pruebas *in vitro* son todavía ampliamente utilizadas. Estos modelos reproducen el proceso de la caries *in vitro* (pH cíclico) y ha sido utilizado para diferentes propósitos. La aplicación más importante ha sido evaluar los efectos del fluoruro en la caries. Diferentes modelos de pH cíclico han sido desarrollados para evaluar los efectos del fluoruro en la reducción de la desmineralización del esmalte o promover la remineralización.⁽³⁹⁾

V. METODOLOGÍA

A) Planteamiento del Problema

La utilización de compuestos fluorados tiene una amplia difusión en la odontología preventiva, sin embargo, el uso indiscriminado de estos compuestos ha sido motivo de investigación de acuerdo a temas de toxicidad, remineralización y efecto sobre medidas preventivas, y por ello han surgido nuevos materiales que se piensa tienen un efecto similar a los ya existentes. Este es el caso del fluoruro de plata amoniacal (FPA), el cual se utiliza de manera rutinaria en la clínica de Odontopediatría, pero no se tiene información sobre el efecto que produce sobre las características del esmalte desmineralizado donde es aplicado. Por esa razón es importante conocer el efecto del FPA y compararlo con otros compuestos fluorados, que aunque tienen presentación y composición diferente, como el DFS (barniz) y el FFA (gel), su utilización clínica es la misma. En este contexto, la pregunta de investigación planeada es la siguiente:

¿Cuál es el efecto de los tres compuestos fluorados más usados en la Clínica de Odontopediatría en la subsuperficie del esmalte dental que ha sido desmineralizado y sometido a condiciones de pH cíclico?

B) Justificación

Existen informes en la literatura sobre el efecto de los compuestos fluorados en Odontopediatría. La mayoría de éstos, se relacionan con el efecto de dichos compuestos en la superficie del esmalte. Sin embargo, existe poca evidencia de los cambios que se presentan hacia dentro del esmalte, es decir por debajo de la superficie, y si es que se presenta, ¿cuál es el impacto en la estructura del esmalte? y ¿cuál es la influencia del vehículo empleado?. En este trabajo se pretende dar una solución a dichas interrogantes, a partir del estudio del efecto de compuestos fluorados en la subsuperficie del esmalte dental en sentido horizontal a 50, 100 y 150 μm perpendicular a la superficie; y en sentido vertical (oclusal, medio y cervical), en dientes con esmalte desmineralizado en condiciones de pH cíclico.

C) Objetivo General

Determinar el efecto de 3 diferentes compuestos fluorados utilizados comúnmente en Odontopediatría sobre la subsuperficie del esmalte dental en condiciones de pH cíclico.

D) Objetivos Particulares

- Determinar la microdureza del esmalte dental subsuperficial a 50, 100 y 150 μm de profundidad.
- Determinar la microdureza del esmalte dental subsuperficial en sentido oclusal, medio y cervical.
- Determinar la microdureza del esmalte dental subsuperficial a 0, 5, 10 y 15 días de tratamiento (pH cíclico).
- Identificar cual de los tres compuestos fluorados (DFS, FPA, FFA) tiene mayor efecto en la microdureza de la subsuperficie del esmalte dental.
- Identificar los grupos funcionales OH^- y PO_4^{3-} en la subsuperficie del esmalte dental.
- Identificar cual es el compuesto fluorado que presenta el grupo OH^- y PO_4^{3-} sobre la subsuperficie del esmalte dental.

E) Hipótesis

1. Trabajo:

Los compuestos fluorados utilizados en Odontopediatría causan un efecto en la microdureza y en la identificación de los grupos funcionales de OH^- y PO_4^{3-} en la subsuperficie del esmalte dental en condiciones de pH cíclico.

2. Nula:

Los compuestos fluorados utilizados en Odontopediatría no causan un efecto en la microdureza ni en la expresión de los grupos funcionales de OH^- y PO_4^{3-} en la subsuperficie del esmalte dental en condiciones de pH cíclico.

F) Variables

4 Variable Independiente 1: Di-Fluor Silano (DFS)

a) Definición Conceptual:

Es un barniz de fluoruro de sodio 0.7% en la forma de di-flúor silano que se aplica sobre la superficie del esmalte, utilizado como tratamiento de cuellos dentales hipersensibles, incremento de la resistencia ácida y profilaxis de caries a largo plazo.

b) Definición Operacional

Barniz de flúor que será colocado en la superficie del esmalte en dientes con lesión inicial causada previamente. La forma de aplicación es de 1 minuto diariamente.

c) Escala de medición: Cualitativa nominal

5 Variable Independiente 2: Fluoruro de Plata Amoniacal (FPA)

a) Definición Conceptual

Es una solución de fluoruro de plata amoniacal, contiene 380 mg de fluoruro de plata por cada ml. Utilizado para la detención o inhibición de la primera etapa de la caries y control de la segunda etapa de la caries.

b) Definición Operacional

Solución que será aplicada en la superficie del esmalte en dientes con lesión inicial causada previamente, la forma de uso es de 1 minuto por aplicación.

c) Escala de medición: Cualitativa nominal

6 Variable Independiente 3: Fluoruro Fosfato Acidulado (FFA)

a) *Definición Conceptual*

Gel de fluoruro de sodio al 1.23%, con pH de 3.5, que facilita la captación de flúor para prevenir la disolución severa del esmalte. Tiene una elevada viscosidad en condiciones de almacenamiento, pero se convierten en líquido en condiciones de mucha presión o fuerza de deslizamiento.

b) *Definición Operacional*

Es utilizado para prevenir el ataque ácido de la cavidad oral en el esmalte dental.

c) *Escala de medición: Cualitativa nominal.*

7 Variable Dependiente 1: Microdureza dental subsuperficial.

El efecto de la microdureza en la subsuperficie del esmalte dental en condiciones de pH cíclico en diferentes periodos experimentales.

a) *Definición Conceptual*

La microdureza es una propiedad mecánica de los materiales que consiste en la resistencia a la penetración, al desgaste o al rayado con una carga menor a 1kg de fuerza.

b) *Definición Operacional*

El valor de microdureza se determina por el cálculo del área de la indentación producida en modo Vickers en condiciones de carga de (25g/20s) en la subsuperficie del esmalte a 50, 100 y 150 μm de profundidad, en sentido oclusal, medio y cervical con los diferentes compuestos fluorados en condiciones de pH cíclico.

c) *Escala de Medición: Cuantitativa de razón*

8 Variable Dependiente 2: Identificación de grupos funcionales OH^- y PO_4^{3-}

Los grupos funcionales de un material son identificados mediante los modos vibracionales activos en Raman con un dispersor μ -Raman

a) *Definición Conceptual*

Detectar la composición química a partir de los modos vibracionales de los grupos funcionales que forman parte de la muestra.

b) *Definición Operacional*

Los grupos funcionales OH^- y PO_4^{3-} presentes en el esmalte subsuperficial tratado con compuestos fluorados, se identifican por la posición y el desplazamiento Raman observados en los espectros generados en un Dispersador μ -Raman en un intervalo 400 a 4000 cm^{-1} .

c) *Escala de Medición:*Cuantitativa de razón

G) Tipo de estudio.

Experimental, longitudinal.

H) Universo de Trabajo.

Dientes humanos, extraídos por indicación ortodóncica.

I) Población en estudio.

Dientes humanos.

J) Selección y tamaño de la muestra.

65 dientes humanos que cumplieron con los siguientes criterios de participación.

Criterios de Participación

Criterios de Inclusión

- Terceros molares.
- No erupcionados.
- Extraídos recientemente.
- Con corona anatómica intacta.
- De la dentición permanente.
- Sin defectos estructurales congénitos.

Criterios de Exclusión

- Dientes supernumerarios.
- Con fisuras o fracturas.
- Dientes con alteración en la morfología de la corona.
- Dientes con hipoplasia del esmalte.
- Dientes con fluorosis.
- Seccionados en la corona.

Criterios de Eliminación

- Que al momento de ser manipulados sufran una fractura o fisura.

VI. EXPERIMENTAL

A) Recursos

1) Materiales

- Cuaderno para bitácora de teoría.
- Cuaderno para bitácora de laboratorio.
- Discos de diamante Brassler™.
- Frascos de plástico.
- Frascos de vidrio ámbar.
- Agua desionizada.
- Reglas de plástico.
- Frascos aplicadores de acrílico.
- Goteros de vidrio.

2) Biológicos

- Dientes humanos extraídos por indicación ortodóncica.

3) Reactivos Químicos

- Di Flúor Silano (Flúor Protector™, Ivoclar Vivadent, USA).
- Fluoruro de Plata Amoniacal (Saforide™, Japan).
- Fluoruro Fosfato Acidulado (Sultán™, México).
- Acrílico de colores con monómero (Nictone™, México).
- Compuestos grado reactivo para hacer soluciones re y desmineralizantes.
 - CaCl_2 [Cloruro de Calcio (JT Baker™, México)].
 - NaH_2PO_4 [Fosfato de Sodio (Reasol™, México)].
 - CH_3COOH [Ácido acético (JT Baker™, México)].
 - KCl [Cloruro de Potasio (JT Baker™, México)].

4) Equipos

- Microdurómetro MHT2™, (Matsuzawa, Japan) Instituto de Física, UNAM.
- Sistema Raman Dispersivo, Nicolet Almega XR™ (Thermo Scientific, USA), Laboratorio de Materiales y Nanotecnología, CCADET, UNAM.
- Recortadora de disco de diamante (Rochester Hamco Machines Inc™ USA). Laboratorio de Biomateriales Dentales DEPeI, UNAM.
- Pulidora P220S (PRESI Mecapol™, México). Laboratorio de Biomateriales Dentales DEPeI, UNAM
- Horno de convección (Felisa™, México) Laboratorio de Biomateriales Dentales DEPeI, UNAM.
- Baño de ultrasonido 40Hz. (Modelo AS-2060B, ICSA™) Laboratorio de Biomateriales Dentales DEPeI, UNAM.

5) Infraestructura

- Laboratorio de Biomateriales Dentales, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.
- Laboratorio Van der Graff Mv 0.07 del Instituto de Física, UNAM.
- Laboratorio de Materiales y Nanotecnología, Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, UNAM.

6) Financiamiento

- Proyecto IN-113108 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la DGAPA, UNAM.

Método

1. Prueba Piloto

Se recolectaron 10 terceros molares inferiores humanos sin erupcionar con corona anatómica intacta, se realizó remoción de tejido blando radicular y limpieza profiláctica, se realizó un corte mesio-distal para la obtención de 2 caras de trabajo, donde se delimitó un área de 6X3mm (lingual y vestibular) para la aplicación del compuesto. Se sometieron a pH cíclico durante 5, 10, y 15 días con 3 diferentes compuestos fluorados DFS, FPA, FFA. Al concluir el pH cíclico se realizó un corte longitudinal para obtener la subsuperficie del esmalte. Las pruebas de microdureza se llevaron a cabo en el Instituto de Física, UNAM donde se determinó la carga y el tiempo adecuados para el tipo de material, de la misma manera se recurrió al Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico para estandarizar las condiciones para la obtención de espectros μ -Raman.

2. Preparación de los especímenes

Se utilizaron 65 terceros molares que cumplieron con los criterios de inclusión, estos fueron preparados según Ten Cate ⁽³⁶⁾ se eliminó el tejido blando radicular y se realizó una limpieza ⁽⁴⁰⁾ con pasta profiláctica sin flúor (QOM™, México), posteriormente fueron seccionados ⁽¹⁸⁾ con un disco de diamante ⁽⁴¹⁾ (Brasseler™ Diamond) de dos caras, en sentido mesio-distal y sobre el eje longitudinal, bajo irrigación constante. Cada muestra fue cubierta con barniz ácido-resistente (bissú varios colores) dejando una área de trabajo de 6X3 mm en la cara vestibular o lingual.

Toda la muestra (n=120) excepto el grupo sano (n=10) fue inmersa en una solución desmineralizante elaborada con 2.2 mM de CaCl₂, 2.2mM de NaH₂PO₄, 0.05 M de CH₃COOH, se ajustó el pH a 4.4 por medio de KOH a 1.0 M mediante el potenciómetro (pH Conductivity Oakton™, USA), durante 96 horas a una temperatura constante de 37° C para producir la lesión inicial.^(42; 43; 41)

Se formaron aleatoriamente: un grupo de 10 especímenes sanos y cuatro grupos de 30 especímenes desmineralizados, en los cuales se aplicaron uno de los siguientes compuestos fluorados:

- Fluoruro de Plata Amoniacal, FPA (Saforide TM, J. Morita, Japón)
- Di-Flúor Silano, DFS (Fluor Protector TM, Ivoclar, Germany)
- Flúor Fosfato Acidulado, FFA (Sultán TM, USA)
- Grupo Control, GC (sin tratamiento).

La Solución Remineralizante consistió en 1.5 mM de CaCl₂, 0.9 mM de NaH₂PO₄ y 0.15 mM de KCl, la solución se ajustó a un pH 7.0 ^(36; 44; 45). Esta solución se aproximó a la supersaturación de minerales de apatita encontrados en saliva y es similar a la utilizada por ten Cate, según Itthagarun.⁽⁴²⁾

3. pH Cíclico

Toda la muestra a excepción de los 10 especímenes del grupo sano, fue colocada en el siguiente modelo de pH cíclico:^(36; 44; 45)

- 3 horas inmersas en una solución desmineralizante.
- Aplicación del compuesto fluorado (FPA, DFS y FFA), según instrucciones del fabricante.
- 21 horas inmersas en una solución remineralizante.
- Enjuague abundante con agua desionizada de cada especimen entre los cambios de soluciones (Fig. 15).



Figura 15.-Esquema del modelo de pH cíclico utilizado por Ten Cate desde 1982. Fuente directa.

4. Montaje en soportes acrílicos

Cada cinco días se seleccionaron aleatoriamente 10 especímenes de cada grupo, la muestra se montó en soportes plásticos (Fig. 16) y se realizó un corte longitudinal (Fig. 17) para obtener la subsuperficie del esmalte y así evaluar la microdureza y realizar la técnica μ -Raman. Una vez que concluyó el pH cíclico (15 días) la muestra se almacenó en agua desionizada a una temperatura constante de 37°C (Fig. 18) hasta ser llevadas al microdurómetro (MHT2, Matsuzawa™, Japan), instalado en el Laboratorio Van Der Graff MeV 0.07 del Instituto de Física de la UNAM, alternando con la técnica de caracterización μ -Raman.



Figura 16.- Montaje de la muestra en soportes plásticos. Fuente directa.



Figura 17.- Corte longitudinal de los especímenes con irrigación constante. Fuente directa



Figura 18.- Horno a temperatura controlada de 37°C. Fuente (Felisa™, México)

Cada uno de los especímenes fue montado en cubos de acrílico (Fig. 19), para facilitar la manipulación en las mordazas del microdurómetro (Fig. 20). Se utilizó el objetivo 40X y se estableció, mediante los tornillos macro y micrométricos la distancia de 50, 100 y 150 μm (Fig. 21) sobre la subsuperficie, así como en sentido oclusal, medio y cervical del esmalte (Fig. 22) para realizar las indentaciones. Se utilizó un indentador Vickers, con una fuerza repetida de 25 gr, durante 20 s. en todos los casos. Se realizaron un total de 108 indentaciones por cada espécimen. Para medir las indentaciones (Fig. 20) se utilizó la siguiente fórmula:

$$[d_v + d_h = d],$$

Donde d_v es la medida de la diagonal vertical.
 d_h a la diagonal horizontal.
 d es el promedio de las diagonales.

El valor obtenido fue localizado en las tablas de microdureza de Vickers, asociando la fuerza empleada con resultado de d .

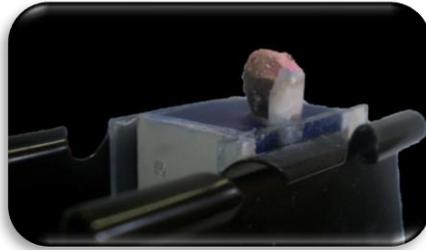


Figura 19.- Montaje de la muestra en moldes para realizar los cubos de acrílico.
Fuente directa.

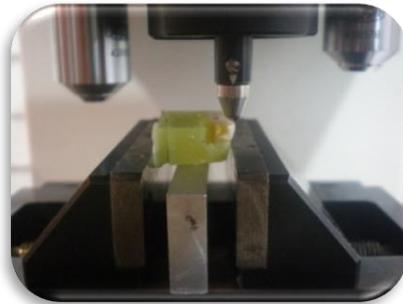


Figura 20.- Colocación del espécimen en las mordazas del microdurómetro con el indentador Vickers. Fuente directa.

5. Indentaciones

La distribución de las indentaciones se realizó en sentido perpendicular del esmalte más externo hacia la unión amelodentinaria a 50, 100 y 150 μm como se muestra en la figura 21.

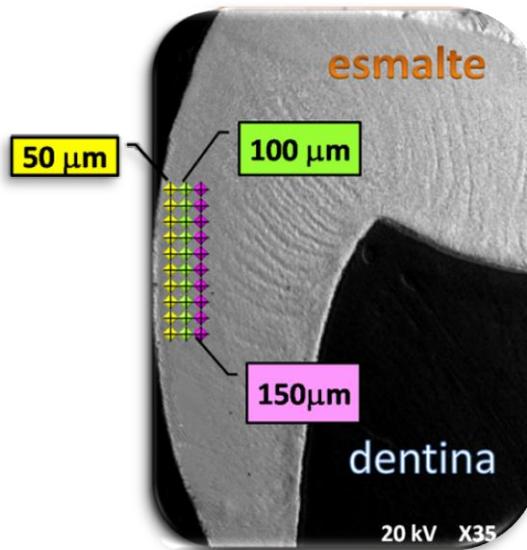


Figura 21.-Esquema de la distribución de las indentaciones a 50, 100 y 150 μm de profundidad. Fuente directa.

Las indentaciones se realizaron en sentido oclusal, medio y cervical como se muestra en la figura 22.

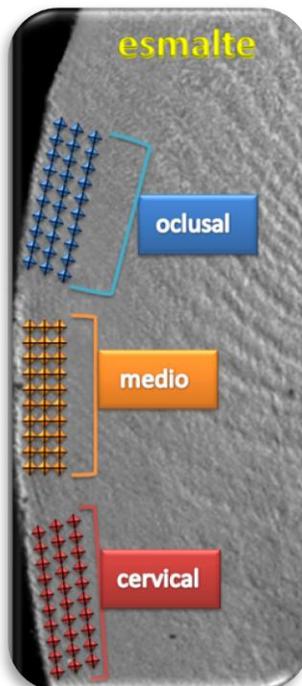


Figura 22.- Esquema de la distribución de las indentaciones en sentido oclusal, medio y cervical. Fuente directa.

Una vez colocado el espécimen en la mordaza del microdurómetro se ajustó tiempo y carga y se realizó la indentación, una vez concluido el tiempo se midió cada una de las diagonales (horizontal y vertical) con la ayuda de los tornillos micrométricos (2 líneas paralelas negras) para la visualización y medición de las indentaciones como se muestra en la figura 23.

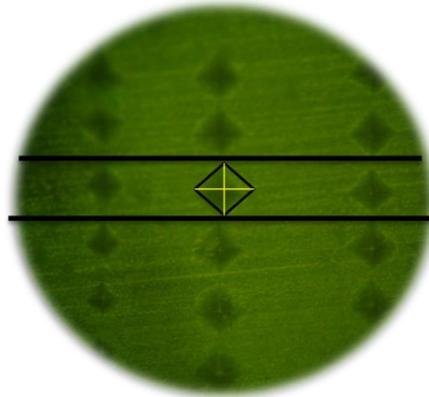


Figura 23.- Imagen del microdurometro donde se observa la indentación y las diagonales horizontal (d_h) y vertical (d_v). Fuente directa.

En la figura 24 se observan las indentaciones del grupo sano donde la diagonal vertical midió 16.5 y la diagonal horizontal fue de 15.0 dando un valor de MD de 186.0.

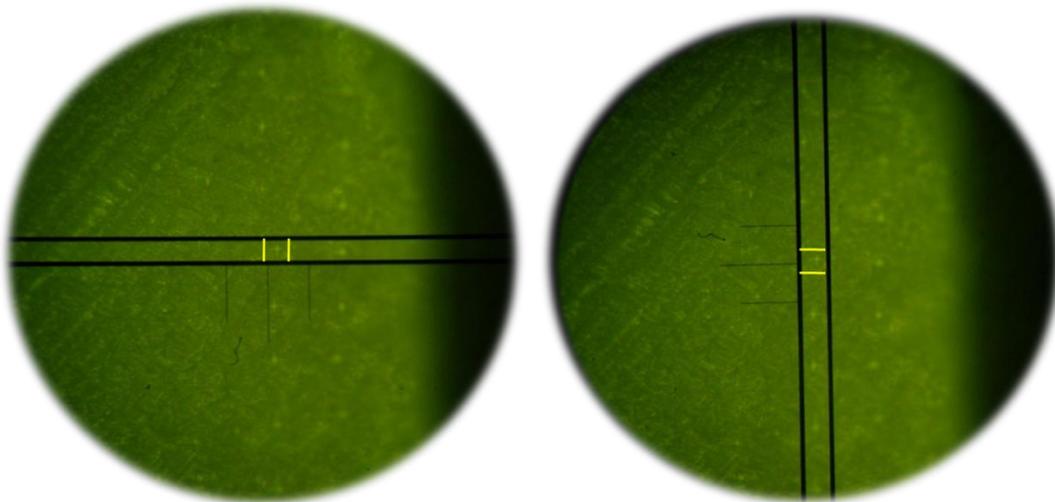


Figura 24.- Imagen del grupo Sano (0 días) donde se observan las líneas paralelas que determinan las diagonales (vertical y horizontal) a 150 μm de profundidad. Fuente Directa

En la figura 25 se observan las indentaciones del grupo tratado con FFA a 15 días de tratamiento donde la diagonal vertical midió 23.5 y la diagonal horizontal fue de 22.0 dando un valor de MD de 89.2.

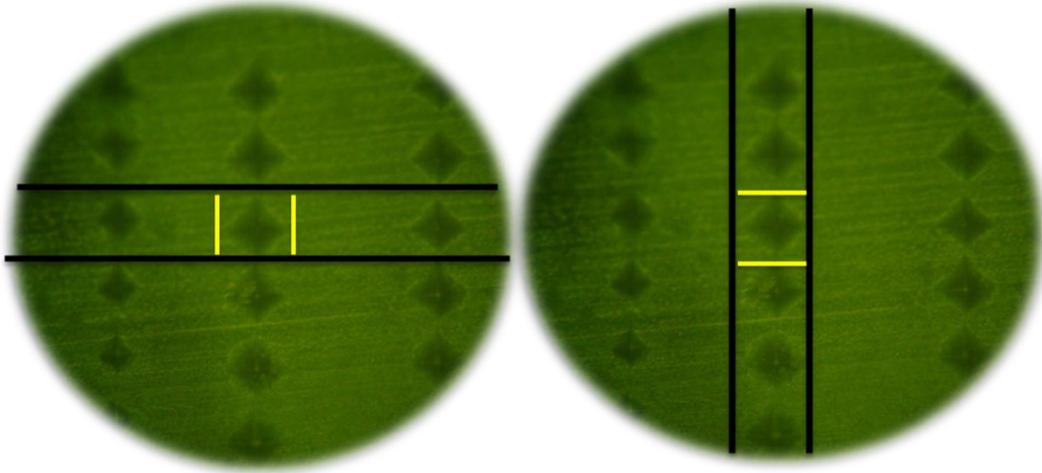


Figura 25.- Imagen del grupo tratado con FFA (15 días) donde se observan las líneas paralelas que determinan las diagonales (vertical y horizontal) en sentido oclusal a 100 μm de profundidad. Fuente directa

En la figura 26 se observan las indentaciones del grupo tratado con FPA a 15 días de tratamiento donde la diagonal vertical mide 20.5 y la diagonal horizontal es de 19.5 dando un valor de MD de 116.0.

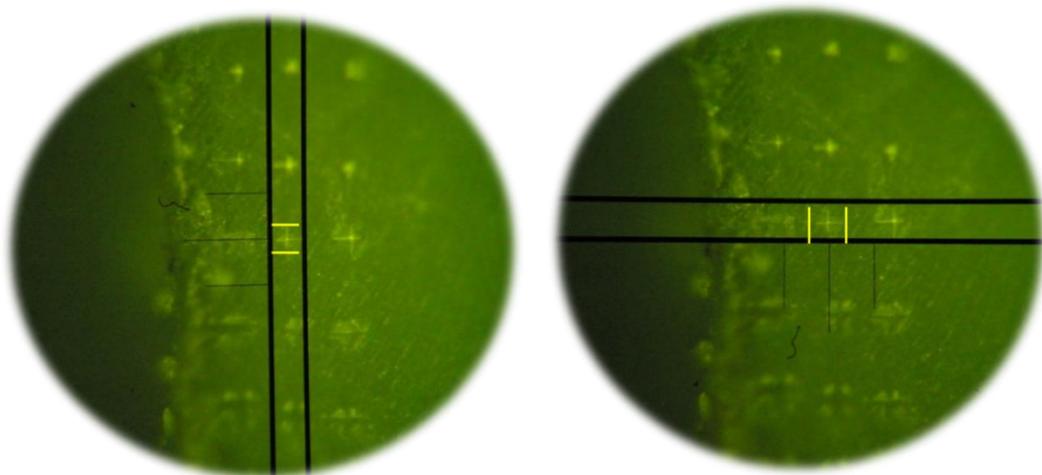


Figura 26.- Imagen del grupo tratado con FPA (15 días) donde se observan las líneas paralelas que determinan las diagonales (vertical y horizontal) en sentido medio a 100 μm de profundidad. Fuente directa

En la figura 27 se observan las indentaciones del grupo DFS a 15 días de tratamiento donde la diagonal vertical midió 15.5 y la diagonal horizontal fue de 23.0 dando un valor de MD de 124.0.

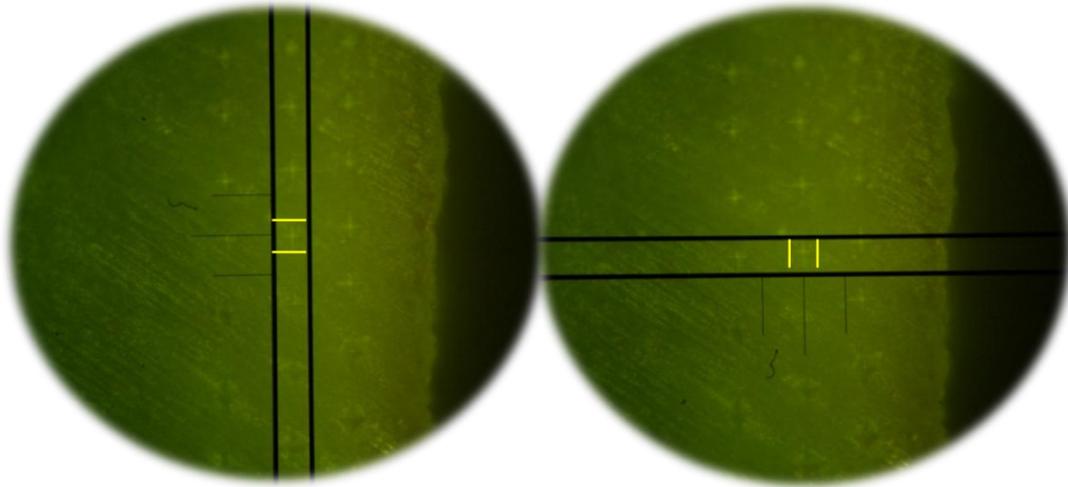


Figura 27.- Imagen del grupo DFS (15 días) donde se observan las líneas paralelas que determinan las diagonales (vertical y horizontal) en sentido medio a 100 μm de profundidad. Fuente directa.

Se realizaron 108 indentaciones por 65 especímenes dando un total de 7,020 indentaciones y se eliminó el valor mayor y menor obteniendo un gran total de 5850 indentaciones para el tratamiento estadístico. Los datos fueron capturados en el programa EpiData v.3.1 y tratados en SPSS v.13 para Windows (*Apache Software Foundation*TM) para ser analizados estadísticamente mediante la aplicación de pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis, Wilcoxon y Chi-cuadrada).

6. Espectros μ -Raman

Los espectros Raman fueron obtenidos en las siguientes condiciones.

Se utilizó una potencia de 10 mW sobre la muestra en el sistema μ -Raman

- Con un tiempo de exposición de 5 segundos del haz.
- Los espectros se registraron en intervalos de 60 segundos cada uno.

Para la calibración del equipo μ -Raman se utilizó una pastilla de hidroxiapatita sintética, este material se monitoreó previo a cada sesión. Se utilizó un láser de Nd: YVO₄ con $\lambda = 532$ nm y una resolución de 4 cm^{-1} en el sistema Raman Nicolet Almega™ XR. Los espectros fueron obtenidos en un intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} y fueron tratados en el programa de gráficos Microcal™ Origin v.6 (Microcal Software, Inc. USA) para identificar las vibraciones características de los grupos funcionales PO₄³⁻ (intervalo $1100\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$)⁽⁴⁶⁾ y el OH⁻ (intervalo $3510\text{-}3650 \text{ cm}^{-1}$)⁽⁴⁶⁾. Una vez calibrado el equipo se colocó cada espécimen sobre el portaobjetos del microscopio acoplado al equipo Raman (Fig.28), para obtener los espectros de los diferentes compuestos fluorados utilizados en Odontopediatría (Di-Fluor Silano [DFS], Fluoruro de Plata Amoniacal [FPA] y Flúor Fosfato Acidulado [FFA]). Los espectros se obtuvieron de manera puntual en la subsuperficie del esmalte a 50, 100 y 150 μm de profundidad, así como a 0, 5, 10 y 15 días (pH cíclico) de tratamiento.

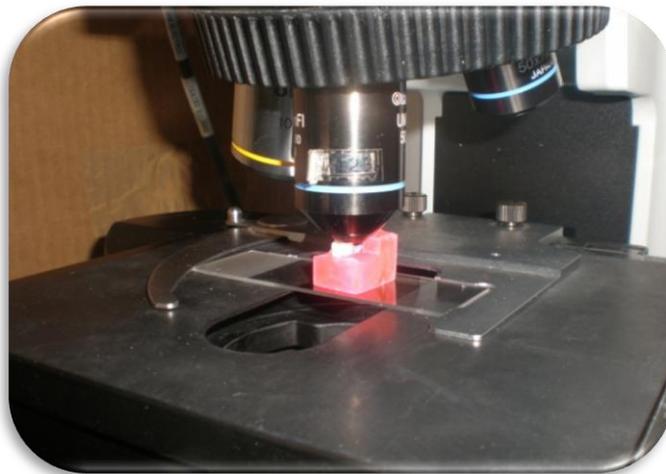


Figura 28.- Colocación del espécimen sobre el portaobjetos del μ -Raman.
Fuente directa.

Se obtuvieron 390 espectros de los grupos experimentales, más 30 espectros de hidroxiapatita sintética. La distribución de la muestra se realizó de la siguiente manera (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Distribución del número de espectros que se realizaron en μ -Raman.

P*	SANO	DFS	DFS	DFS	FFA	FFA	FFA	FPA	FPA	FPA	GC	GC	GC
	0d	5d	10d	15	5d	10d	15d	5d	10d	15d	5d	10d	15d
50 μ m	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
100 μ m	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
150 μ m	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
TOTAL	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30

*P: profundidad. Fuente directa.

VII. RESULTADOS

1. Microdureza

La muestra estuvo inmersa en pH cíclico durante 5, 10 y 15 días. Se determinó la microdureza (MD) en modo Vickers (25gf/20seg), en sentido oclusal, medio y cervical y a 50, 100 y 150 μm de profundidad.

Se realizaron indentaciones en la subsuperficie del esmalte con la finalidad de determinar la microdureza (HV) en el universo de 65 molares extraídos, y que fueron seccionados longitudinalmente (N=130) cuya superficie de esmalte fue desmineralizada *in vitro* y se distribuyeron aleatoriamente para recibir los siguientes tratamientos: FFA (n=15); DFS (n=15); FPA (n=15), GC, (n=15) y un grupo Sano, (n=5). Se realizaron 5850 indentaciones en total como se muestra en el cuadro 2 señalando que únicamente 5 especímenes de cada grupo participaron en esta prueba, ya que el resto fue asignado para la otra técnica de caracterización ($\mu\text{-R}$).

Cuadro 2.- Distribución del número de indentaciones que se realizaron en Microdureza (HVN).

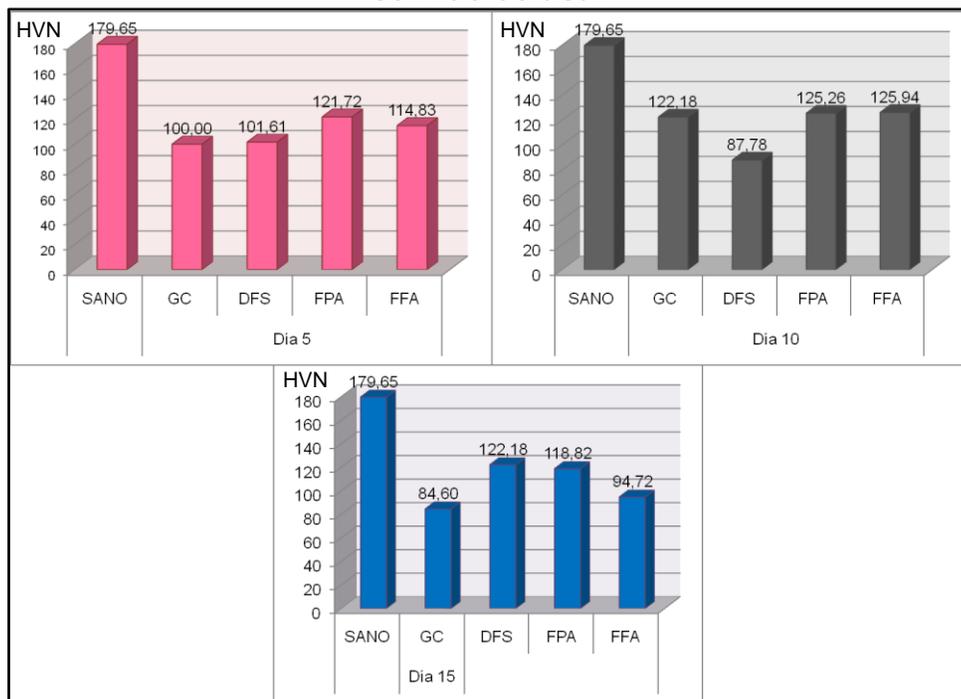
Grupo Exp.	0 días	5 días	10 días	15 días
Sano	450	-	-	-
DFS	-	450	450	450
FPA	-	450	450	450
FFA	-	450	450	450
GC	-	450	450	450
TOTAL	450	1800	1800	1800

90 indentaciones por 5 especímenes= 450 cada uno.
Fuente directa.

Una vez concluido el experimental, se llevó a cabo la captura de los datos de microdureza y se graficaron los resultados. Primero se realizó una comparación intergruparal para ver el comportamiento de los grupos experimentales en relación al pH cíclico. Como se puede observar de la figura 29 hasta la figura 37 las gráficas de color rosa represental al día 5, las barras de color gris representan al día 10 y las barras de color azul, representan el día 15 de tratamiento; las barras ya mencionadas se compararon siempre con el grupo sano para poder identificar si hubo una ganancia o pérdida en los valores de microdureza, representando el dato numérico arriba de las barras como el promedio de dichos valores.

En la figura 29, a 50 μm de profundidad en sentido oclusal, el grupo FPA a 5 días de tratamiento mostró valores de microdureza de 121.72, a los 10 días el grupo FFA con 125.94 y a 15 días el grupo DFS con 122.18.

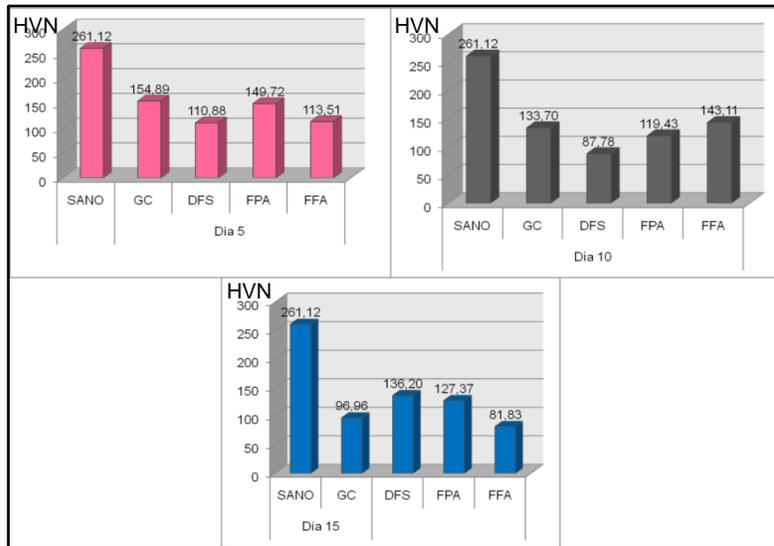
Figura 29.- Distribución de los valores de microdureza (HVN) a 50 μm en sentido oclusal.



Fuente directa

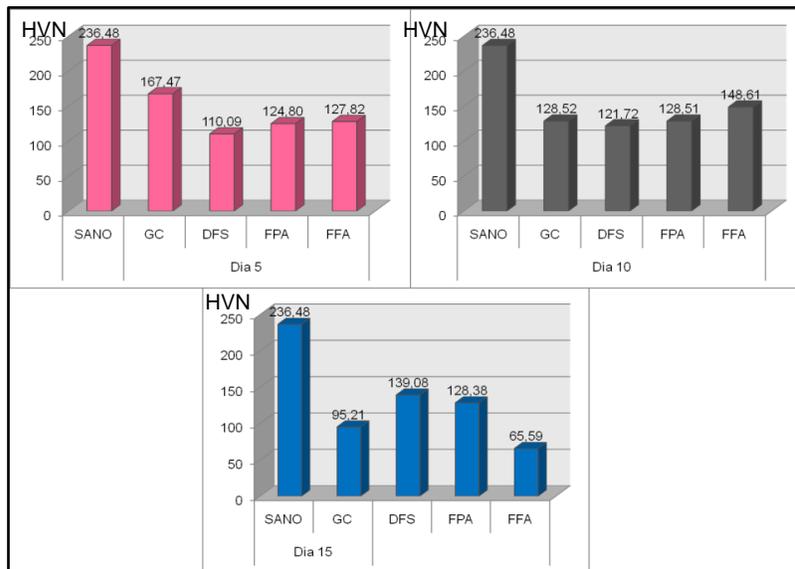
En la figura 30 el grupo FPA a 100 μm a 5 días, el GC con 154.80, a los 10 días el grupo FFA con 143.11 y a 15 días el grupo DFS con 136.20. En la figura 31 el GC 167.47 a 5 días, a 10 días el FFA 148.61 y a 15 días el DFS con 136.20.

Figura 30.- Distribución de los valores de microdureza (HVN) a 100 μm en sentido oclusal.



Fuente directa

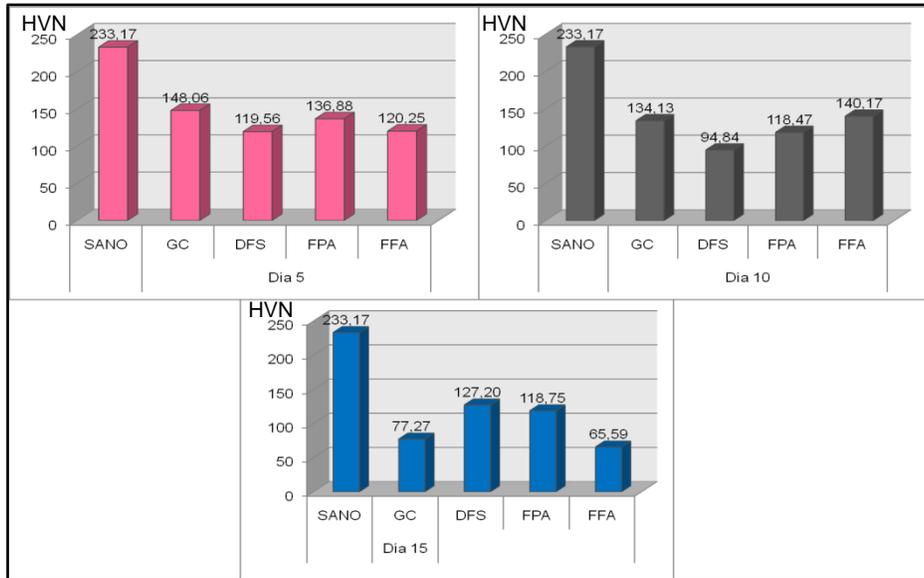
Figura 31.- Distribución de los valores de microdureza (HVN) a 150 μm en sentido oclusal.



Fuente directa

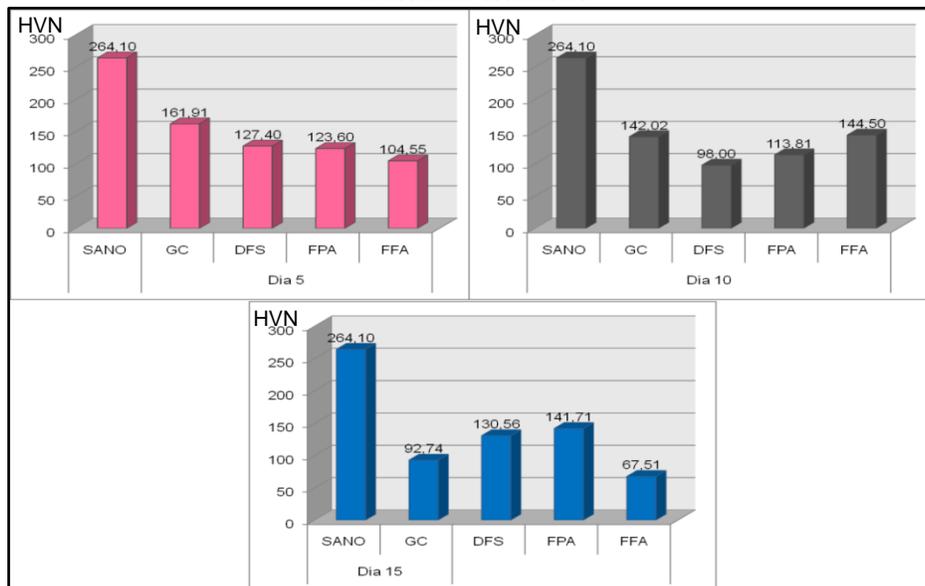
En la figura 32 ahora en sentido medio a 50 μm 148.06 al día 5 del FFA, al día 10 el FFA 140.17 y al día 15 el DFS con 127.20; en la figura 33 a 100 μm 161.91 del GC seguido del DFS con 127.40 al día 5, el FFA 144.50 al día 10 y FPA a 141.71 de promedio de microdureza a los 15 días.

Figura 32.- Distribución de los valores de microdureza (HVN) a 50 μm en sentido medio.



Fuente directa

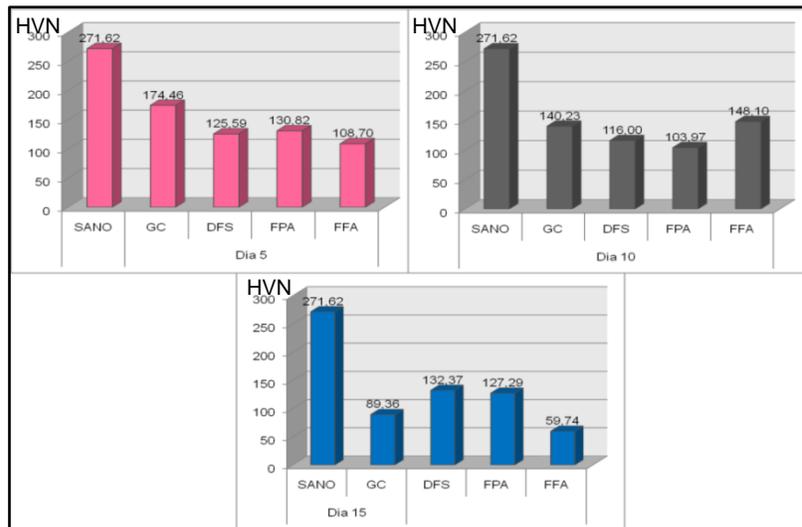
Figura 33.- Distribución de los valores de microdureza (HVN) a 100 μm en sentido medio.



Fuente directa

En la figura 34 en sentido medio a 150 μm 174.46 del GC, seguido del FPA con 130.82 al día 5, al día 10 el FPA 148.10 y al día 15 el DFS con 132.37.

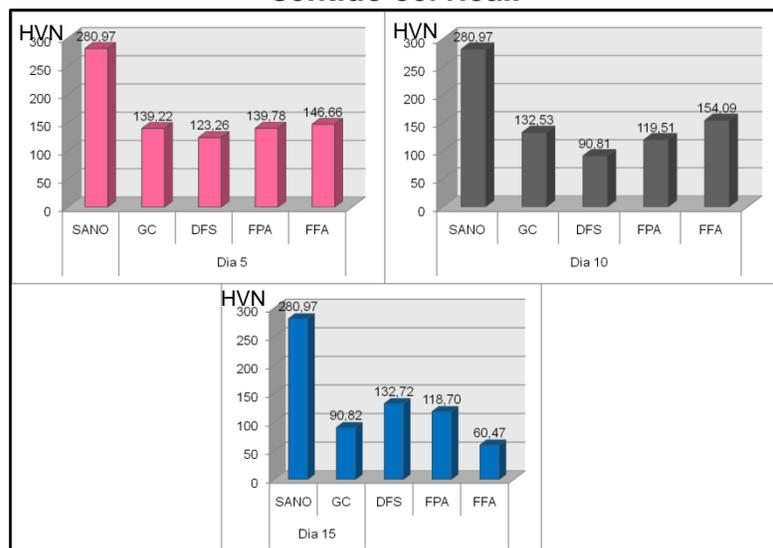
Figura 34.- Distribución de los valores de microdureza (HVN) a 150 μm en sentido medio.



Fuente directa

En la figura 35 a 50 μm en sentido cervical al día 5 un promedio de 146.66 del grupo FFA, 154.09 del grupo FFA al día 10 y a los 15 días el DFS 132.72 de promedio de microdureza.

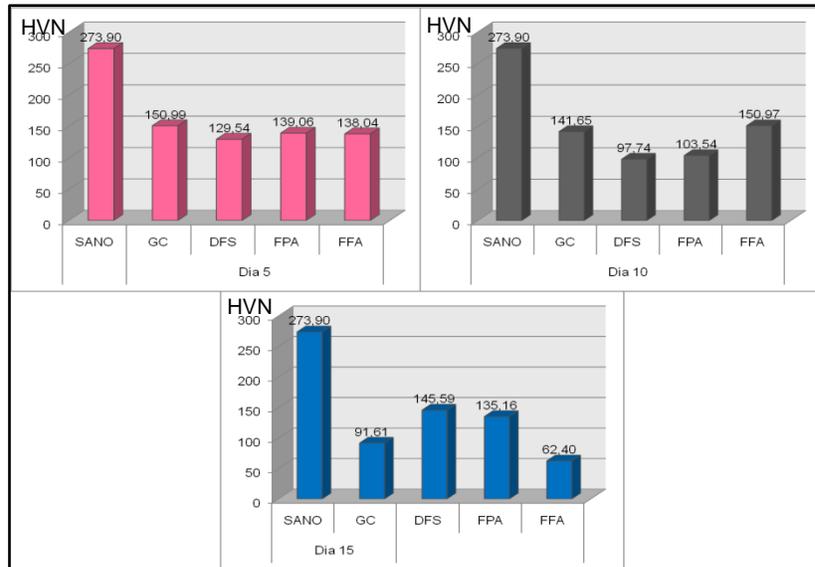
Figura 35.- Distribución de los valores de microdureza (HVN) a 50 μm en sentido cervical.



Fuente directa

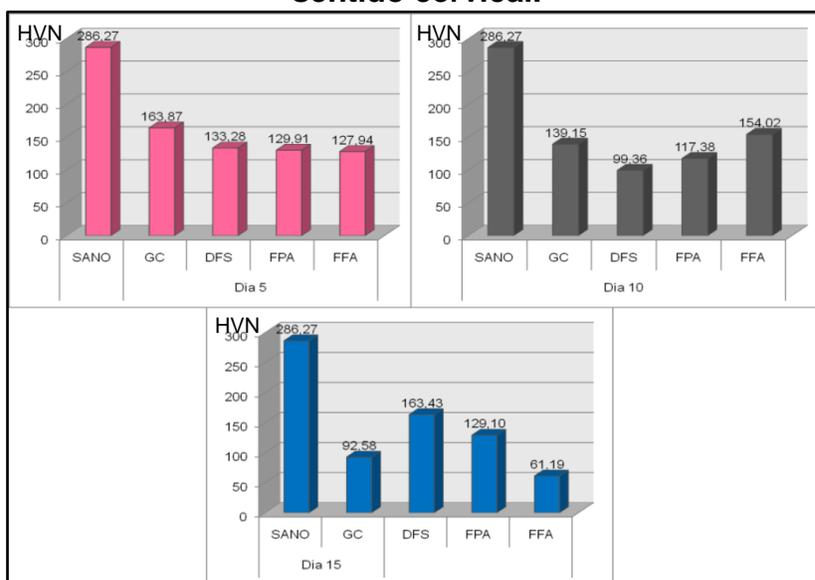
En la figura 36 en sentido cervical a 100 μm el GC 150.99, seguido del FPA 139.06 al día 5, al día 10 el FFA 150.97 y al día 15 el DFS con 145.59; en la figura 37 a 150 μm en sentido cervical al día 5, el GC 163.87 y el DFS 133.28, al día 10 el FFA 154.02 y a los 15 días DFS a 163.43 de promedio de microdureza.

Figura 36.- Distribución de los valores de microdureza (HVN) a 100 μm en sentido cervical.



Fuente directa

Figura 37.- Distribución de los valores de microdureza (HVN) a 150 μm en sentido cervical.

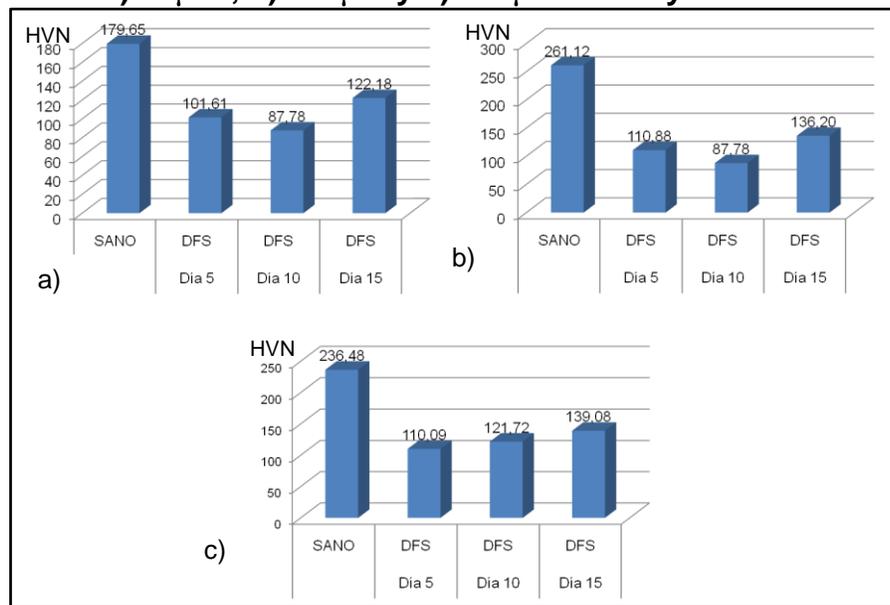


Fuente directa

De las figuras 38 a la figura 49 se presentaron los resultados de la prueba de microdureza representados en gráficas de barras de manera intragrupal, donde se observó el mismo grupo experimental a los diferentes días de tratamiento.

El grupo tratado con DFS (barras en color azul), en sentido oclusal presentó el valor de microdureza mas alto a los 15 días de tratamiento a 50 μm 122.18, a 100 μm 136.20 y 150 μm 139.06 siguiendo el día 5 a 50 μm 101.61 y 100 μm 110.88 y el día 10 a 150 μm 139.08 de profundidad.

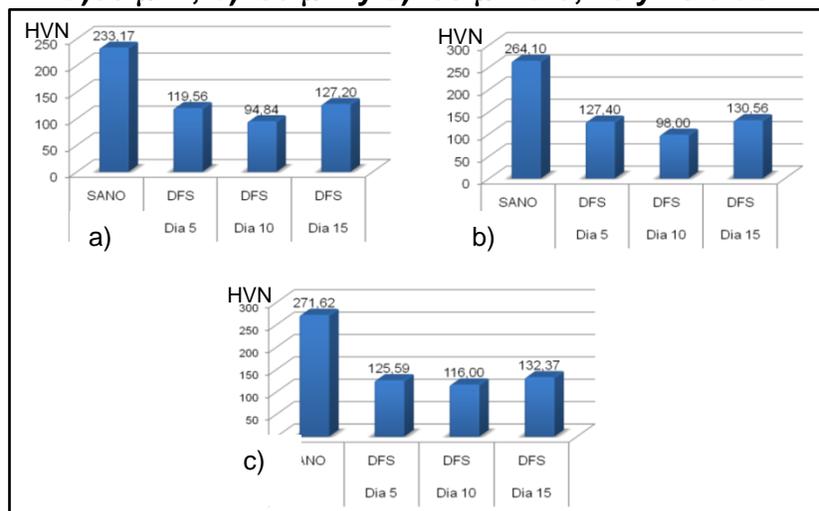
**Figura 38.- Comportamiento del grupo DFS en sentido oclusal
a)50 μm , b)100 μm y c)150 μm a 5 10 y 15 días.**



Fuente directa.

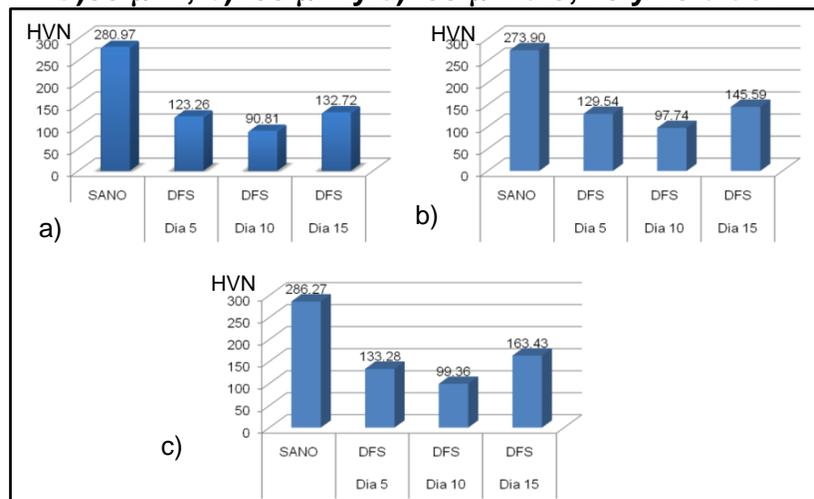
En la figura 39 se observa en sentido medio el DFS que presentó el valor de microdureza más alto a los 15 días de tratamiento a 50 μm 127.20, 100 μm 130.56 y 150 μm 132.37 siguiendo el día 5, a 50 μm 119.56 y 100 μm 125.59 y por último el día 5 a 150 μm 125.59 de profundidad; en la figura 40 en sentido cervical el más alto fue a 15 días a 50 μm 132.72 100 μm 145.59 y 150 μm 163.43 siguiendo el día 5 a 50 μm 123.26, 100 μm 129.26 y 150 μm 133.28.

**Figura 39.- Comportamiento del grupo DFS en sentido medio
a)50 μm , b)100 μm y c)150 μm a 5, 10 y 15 días.**



Fuente directa

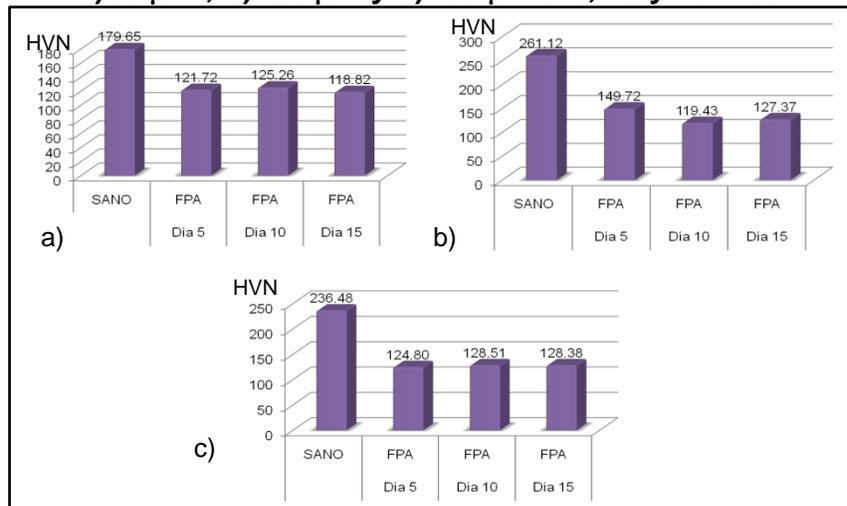
**Figura 40.- Comportamiento del grupo DFS en sentido cervical
a)50 μm , b)100 μm y c)150 μm a 5, 10 y 15 días.**



Fuente directa

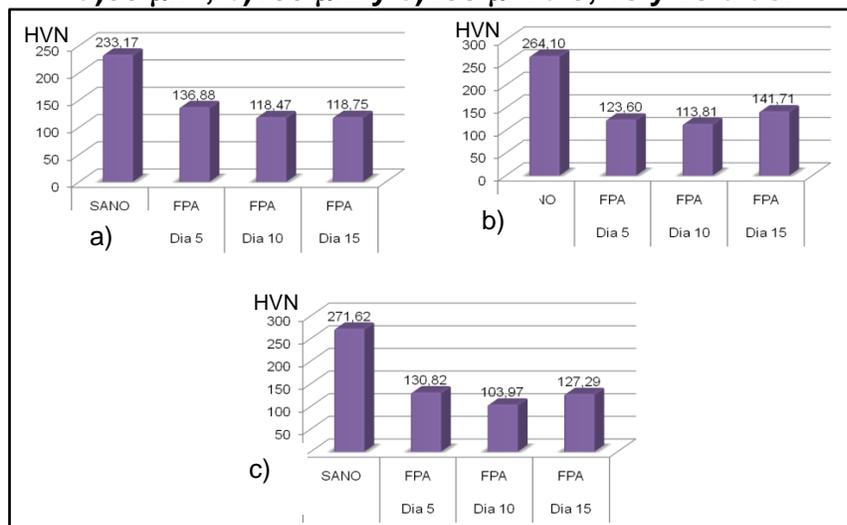
El grupo tratado con FPA (barras en color morado), en sentido oclusal (Fig. 41) presentó el valor de microdureza más alto a los 10 días de tratamiento a 50 μm 125.26, a 5 días 100 μm 149.72 y a 10 días en 150 μm 128.51; en la figura 42 en sentido medio el valor más alto fue a 50 μm , 5 días 136.88, a 15 días en 100 μm 141.70 y a 5 días en 150 μm 130.82.

**Figura 41.- Comportamiento del grupo FPA en sentido oclusal
a)50 μm , b)100 μm y c)150 μm a 5, 10 y 15 días.**



Fuente directa

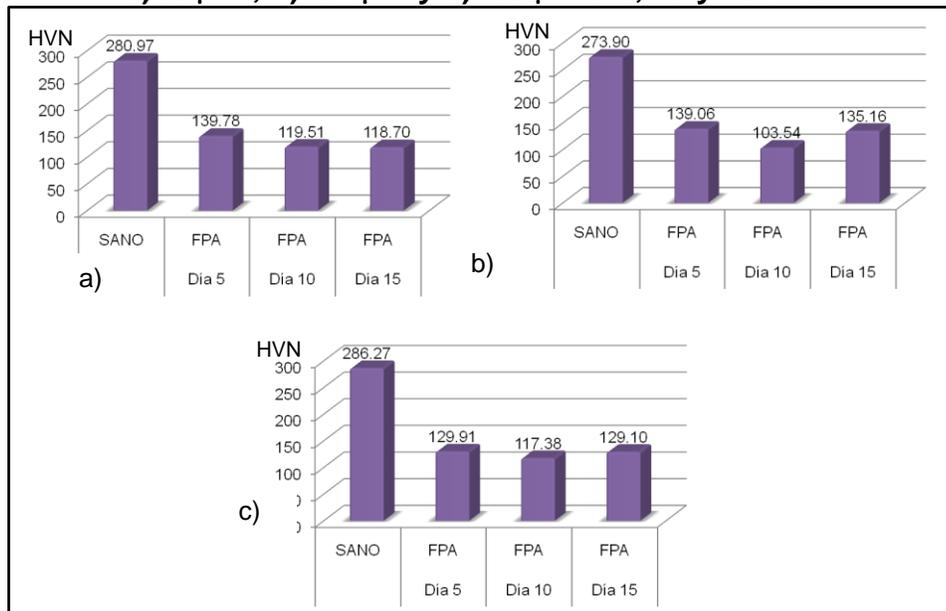
**Figura 42.- Comportamiento del grupo FPA en sentido medio
a)50 μm , b)100 μm y c)150 μm a 5, 10 y 15 días.**



Fuente directa

En la figura 43 se observa en sentido cervical el grupo tratado con FPA que presentó el valor de microdureza más alto a los 5 días de tratamiento a 50 μm 139.79, 100 μm 139.06 y 150 μm 129.91 siguiendo el día 10, a 50 μm 119.51, 100 μm 135.16 en 10 días y por último el día 15 a 150 μm 129.10 de profundidad.

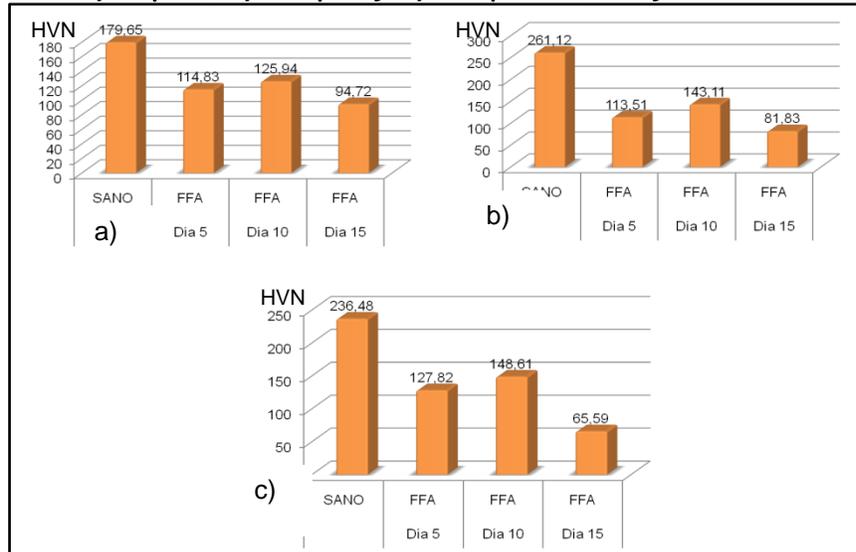
**Figura 43.-Comportamiento del grupo FPA en sentido cervical
a)50 μm , b)100 μm y c)150 μm a 5, 10 y 15 días.**



Fuente directa

El grupo tratado con FFA (barras en color naranja), en sentido oclusal presentó valores de microdureza más altos a los 10 días de tratamiento a 50 μm 125.91, a 10 días 100 μm 143.11 y a 10 días en 150 μm 148.61, después a 5 días 114.83 a 50 μm , 113.51 a 100 μm y 127.82 a 150 μm y por último a 15 días 94.72 a 50 μm , 81.83 a 100 μm y 65.59 a 150 μm de profundidad como se muestra en la figura 44.

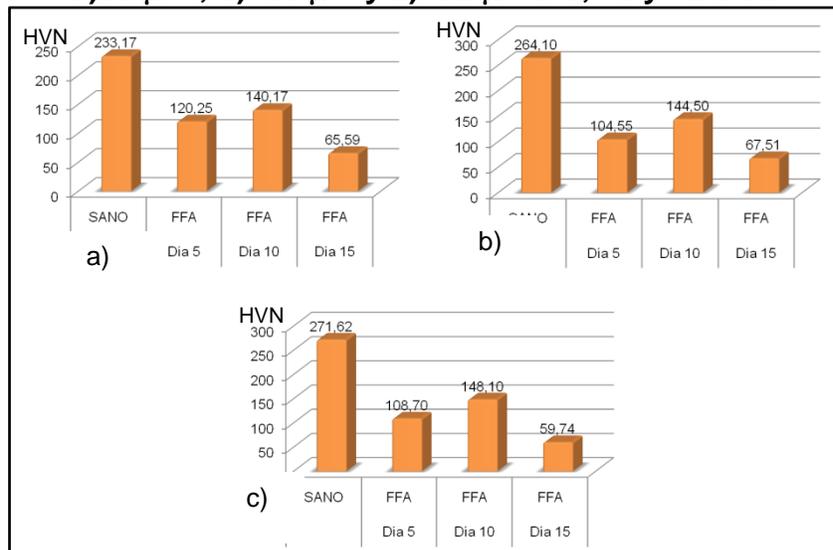
Figura 44.- Comportamiento del grupo FFA en sentido oclusal
a)50 μm , b)100 μm y c)150 μm a 5, 10 y 15 días.



Fuente directa

En la figura 45 se observa en sentido medio el grupo tratado con FFA que presentó el valor de microdureza más alto a los 10 días de tratamiento a 50 μm 140.17, a 10 días 100 μm 144.50 y a 10 días en 150 μm 148.10, después a 5 días 120.25 a 50 μm , 104.55 a 100 μm y 108.70 a 150 μm y por último a 15 días 65.59 a 50 μm , 67.51 a 100 μm y 59.74 a 150 μm de profundidad.

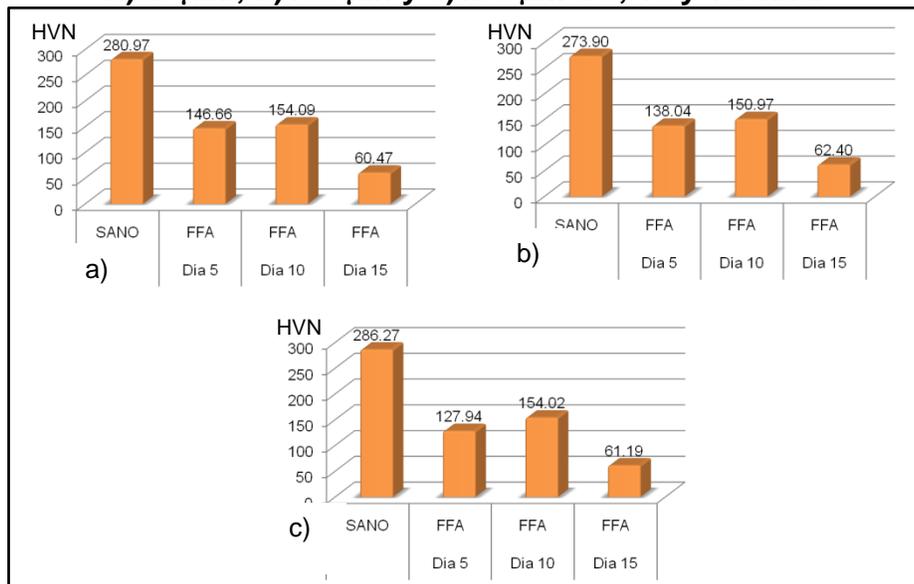
Figura 45.- Comportamiento del grupo FFA en sentido medio
a)50 μm , b)100 μm y c)150 μm a 5, 10 y 15 días.



Fuente directa

En la figura 46 se observa en sentido cervical el grupo tratado con FFA que presentó el valor de microdureza más alto a los 10 días de tratamiento a 50 μm 154.09, a 10 días 100 μm 150.97 y a 15 días en 150 μm 154.02, después a 5 días 146.66 a 50 μm , 138.04 a 100 μm y 127.94 a 150 μm y por último a 15 días 60.47 a 50 μm , 62.40 a 100 μm y 61.19 a 150 μm de profundidad.

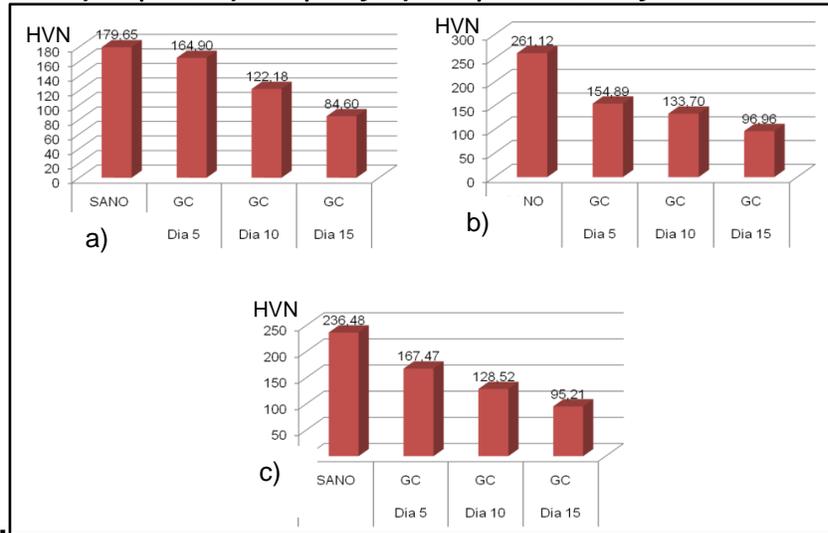
**Figura 46.- Comportamiento del grupo FFA en sentido cervical
a) 50 μm , b) 100 μm y c) 150 μm a 5, 10 y 15 días.**



Fuente directa

El grupo control (GC) (barras en color rojo) que no se le colocó tratamiento, en sentido oclusal presentó valores de microdureza más altos a los 5 días de tratamiento a 50 μm 164.90, a 5 días 100 μm 154.89 y a 5 días en 150 μm 167.47, después a 10 días 122.18 a 50 μm , 133.70 a 100 μm y 128.52 a 150 μm y por último a 15 días 84.60 a 50 μm , 96.96 a 100 μm y 95.21 a 150 μm de profundidad como se muestra en la figura 47.

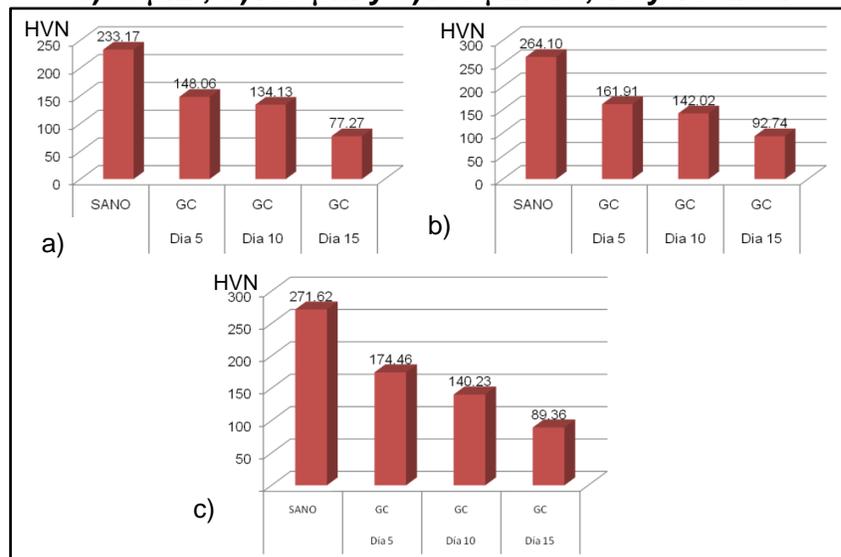
**Figura 47.- Comportamiento del grupo GC en sentido oclusal
a)50 μm , b)100 μm y c)150 μm a 5, 10 y 15 días**



Fuente directa

En la figura 48 se observa en sentido medio el grupo control (GC) que presentó valores de microdureza más altos a los 5 días de tratamiento a 50 μm 148.06, a 5 días 100 μm 161.91 y a 5 días en 150 μm 174.46, después a 10 días 134.13 a 50 μm , 142.02 a 100 μm y 140.23 a 150 μm y por último a 15 días 77.27 a 50 μm , 92.74 a 100 μm y 89.36 a 150 μm de profundidad.

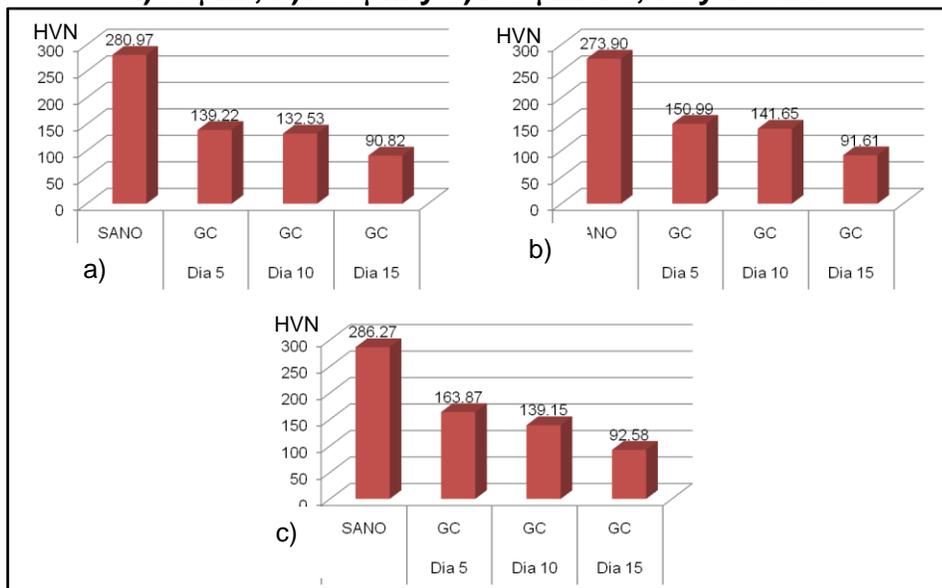
**Figura 48.- Comportamiento del grupo GC en sentido medio
a)50 μm , b)100 μm y c)150 μm a 5, 10 y 15 días.**



Fuente directa

En la figura 49 se observa en sentido cervical el grupo control (GC) que presentó valores de microdureza más altos a los 5 días de tratamiento a 50 μm 139.22, a 5 días 100 μm 150.99 y a 5 días en 150 μm 163.87, después a 10 días 132.53 a 50 μm , 141.65 a 100 μm y 139.15 a 150 μm y por último a 15 días 90.82 a 50 μm , 91.61 a 100 μm y 92.58 a 150 μm de profundidad.

**Figura 49.- Comportamiento del GC en sentido cervical
a) 50 μm , b) 100 μm y c) 150 μm a 5, 10 y 15 días**

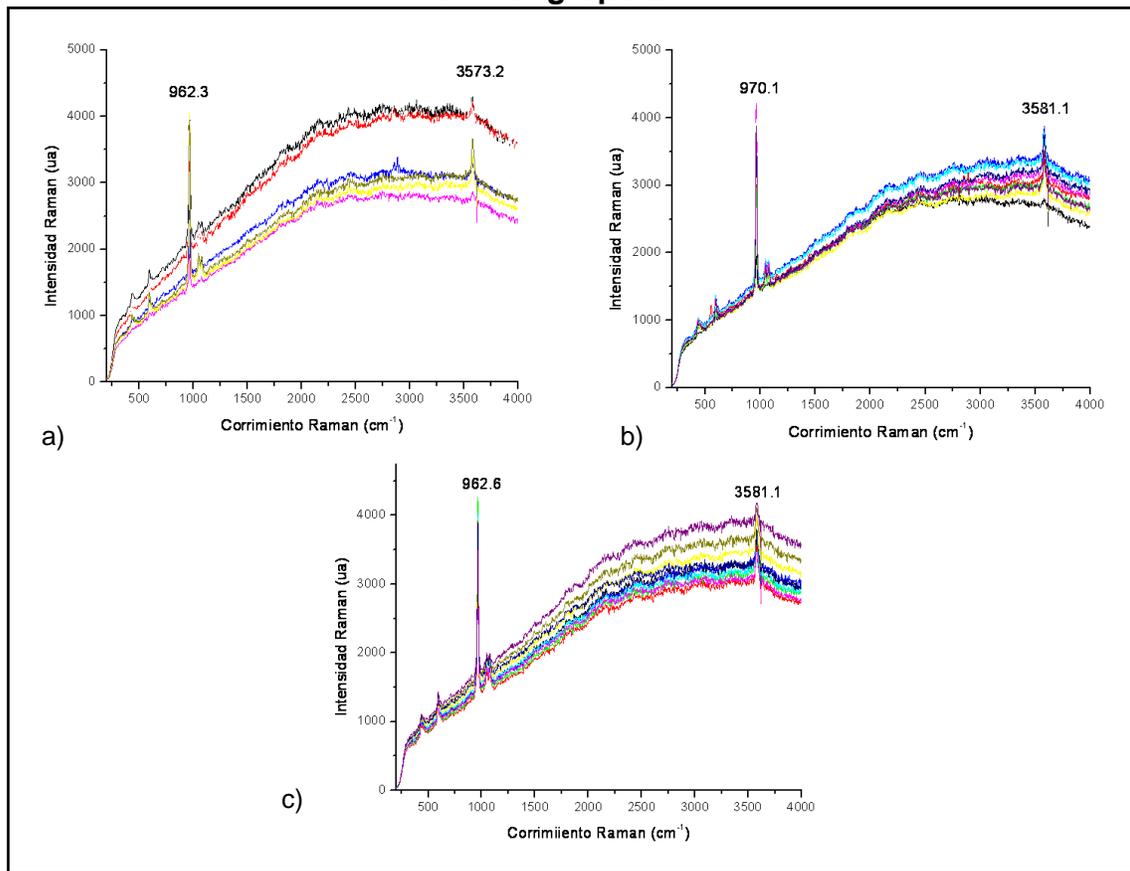


Fuente directa

2. μ -Raman

Todos los espectros μ -Raman se obtuvieron en un μ -Raman Nicolet Almega™ Posteriormente fueron exportados al programa Origin v.6 donde se obtuvieron el 100% de los espectros en un intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} . Toda la muestra presentó en todos los grupos fluorescencia como característica inherente de todas las muestras biológicas. Se analizaron los espectros con todos los grupos experimentales y se inició con el grupo sano (sin tratamiento), donde se observaron las siguientes características de los espectros; en la figura 50 a) a 50 μm , b) a 100 μm y c) 150 μm presentaron espectros con una intensidad de aproximadamente 4000 ua para el grupo PO_4^{3-} , y 4500 ua para el grupo OH^- , siendo estos los espectros más representativos y serán comparados con el resto de los grupos.

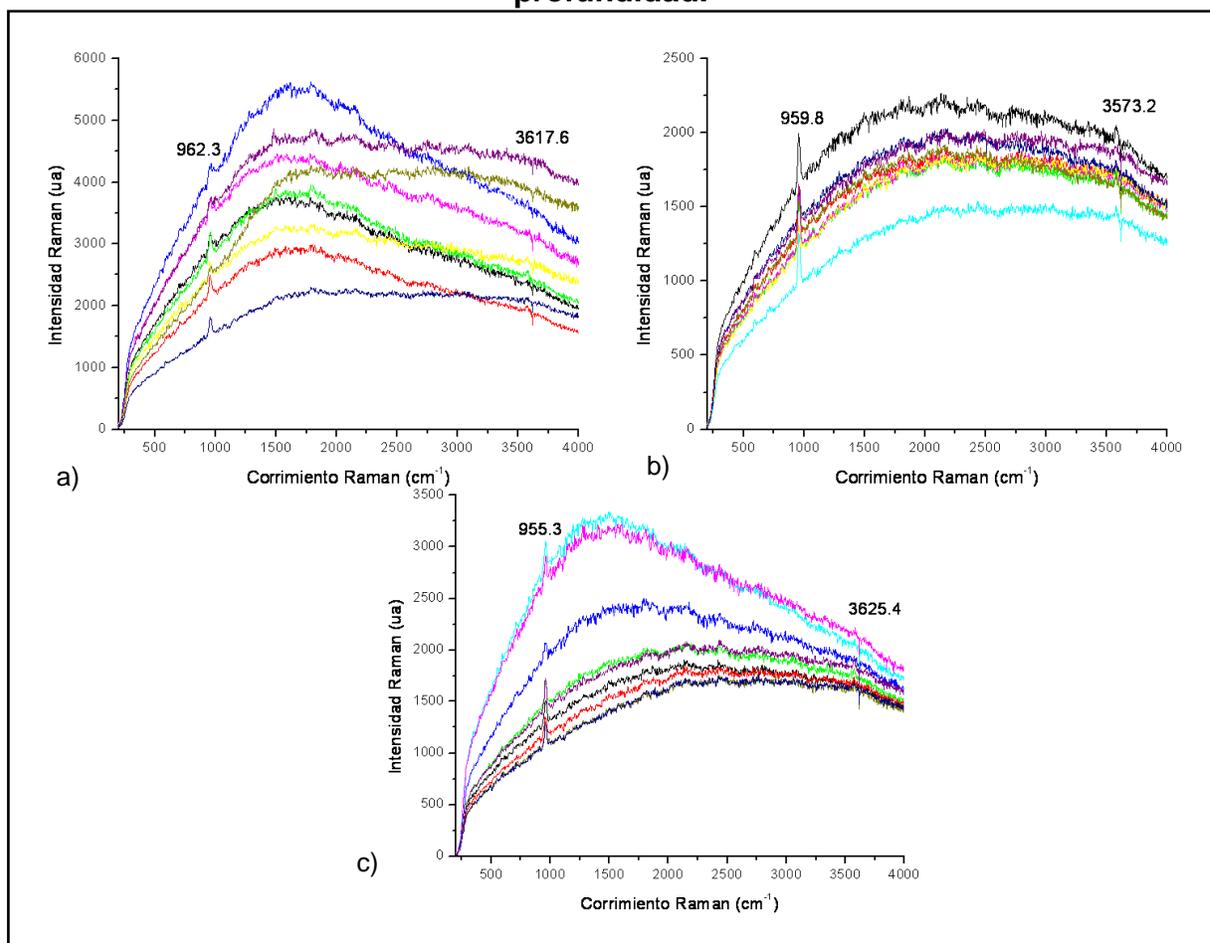
Figura 50.- Espectros μ -Raman donde se observa el grupo sano y las bandas características para el grupo PO_4^{3-} en el intervalo de 1100-900 cm^{-1} y 3510-3650 cm^{-1} el grupo OH^- .



Fuente directa.

El primer grupo experimental analizado por μ -Raman fue el DFS a 5 días de tratamiento como se muestra en la Figura 51 a) a 50 μm se observó una intensidad de 3000 ua; b) a 100 μm una intensidad de 2000 ua y c) 1500 ua para el grupo PO_4^{3-} , en lo que respecta al grupo OH^- las bandas en las proximidades de 3500 cm^{-1} no se observan claramente debido a la baja relación de la señal.

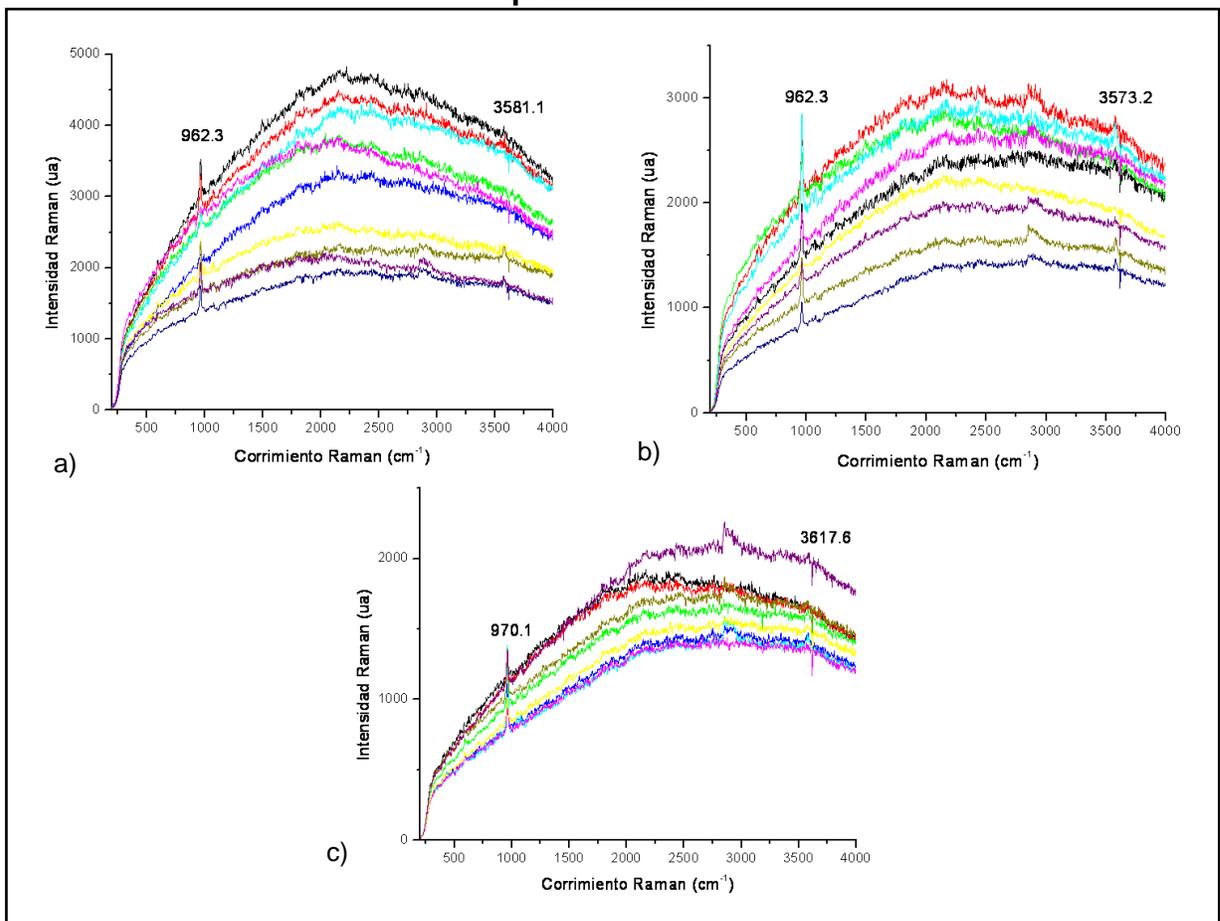
Figura 51.- Espectros μ -Raman del grupo tratado con DFS a 5 días de tratamiento en la siguiente secuencia; a) 50 μm , b) 100 μm y c) 150 μm de profundidad.



Fuente directa.

En la figura 52 se muestran los espectros adquiridos del grupo DFS a 10 días de tratamiento donde se observa a 50 μm (a) una intensidad aproximadamente de 3500 ua; a 100 μm , (b) las intensidades disminuyen hasta 2800 ua y en 150 μm , (c) llegan hasta 1200 ua para el grupo PO_4^{3-} , en cuanto al grupo OH^- en todas las profundidades. Las bandas en las proximidades de 3500 cm^{-1} no se observan claramente debido a la baja relación de la señal.

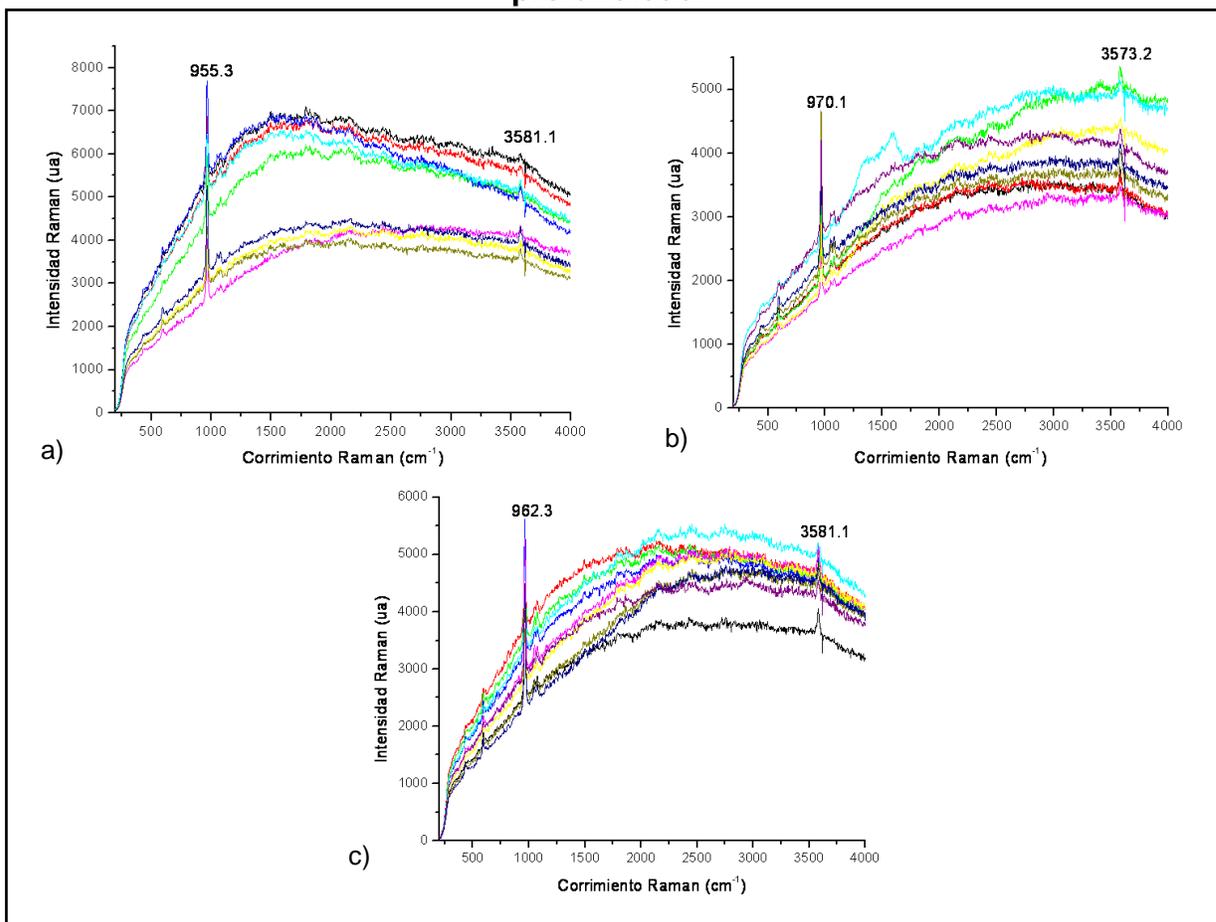
Figura 52.- Espectros μ -Raman del grupo tratado con DFS a 10 días de tratamiento en la siguiente secuencia; a) 50 μm , b) 100 μm y c) 150 μm de profundidad.



Fuente directa.

En la Figura 53 se adquirieron los espectros relacionados con el grupo DFS a 15 días de tratamiento, donde a 50 μm (a) los espectros presentaron una intensidad de 7500 ua para el grupo PO_4^{3-} y para el grupo OH^- no presentaron bandas características; a 100 μm (b) la intensidad del grupo PO_4^{3-} fue de 4500 ua y el grupo OH^- tuvo una intensidad de 4000 ua siendo para el grupo DFS las primeras bandas que aparecieron para el grupo OH^- ; y en 150 μm (c) se presentaron bandas características del grupo PO_4^{3-} y grupo OH^- de 5500 y 5000 ua respectivamente.

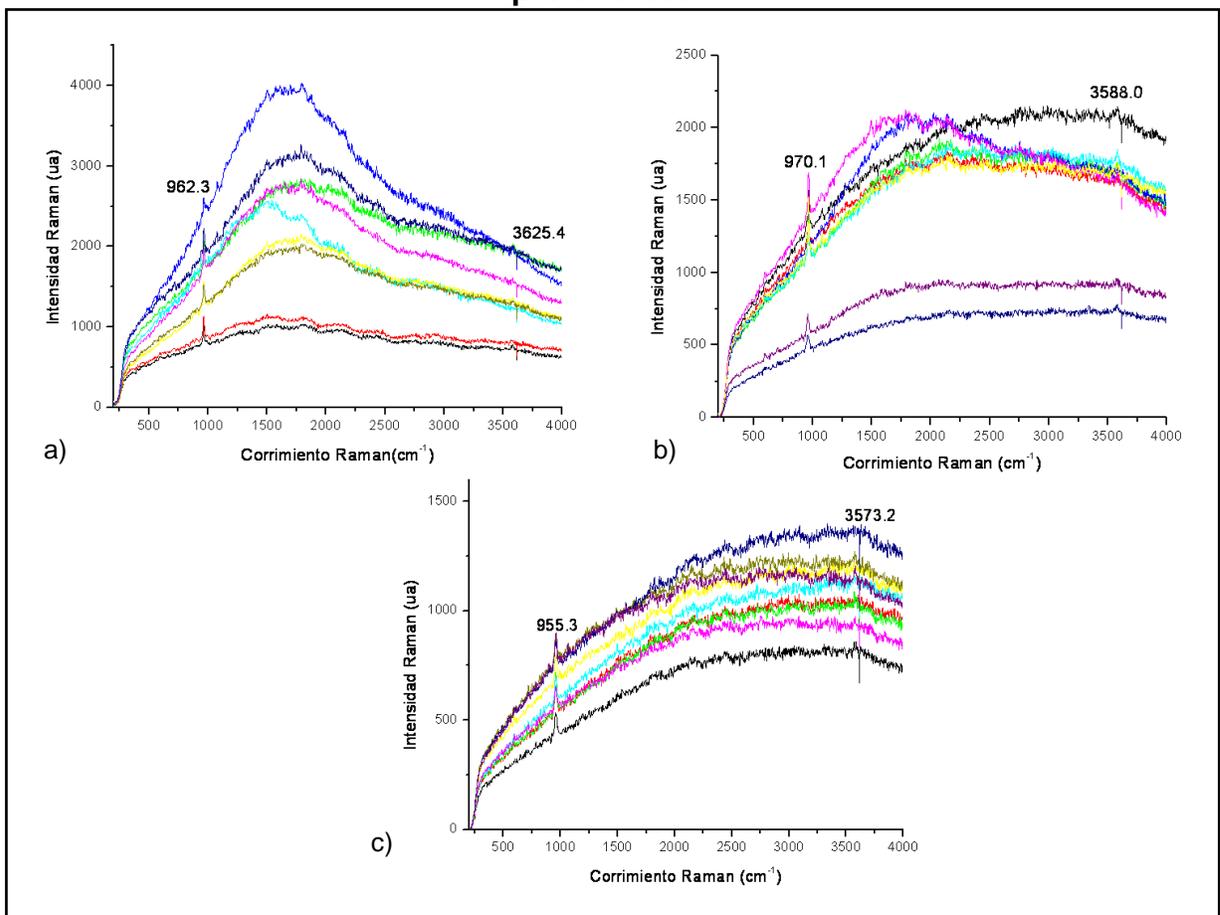
Figura 53.- Espectros μ -Raman del grupo tratado con DFS a 15 días de tratamiento en la siguiente secuencia; a) 50 μm , b) 100 μm y c) 150 μm de profundidad.



Fuente directa

En la figura 54 se observa el grupo experimental FFA a 5 días de tratamiento donde se observa a 50 μm (a) una intensidad de 1000 ua; a 100 μm (b) 1500 ua y en 150 μm (c) disminuye hasta llegar a 900 ua para el grupo PO_4^{3-} , en cuanto al grupo OH^- en todas las profundidades no presentó bandas características que debieron de haber estado en el corrimiento a 3500 cm^{-1} debido a la baja señal.

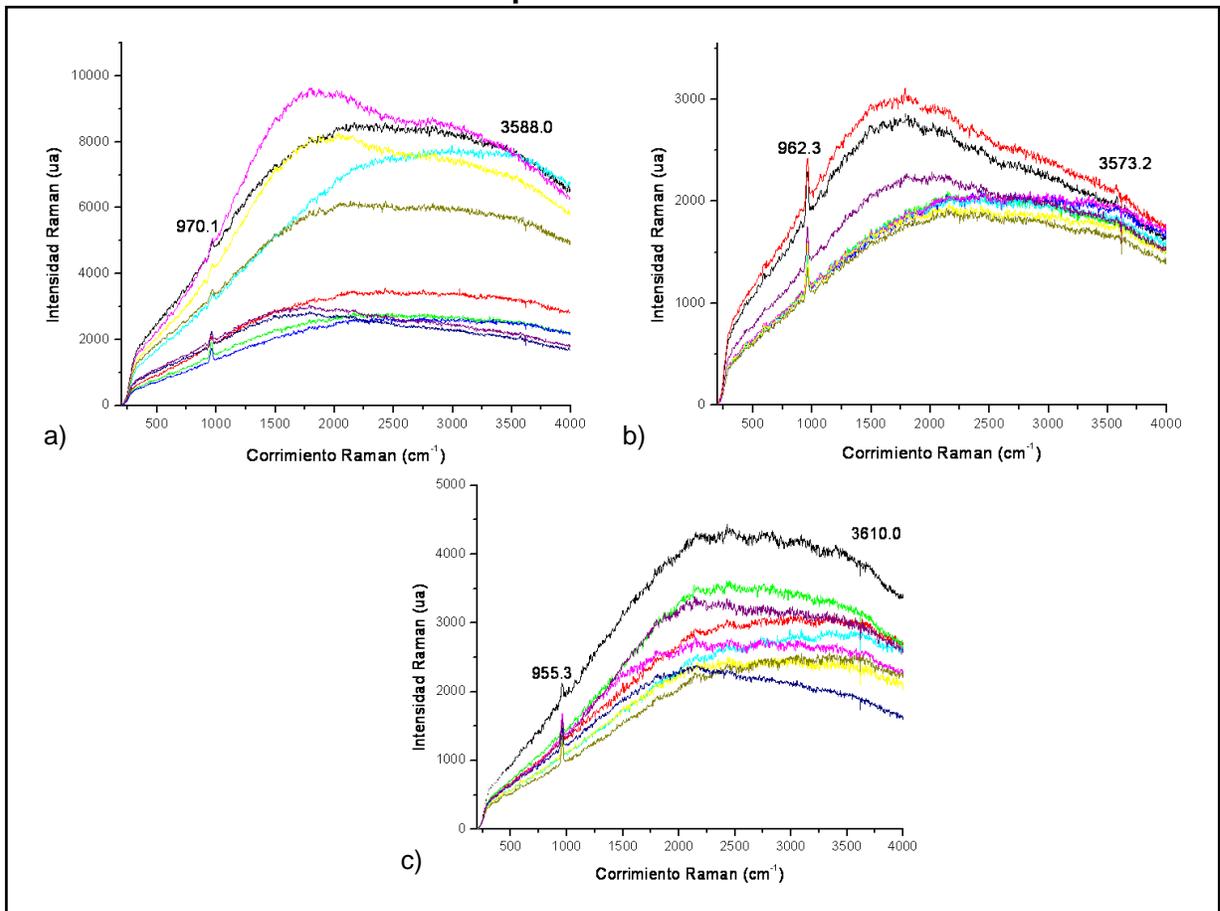
Figura54.- Espectros μ -Raman del grupo tratado con FFA a 5 días de tratamiento en la siguiente secuencia; a) 50 μm , b) 100 μm y c) 150 μm de profundidad.



Fuente directa.

En la figura 55 se observan los espectros del grupo experimental FFA a 10 días de tratamiento donde a 50 μm (a) no se observaron bandas características de los grupos PO_4^{3-} e OH^- (a) a 100 μm igual que (b) 2500 ua y a 150 μm (c) presentaron una intensidad de 1500 ua para el grupo PO_4^{3-} , en cuanto al grupo OH^- en todas las profundidades no se identificaron bandas características debido a la señal baja en el corrimiento a 3500 cm^{-1} .

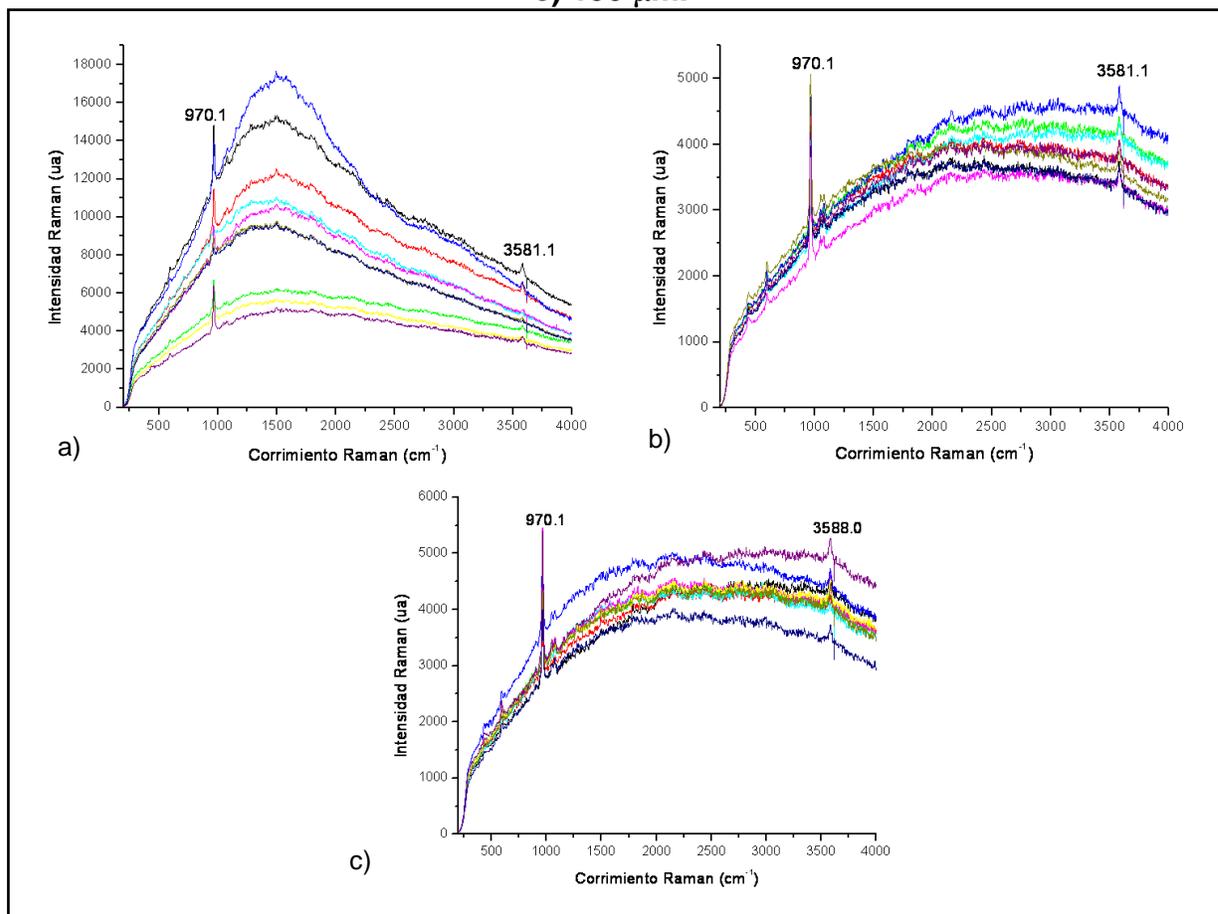
Figura 55.- Espectros μ -Raman del grupo tratado con FFA a 10 días de tratamiento en la siguiente secuencia; a) 50 μm , b) 100 μm y c) 150 μm de profundidad.



Fuente directa

En la Figura 56 se muestra la obtención de los últimos espectros correspondientes al grupo FFA a 15 días de tratamiento donde a 50 μm de profundidad (a) los espectros presentaron una intensidad de hasta 14500 ua para el grupo PO_4^{3-} y para el grupo OH^- de 8000 ua; a 100 μm (b) la intensidad del grupo PO_4^{3-} fue de 5000 ua y el grupo OH^- tuvo una intensidad de 4500 ua; y en 150 μm de profundidad (c) se presentaron bandas características del grupo PO_4^{3-} a 5500 ua y para el grupo OH^- 5000 ua respectivamente. Siendo hasta el momento el grupo que en todas las profundidades presentó bandas características evidentes para ambos grupos funcionales, además de la gran fluorescencia de la muestra.

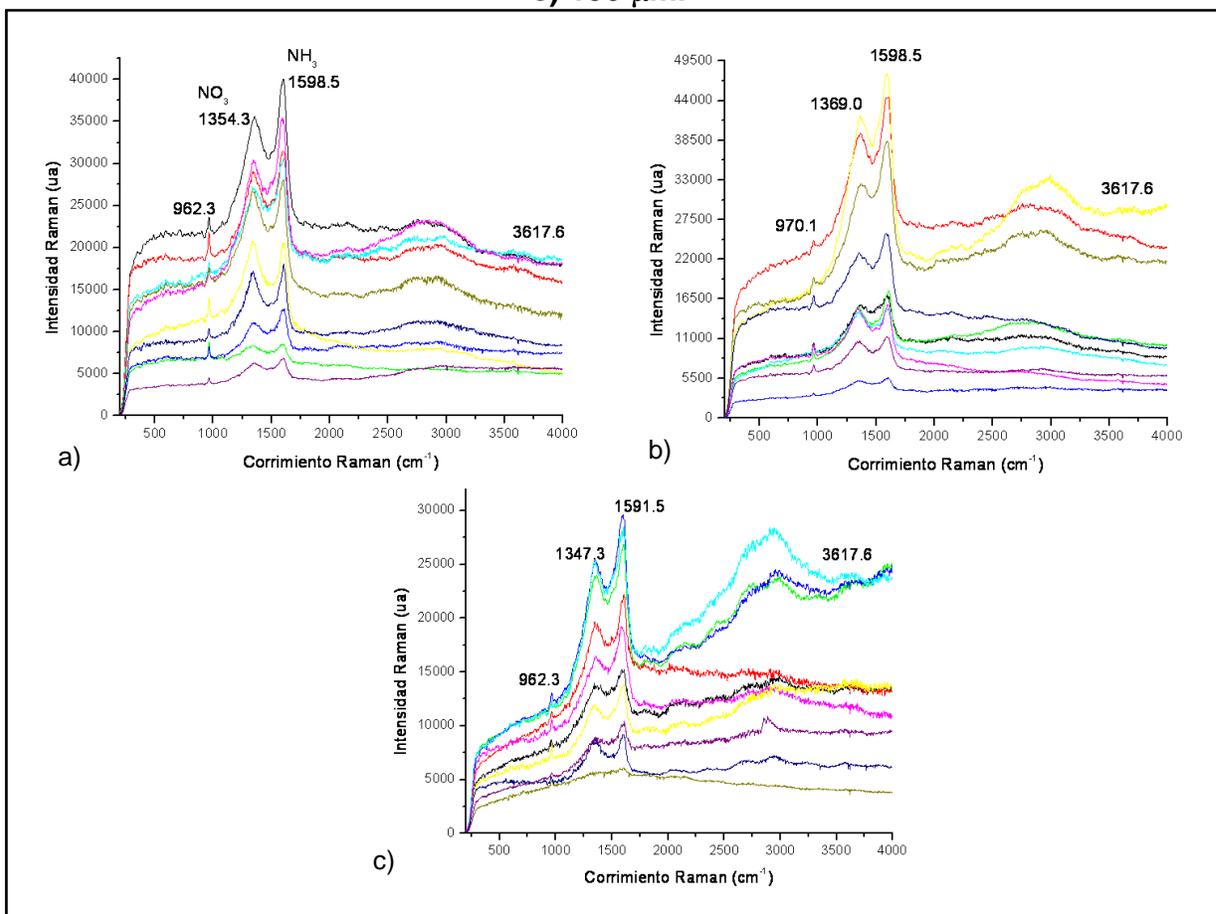
Figura 56.-Espectros μ -Raman del grupo tratado con FFA a 15 días de tratamiento en la siguiente secuencia de profundidades; a) 50 μm , b) 100 μm y c) 150 μm .



Fuente directa.

En la Figura 57 se observa el grupo tratado con Fluoruro de Plata Amoniaco [(FPA), $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$] a 5 días de tratamiento donde se observaron 3 bandas características en 50, 100 y 150 μm de profundidad que corresponden al siguiente corrimiento: en 962.3 cm^{-1} la banda corresponde al grupo PO_4^{3-} , en la siguiente banda 1354.3 cm^{-1} corresponde al grupo funcional de Nitratos Inorgánicos (NO_3^-) en el intervalo de 1410-1350 cm^{-1} , y por último en el modo vibracional 1605.8 cm^{-1} correspondió al grupo Amonio (NH_4) en el intervalo de 1635-1585 cm^{-1} con intensidades que fueron desde 22500 ua en 50 μm (a), a 22000 ua en 100 μm y en 150 μm de profundidad presentaron una disminución de hasta 12500 ua para el grupo PO_4^{3-} .

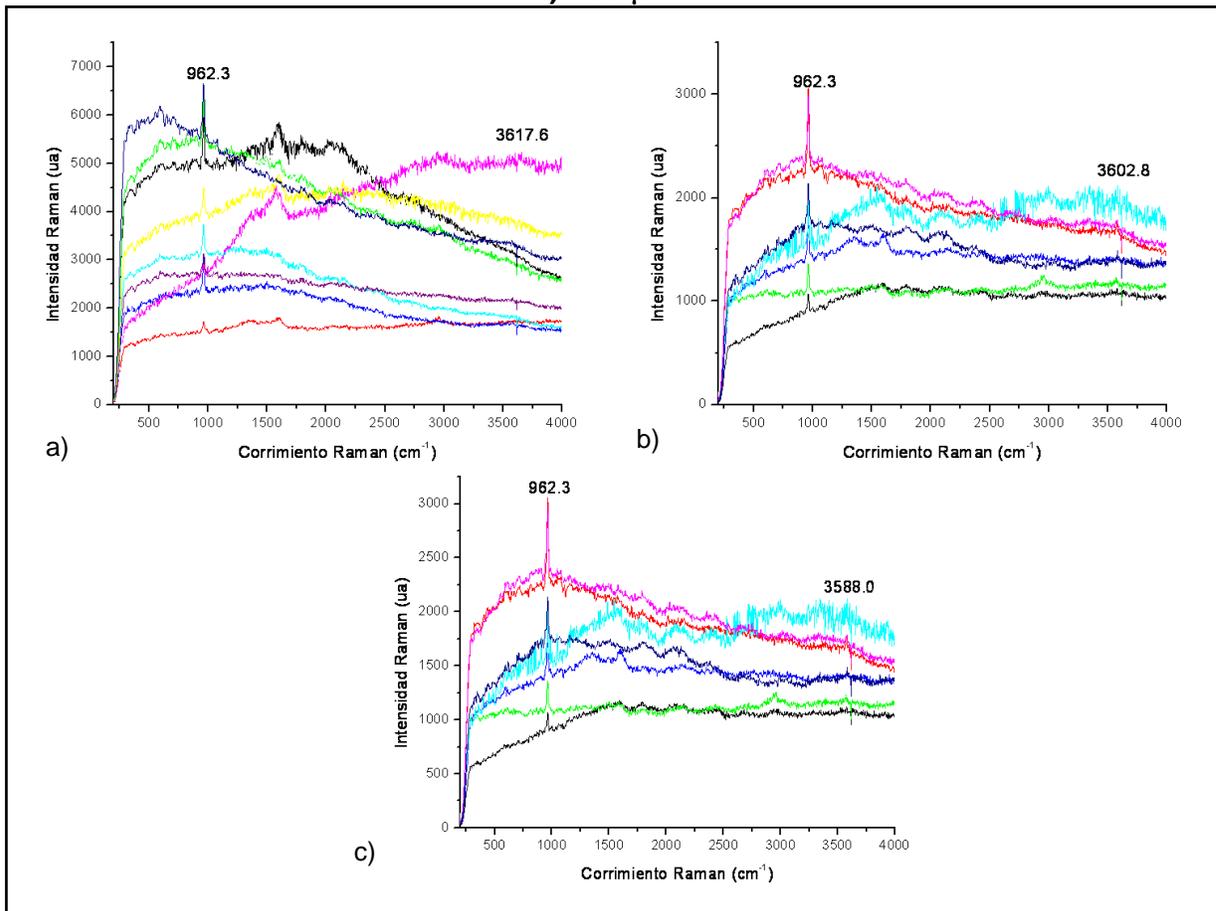
Figura 57.- Espectros μ -Raman del grupo tratado con FPA a 5 días de tratamiento en la siguiente secuencia de profundidades; a) 50 μm , b) 100 μm y c) 150 μm .



Fuente directa.

En la figura 58 se observa el grupo experimental FPA a 10 días de tratamiento donde se observó a 50 μm (a) una intensidad de 6500 ua; a 100 μm (b) 3000 ua y en 150 μm (c) 3000 ua para el grupo PO_4^{3-} , en cuanto al grupo OH^- en todas las profundidades no presentó bandas características. Se presentaron en algunos espectros correspondientes bandas de NO_3^- en un intervalo de $1350\text{-}1410\text{ cm}^{-1}$ y en lo que respecta al NH_4 tampoco se observaron bandas características en un intervalo de $1585\text{-}1635\text{ cm}^{-1}$.

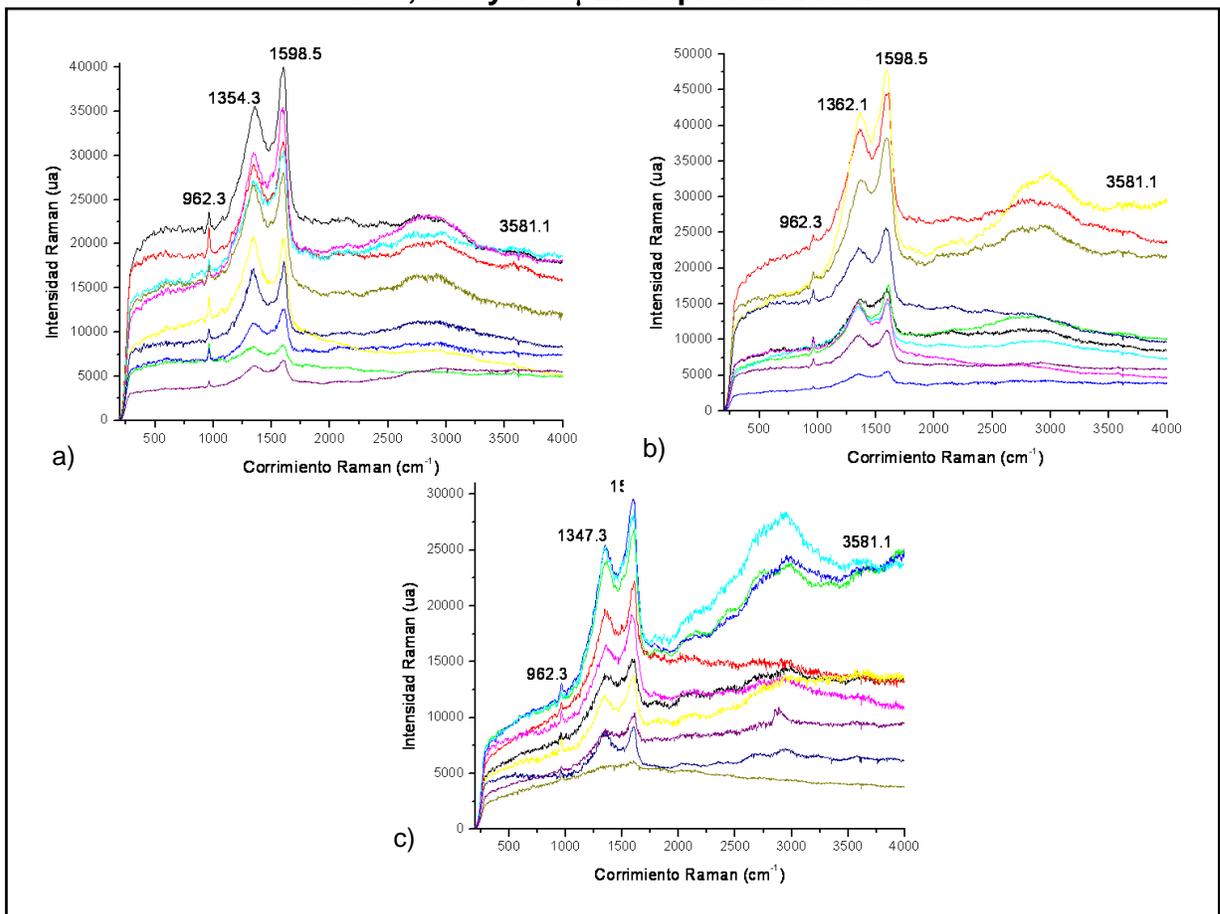
Figura. 58.- Espectros μ -Raman del grupo tratado con FPA a 10 días de tratamiento en la siguiente secuencia de profundidades; a) 50 μm , b) 100 μm y c) 150 μm .



Fuente directa.

En la Figura 59 se presenta el grupo FPA a 15 días de tratamiento donde se observaron 3 bandas características en 50, 100 y 150 μm de profundidad que corresponden al grupo PO_4^{3-} , en 962.3 cm^{-1} , 1354.3 cm^{-1} que correspondió al grupo NO_3^- y el grupo NH_4 en un corrimiento de 1598.5 cm^{-1} con intensidades a 50 μm (a), a 22000 ua; a 100 μm (b) 20000 ua y en 150 μm (c) 12500 ua.

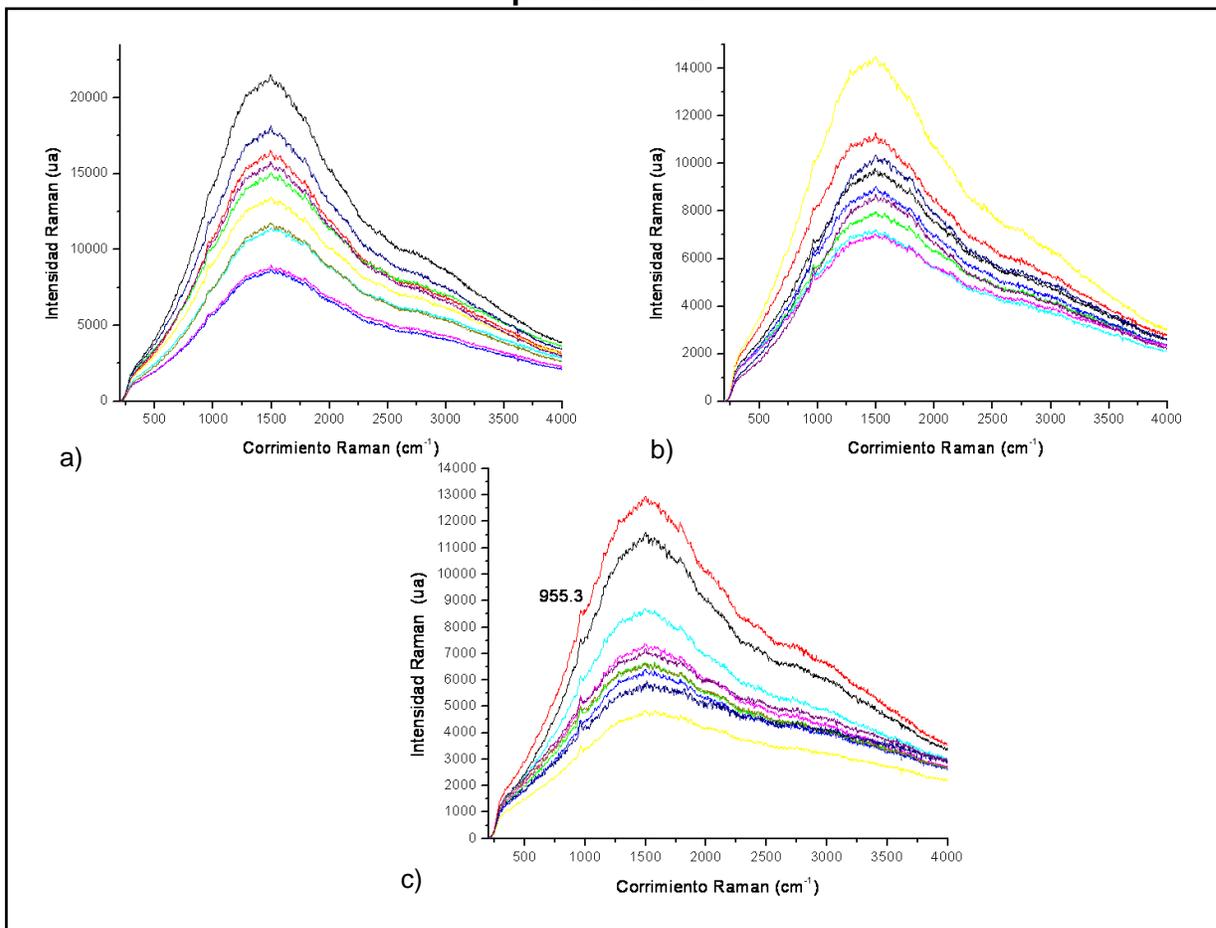
Figura 59.- Espectros μ -Raman Grupo tratado con FPA a 15 días de tratamiento a 50, 100 y 150 μm de profundidad.



Fuente directa.

En la Figura 60 se observa el GC que estuvo inmerso en el pH cíclico sin tratamiento, donde a 50 μm de profundidad (a) los espectros no presentaron bandas características para el grupo PO_4^{3-} ni para el OH^- debido a la gran fluorescencia que presentó este grupo en todas las profundidades de tal manera que a 50 μm llegó hasta 25000 ua; en 100 μm disminuyó hasta 14500 ua y en 150 μm llegó hasta 13000 ua obteniendo una banda con poca señal en 955.3 cm^{-1} para el grupo PO_4^{3-} .

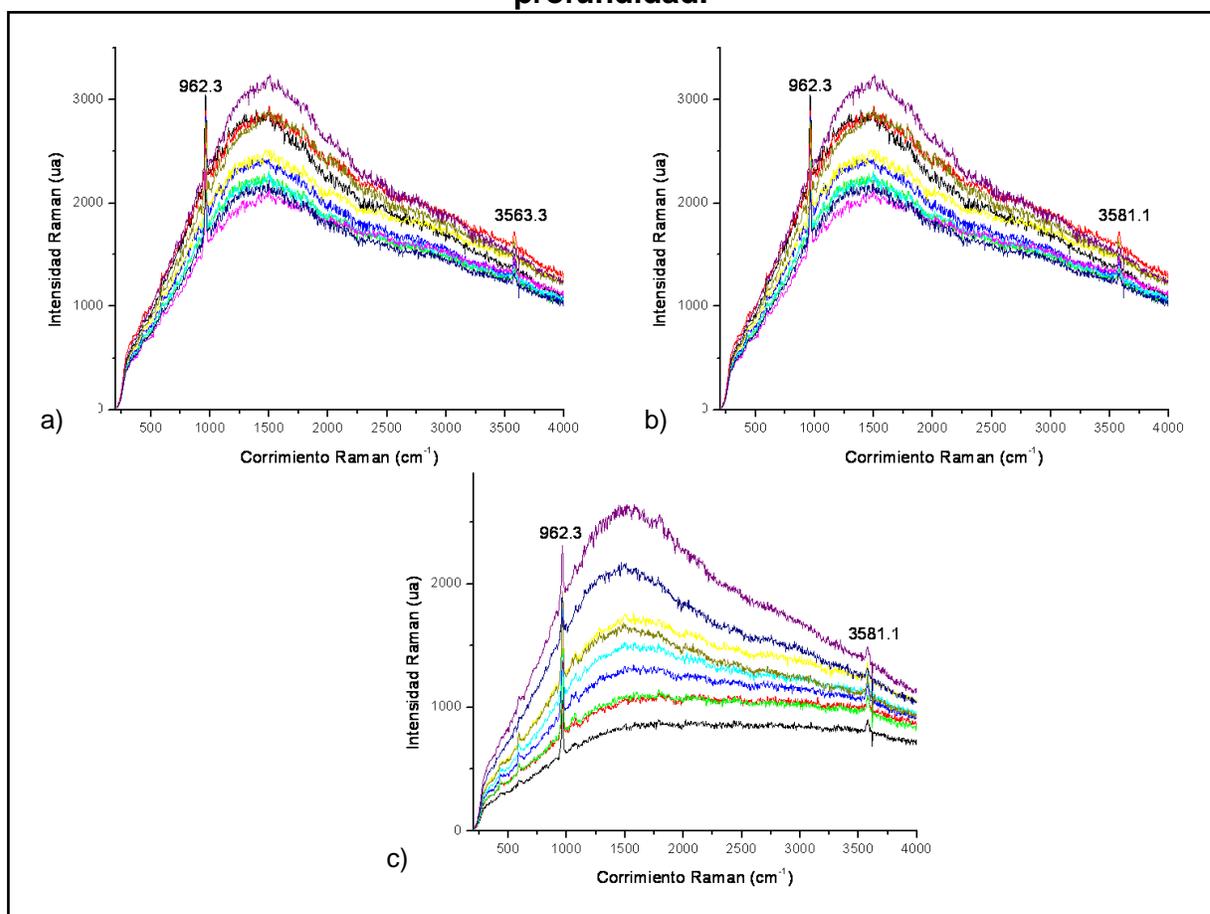
Figura 60.- Espectros μ -Raman del Grupo Control después de 5 días de haber estado inmerso en pH cíclico sin tratamiento a 50, 100 y 150 μm de profundidad.



Fuente directa

En la Figura 61 se muestran los espectros correspondientes al GC a 10 días de haber estado inmerso en pH cíclico sin tratamiento donde a 50 μm de profundidad (a) los espectros presentaron una intensidad de 3000 ua para el grupo PO_4^{3-} y para el grupo OH^- de 1500 ua; a 100 μm (b) la intensidad del grupo PO_4^{3-} fue de 3000 ua y el grupo OH^- tuvo una intensidad de 2000 ua; y en 150 μm de profundidad (c) se presentaron bandas características del grupo PO_4^{3-} a 2300 ua y para el grupo OH^- 1500 ua respectivamente. Siendo igual al grupo FFA a 15 días donde presentaron en todas las profundidades bandas características para ambos grupos funcionales, además de la alta fluorescencia inherente de la muestra.

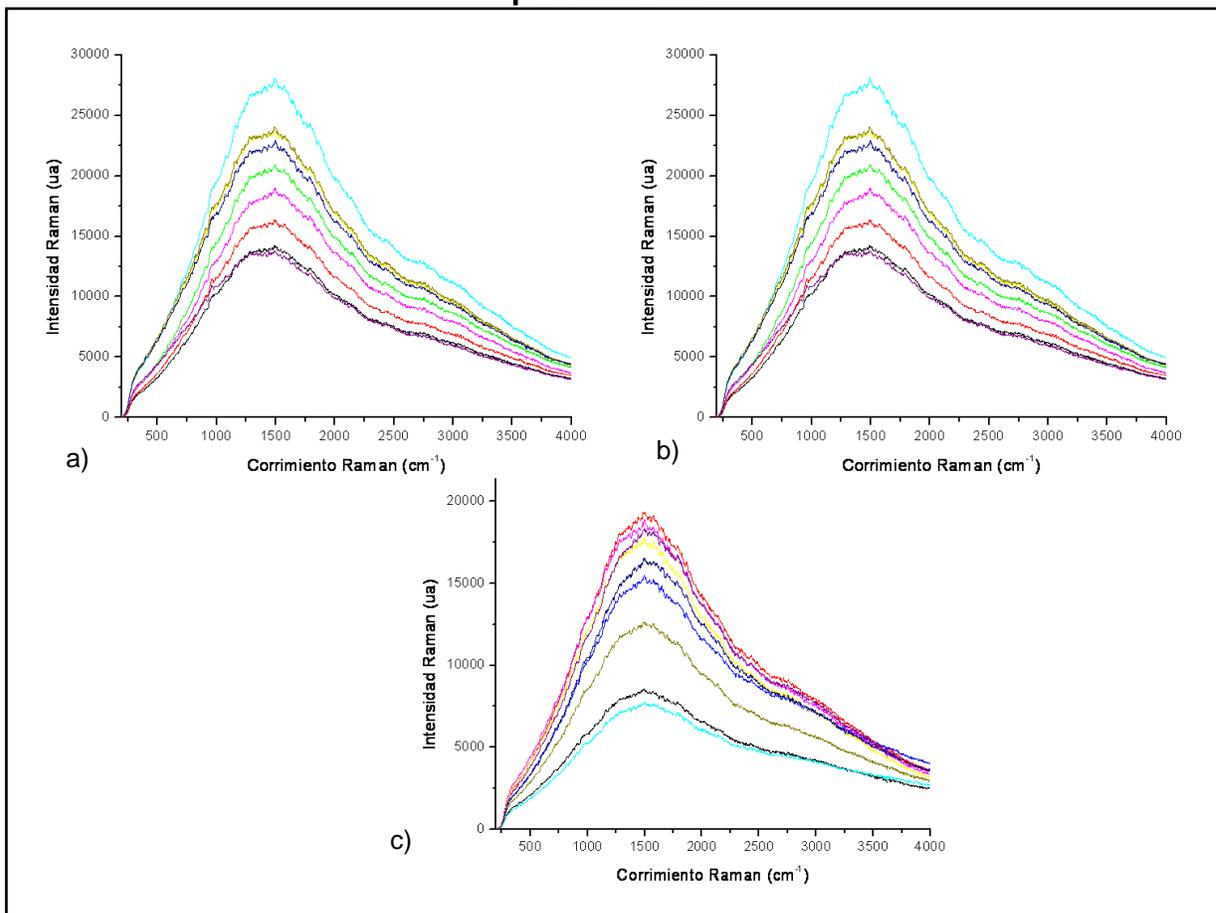
Figura 61.- Espectros μ -Raman del Grupo Control después de 10 días de haber estado inmerso en pH cíclico sin tratamiento a 50, 100 y 150 μm de profundidad.



Fuente directa

En la figura 62 se observa el GC que estuvo inmerso en el pH cíclico donde a 50, 100 y 150 μm de profundidad (a, b y c) los espectros no presentaron bandas características para el grupo PO_4^{3-} y tampoco para el grupo OH^- debido a la gran fluorescencia que presentó este grupo. Lo anterior se atribuye al tipo de muestra; donde a 50 μm llegó hasta 30000 ua; en 100 μm disminuyó a 27500 ua y en 150 μm llegó hasta 20000 ua respectivamente.

Figura 62.- Espectros μ -Raman del Grupo Control después de 15 días de haber estado inmerso en pH cíclico sin tratamiento a 50, 100 y 150 μm de profundidad.



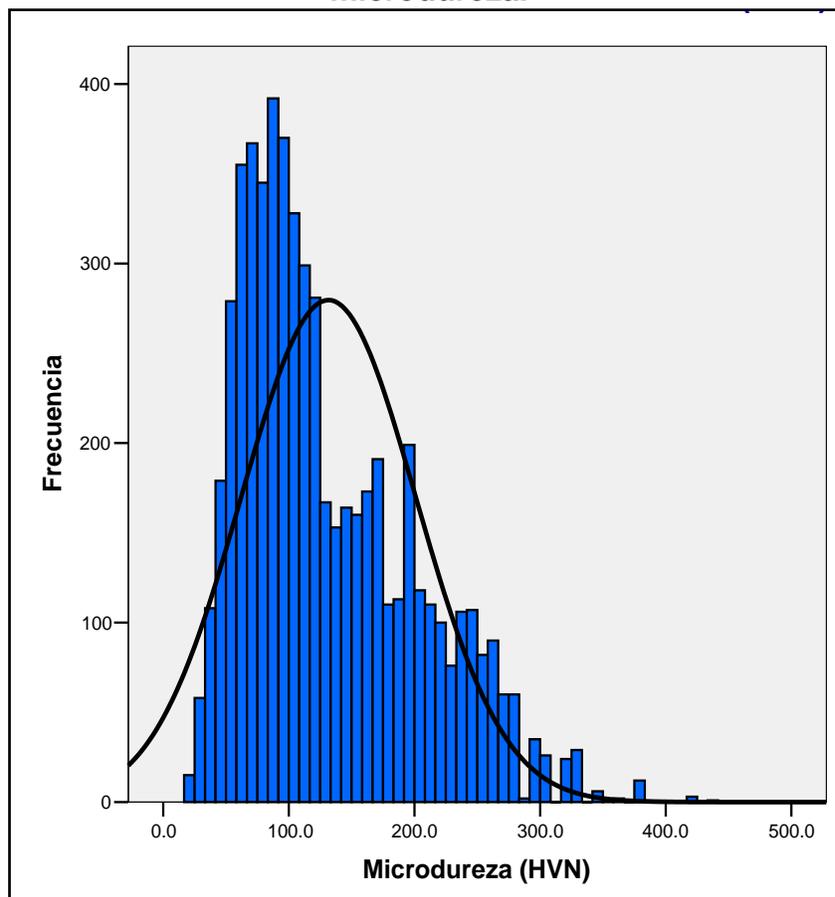
Fuente directa

ANÁLISIS DE RESULTADOS

1.- Microdureza

Para determinar la prueba estadística para el análisis de los datos obtenidos se realizó un histograma con las variables independientes (grupos experimentales) y la variable dependiente microdureza en las diferentes localizaciones (oclusal, medio y cervical), en las diferentes profundidades (50, 100 y 150 μm). En la gráfica número 2 se observa que la distribución de la muestra no es normal y tiende a estar a la izquierda por lo que la estadística paramétrica no fue una opción para establecer las asociaciones, de tal manera que se decidió utilizar estadística no paramétrica.

Gráfica 2.- Histograma de distribución no normal de los resultados de microdureza.

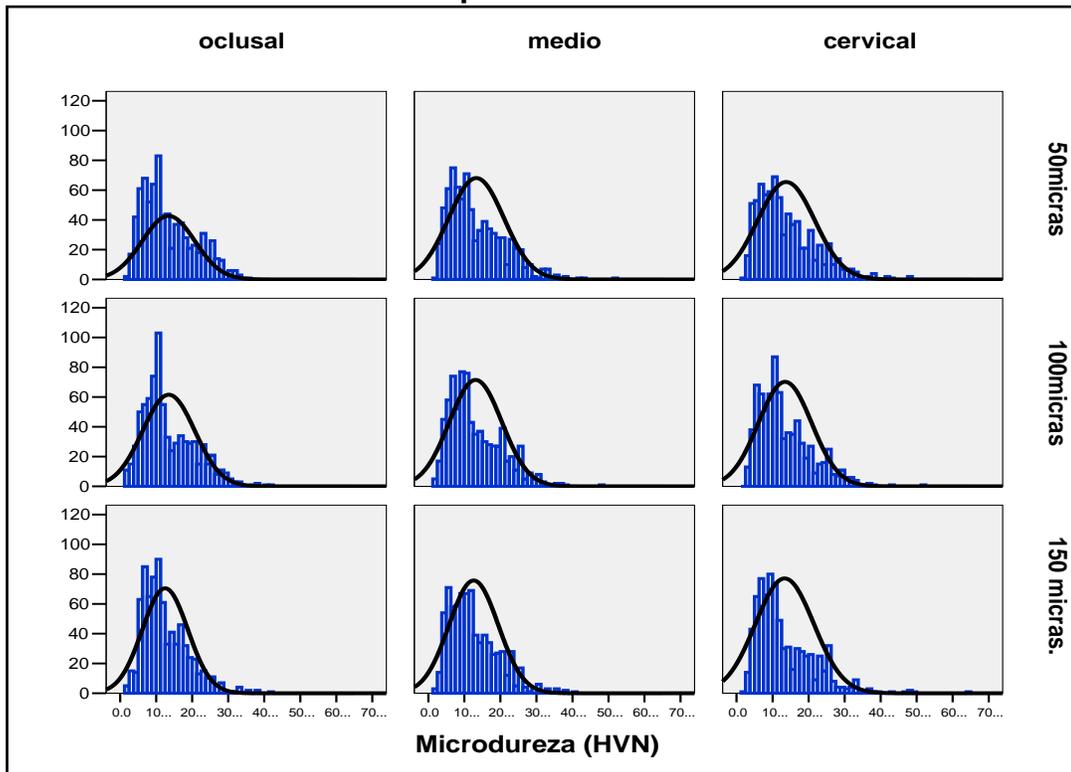


Media=131.53, D.E.=69.61, N=5,850

Fuente directa

Se realizó otro histograma comparando la variable dependiente Microdureza, con las diferentes profundidades y las diferentes localizaciones como se muestra en la gráfica 3 que nos indica que en esas variables también existe una distribución no normal si comparamos los sentidos oclusal, medio y cervical con las profundidades de 50 100 y 150 μm .

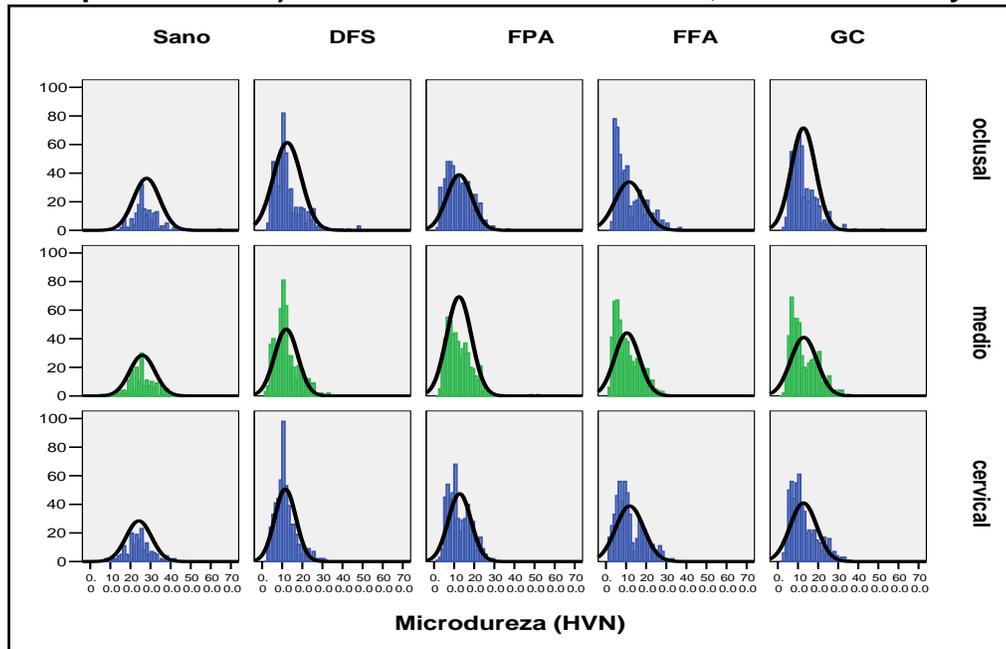
Gráfica 3.- Histograma de distribución de microdureza comparando sentidos con profundidades.



Fuente directa

También se realizó un histograma para comparar la variable dependiente Microdureza y los diferentes localizaciones (oclusal medio y cervical) con las variables independientes que son los grupos tratados con compuestos fluorados (DFS, FPA, FFA), el GC y el grupo Sano como se muestra en la gráfica 4, siendo el grupo Sano el único que presentó una distribución normal en sentido oclusal medio y cervical, ya que los grupos experimentales tuvieron una distribución no normal a excepción del DFS en sentido cervical.

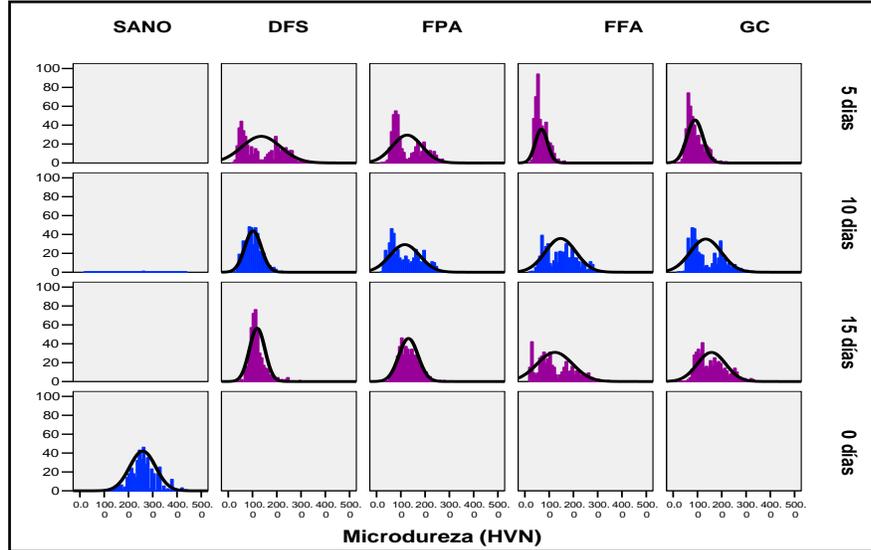
Gráfica 4.- Distribución de microdureza comparando la variable independiente (grupos experimentales) con los diferentes sentidos, oclusal medio y cervical).



Fuente directa.

Por último se realizó un histograma con la distribución de las variables independientes (grupos experimentales), a los 0, 5, 10 y 15 días de tratamiento (pH cíclico). Como se muestra en la gráfica 5 donde la distribución no es normal excepto el grupo Sano.

Gráfica 5.- Distribución de la variable independiente con el modelo de pH cíclico.



Fuente directa.

Una vez que se trataron los datos con pruebas no paramétricas se hizo un análisis descriptivo de todas las observaciones, las variables independientes y su relación con la variable dependiente Microdureza como se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3.- Distribución de la mediana y media de las variables independientes y la dependiente con todas sus observaciones.

		HVN ¹	HVN ²
Grupos experimentales	Sano	254.0	258.81
	DFS	110.0	119.11
	FPA	116.0	124.67
	FFA	93.2	112.89
	GC	107.0	127.14
Días de tratamiento	0	254.0	258.80
	5	122.0	132.97
	10	110.0	124.97
	15	81.8	104.99
Sentido	Oclusal	112.0	130.93
	Medio	112.0	129.29
	Cervical	116.0	134.44
Profundidades	50 mm	110.0	127.16
	100 mm	112.0	132.98
	150mm	116.0	134.52

¹Mediana, ²Media. Fuente directa.

En base a los histogramas anteriores se determinó el uso de las siguientes pruebas no paramétricas: Kruskal Wallis, Wilcoxon y Chi-Cuadrada. En el Cuadro 4 se observa la distribución del número de indentaciones realizadas para cada grupo experimental.

Cuadro 4.- Distribución general del número de indentaciones por grupo experimental.

Grupos	N
Sano	450
DFS	1350
FPA	1350
FFA	1350
GC	1350
Total	5850

N= Número total de indentaciones.

Fuente directa.

La prueba de Kruskal-Wallis es la prueba no paramétrica equivalente a la ANDVA de una vía por lo que es un análisis de varianza unifactorial por rangos, basándose en la mediana como se muestra en el cuadro 5.

Cuadro 5.- Frecuencias de las medianas del grupo sano y grupos experimentales con respecto al número de microdureza (HVN).

HVN	SANO	DFS	FPA	FFA	GC
Rango media	5343.33	2735.19	2869.03	2407.12	2884.71
> Mediana	450	595	679	514	639
<= Mediana	0	755	671	836	711
Sig.	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*

* Diferencias estadísticamente significativas $p \leq 0.05$

Fuente directa.

Para determinar si existen diferencias de los valores de microdureza del esmalte dental subsuperficial en las diferentes profundidades 50, 100 y 150 μm se utilizó la prueba estadística Chi-cuadrada, donde se encontró, que la variable dependiente microdureza comparada con la profundidad en sus diferentes observaciones no tuvieron diferencias estadísticamente significativas como se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6.- Prueba Chi- Cuadrada para establecer diferencias entre las diferentes profundidades de todos los grupos.

Grupos Experimentales	50, 100 y 150 μm^*
Sano	1.000
DFS	0.998
FPA	1.000
FFA	1.000
GC	1.000

$p \geq 0.05$ no hay diferencias estadísticamente significativas. Fuente directa.

Para determinar diferencias en la microdureza del esmalte dental subsuperficial en sentido oclusal, medio y cervical, se utilizó la prueba estadística Chi-cuadrada como se muestra en el cuadro 7, donde se encontró, que las observaciones de sentido (oclusal, medio y cervical) no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Cuadro 7.- Prueba Chi-Cuadrada para establecer diferencias entre los diferentes sentidos de todos los grupos.

Grupos Experimentales	oclusal medio cervical*
Sano	0.993
DFS	0.991
FPA	0.998
FFA	0.998
GC	0.998

* $p \leq 0.05$ diferencias estadísticamente significativas.
Fuente directa

Con la finalidad de determinar si existen diferencias en la microdureza del esmalte dental subsuperficial a los 0, 5, 10 y 15 días de tratamiento (pH cíclico) se utilizó la prueba estadística Chi-cuadrada donde se encontró, que las observaciones de los diferentes días de tratamiento si presentaron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 8).

Cuadro 8.- Prueba Chi-Cuadrada para establecer diferencias entre los diferentes días de tratamiento (pH cíclico) de todos los grupos.

0, 5, 10, 15días	
Chi- cuadrada	936.463
Sig*	0.000

* $p \geq 0.05$ no hay diferencias estadísticamente significativas.
Fuente directa

La comparación de dos grupos dependientes que no siguen una tendencia en la distribución normal requiere del uso de la prueba no paramétrica de Rangos Asignados de Wilcoxon, el cual permite estimar las asociaciones estadísticas entre este tipo de poblaciones. En el cuadro 9 se encuentran los resultados de la aplicación de la prueba no paramétrica en los grupos estudiados.

Cuadro 9.- Análisis de Rangos Asignados de Wilcoxon de las observaciones individuales de los cinco grupos en relación con los valores de microdureza (HVN).

Grupos experimentales			N	Media de Rangos	Suma de Rangos
Sano	HVN,	Rango Negativo	0 ^a	0.00	0.00
	Sano,	Rango Positivo	450 ^b	225.50	101475.0
	DFS, FFA,	lazos	0 ^c		0
	FPA, GC.		450		
DFS	HVN,	Rango Negativo	0 ^a	0.00	0.00
	Sano,	Rango Positivo	1350 ^b	675.50	911925.0
	DFS, FFA,	lazos	0 ^c		0
	FPA, GC.		1350		
FPA	HVN,	Rango Negativo	0 ^a	0.00	0.00
	Sano,	Rango Positivo	1350 ^b	675.50	911925.0
	DFS, FFA,	lazos	0 ^c		0
	FPA, GC.		1350		
FFA	HVN,	Rango Negativo	0 ^a	0.00	0.00
	Sano,	Rango Positivo	1350 ^b	675.50	911925.0
	DFS, FFA,	lazos	0 ^c		0
	FPA, GC.		1350		
GC	HVN,	Rango Negativo	0 ^a	0.00	0.00
	Sano,	Rango Positivo	1350 ^b	675.50	911925.0
	DFS, FFA,	lazos	0 ^c		0
	FPA, GC.		1350		

^aHVN <Sano, DFS, FPA, FFA, GC

^bHVN >Sano, DFS, FPA, FFA, GC

^cHVN =Sano, DFS, FPA, FFA, GC

N: total de pares comparados.

La suma de rangos positivos es diferente a rangos negativos; la inferencia es la diferencia entre grupos. Fuente Directa

La prueba de Rangos Asignados de Wilcoxon se utilizó para determinar las la asociación estadística de los valores de microdureza de los grupos experimentales (DFS, FFA y FPA) y el GC; en el cuadro 10 se encuentran los resultados de la diferencia de rangos. Es importante mencionar que la asociación estadística de Wilcoxon está determinada por la comparación entre una variable independiente con una variable dependiente, de manera que la suma de los rangos positivos con los rangos negativos dan un resultado negativo en todos los grupos, determinando que si existen diferencias estadísticamente significativas.

Cuadro 10.- Asociación estadística (Wilcoxon) de los valores de microdureza con los grupos experimentales.

Grupos experimentales		HVN & Grupos experimentales
Sano	Z	-18.391
	Sig (2 colas)*	0.000
DFS	Z	-31.827
	Sig (2 colas)*	0.000
FPA	Z	-31.827
	Sig (2 colas)*	0.000
FFA	Z	31.826
	Sig (2 colas)*	0.000
GC	Z	-31.827
	Sig (2 colas)*	0.000

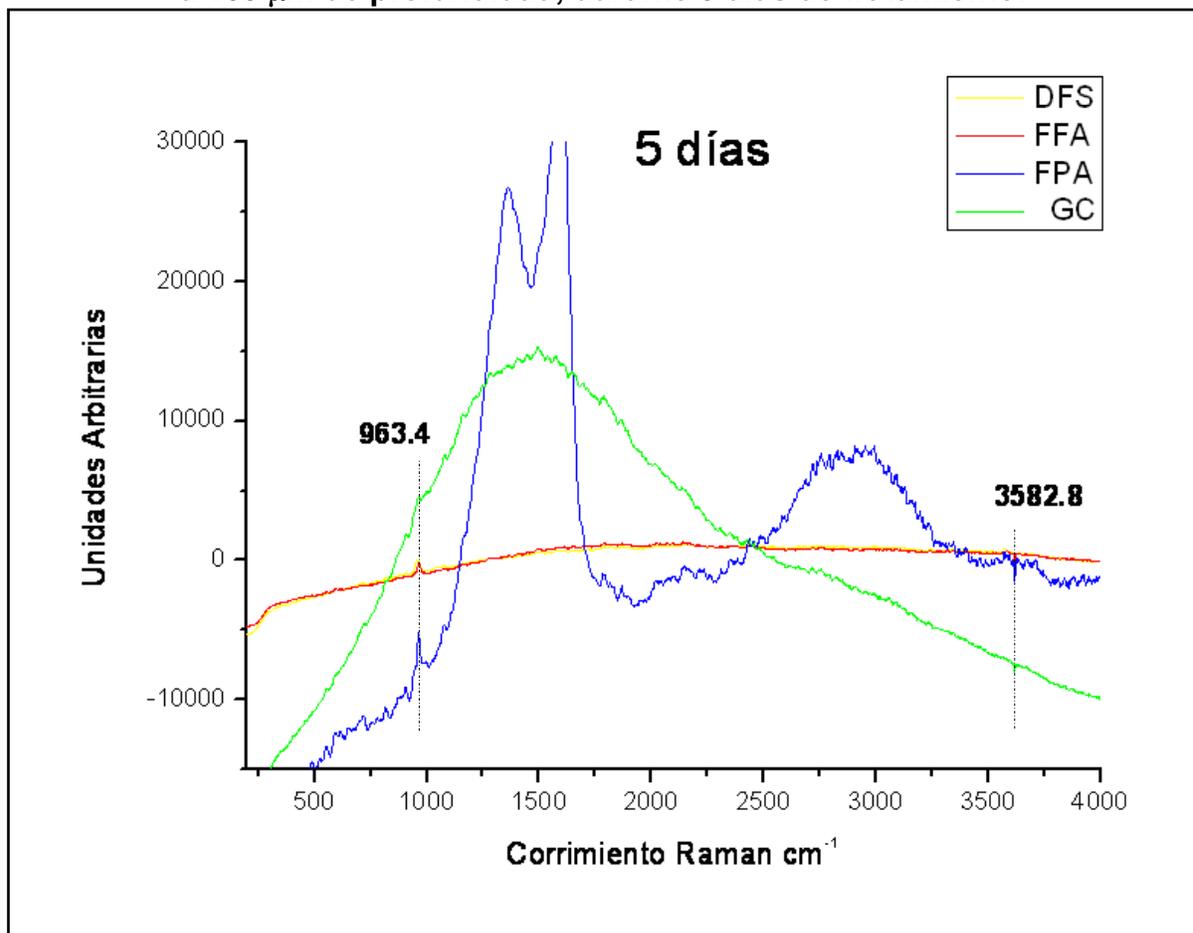
*p ≤ 0.05 si hay diferencias estadísticamente significativas.

Fuente directa

2.- Dispersión Raman

La composición química del esmalte dental fue estudiada mediante la caracterización espectroscópica en los diferentes días y grupos de tratamiento, de manera que la identificación de los grupos funcionales se llevo a cabo en los espectros representativos de cada uno de los grupos. En la gráfica 6 el espectro del grupo DFS y FFA presentó el mismo comportamiento con una banda del grupo PO_4^{3-} a 963.4 cm^{-1} y el grupo OH^- a 3582.8 cm^{-1} , el grupo FPA con sus bandas características de NH_4 y NO_3^- y el GC sin bandas por la gran fluorescencia.

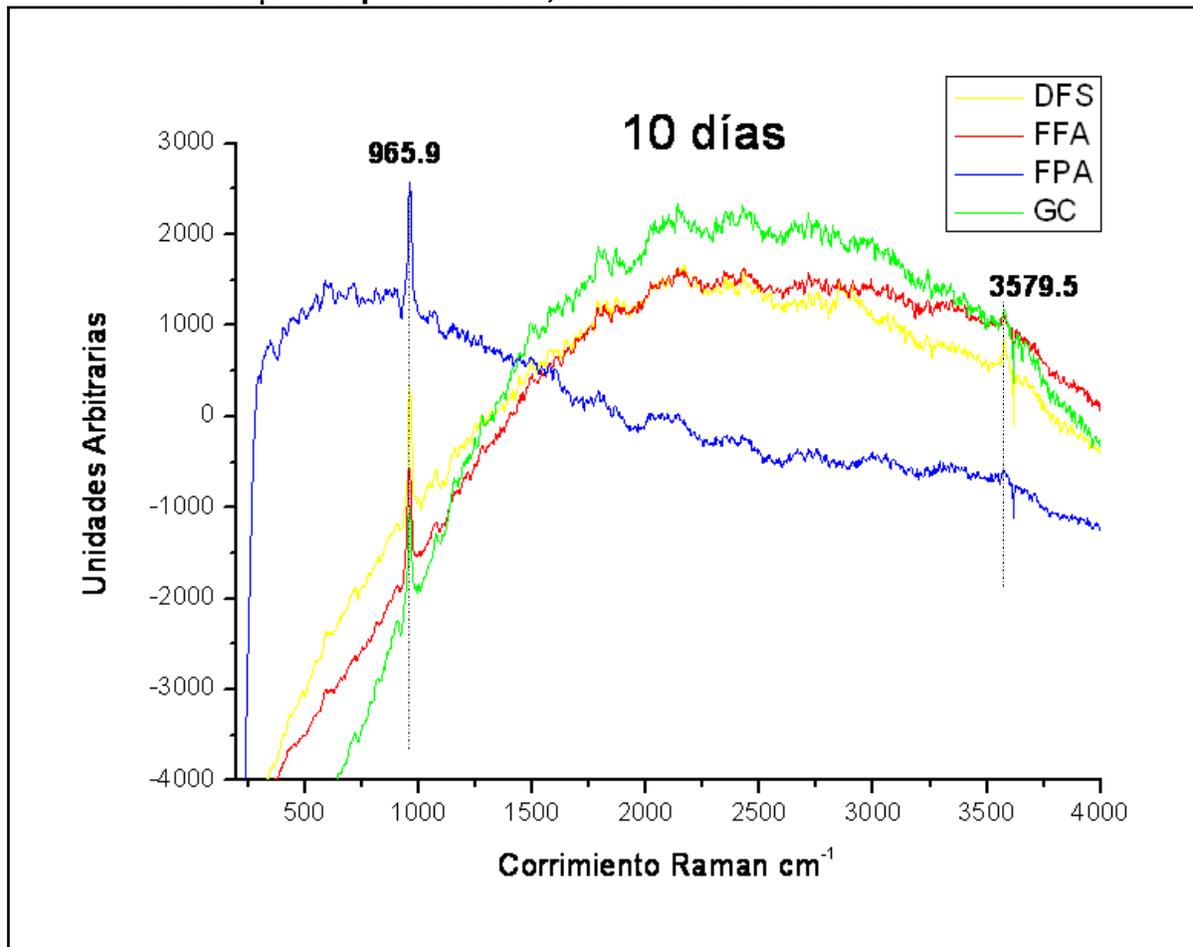
Gráfica 6.- Espectros μ -Raman representativos de los 4 grupos experimentales a $100 \mu\text{m}$ de profundidad, durante 5 días de tratamiento.



Fuente directa

En la gráfica 7 se presentan los espectros representativos de los grupos experimentales después de 10 días de tratamiento, en ellos se identifican las bandas del grupo PO_4^{3-} a 965.9 cm^{-1} y del grupo OH^- a 3579.5 cm^{-1} , apareciendo con mayor intensidad, lo que indica que existe una asociación entre los días de aplicación del tratamiento con una remineralización del esmalte en el periodo de 10 días en todos los grupos experimentales.

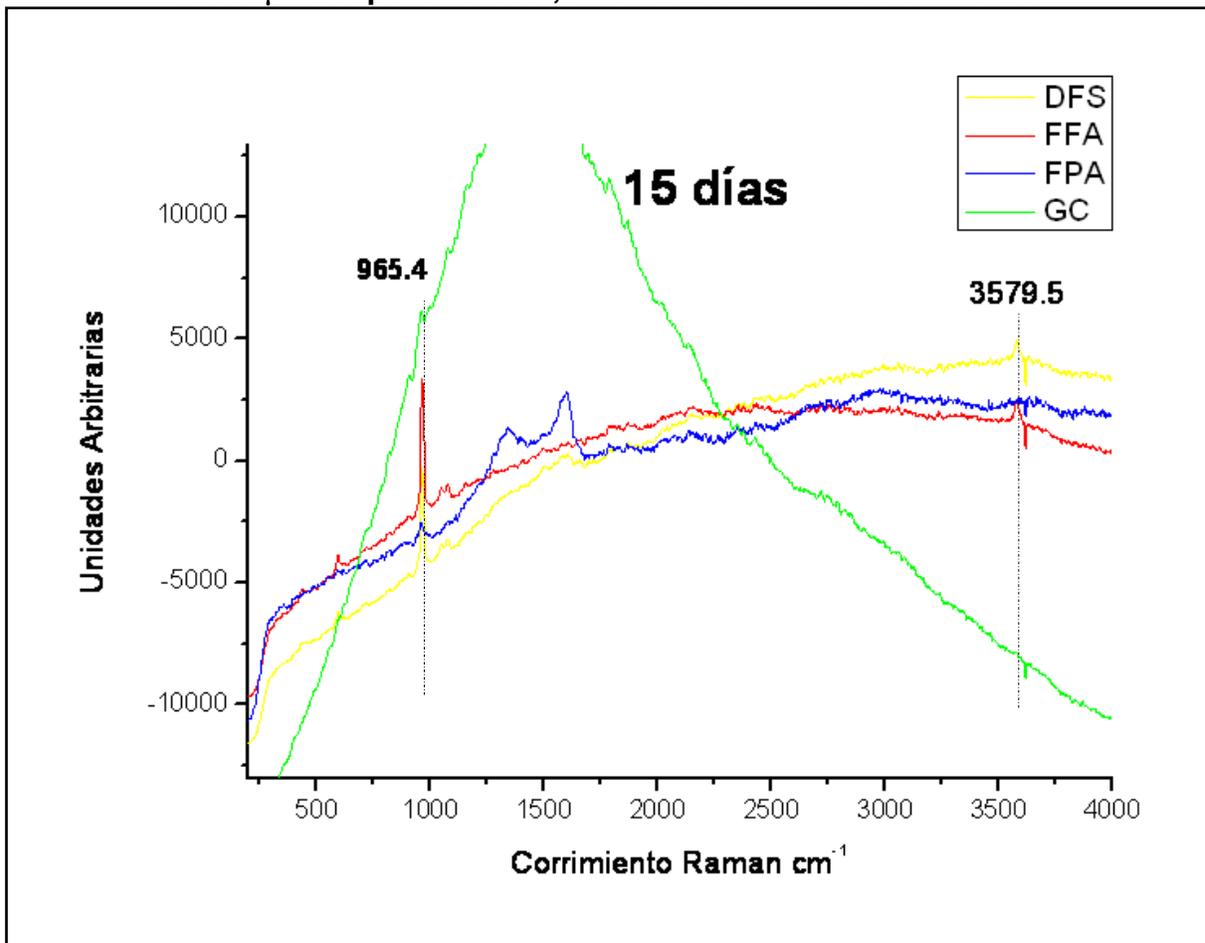
Gráfica 7.- Espectros μ -Raman representativos de los 4 grupos experimentales a $100 \mu\text{m}$ de profundidad, durante 10 días de tratamiento.



Fuente directa

En la gráfica 8 se presentan los espectros representativos de los grupos experimentales después de 15 días de tratamiento donde se identifican las bandas del grupo PO_4^{3-} a 965.4 cm^{-1} y del grupo OH^- a 3579.5 cm^{-1} , donde el GC presentó una gran fluorescencia y poca señal. En los grupos FFA y DFS si se identificaron las bandas, es decir, que existe una asociación entre los 15 días de tratamiento con un posible proceso de remineralización del esmalte dental.

Gráfica 8.- Espectros μ -Raman representativos de los 4 grupos experimentales a $100 \mu\text{m}$ de profundidad, durante 15 días de tratamiento.

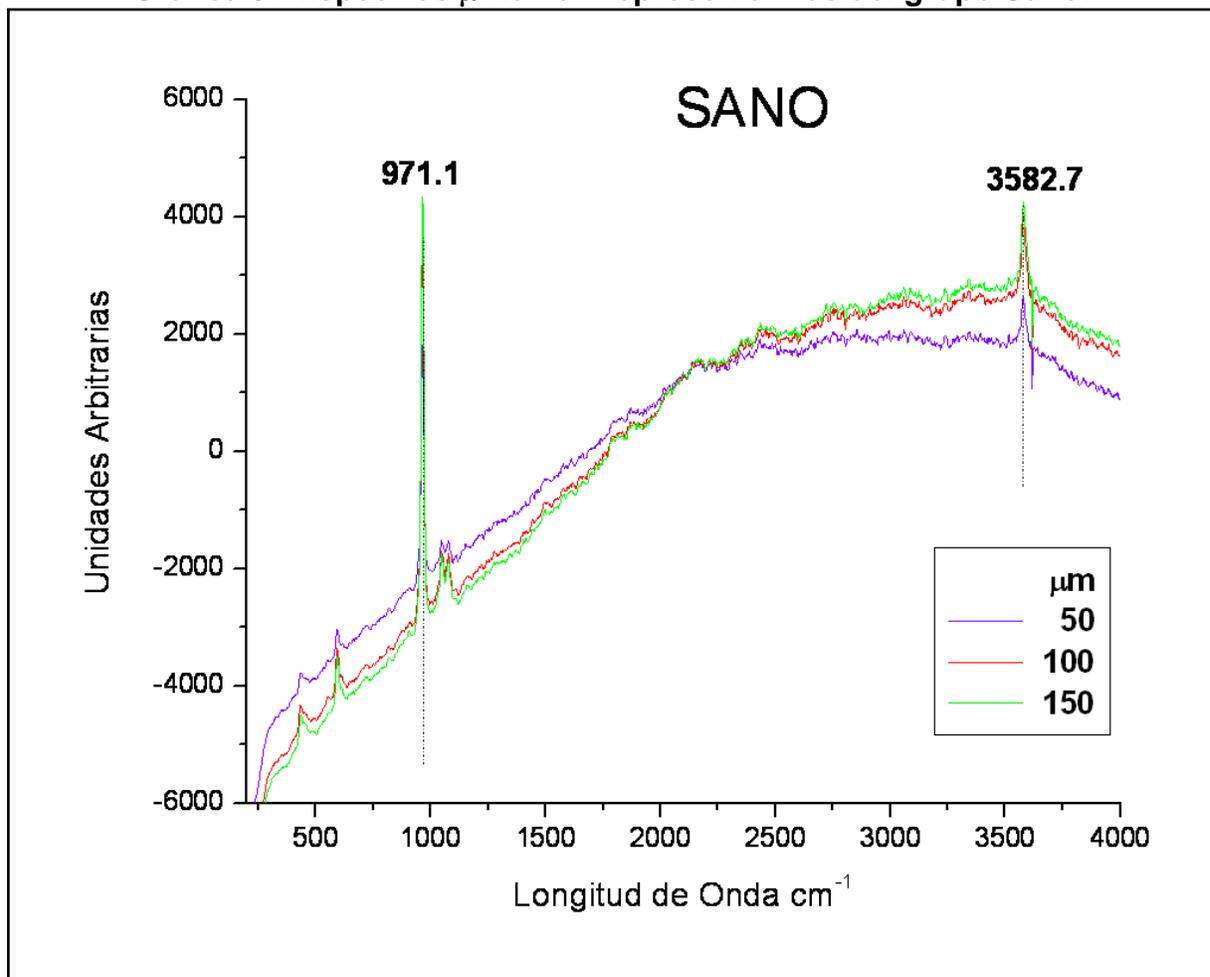


Fuente directa

En la gráfica 9 se observaron los espectros del grupo sano, que no estuvo expuesto a la lesión inicial y tampoco inmerso en el pH cíclico, por lo tanto este es el grupo de referencia para realizar la comparación con los grupos experimentales.

Las bandas del grupo PO_4^{3-} se encontraron en un corrimiento de 971.1 cm^{-1} y del grupo OH^- a 3582.7 cm^{-1} , que coincide con el intervalo de los grupos funcionales, en 50, 100 y 150 μm .

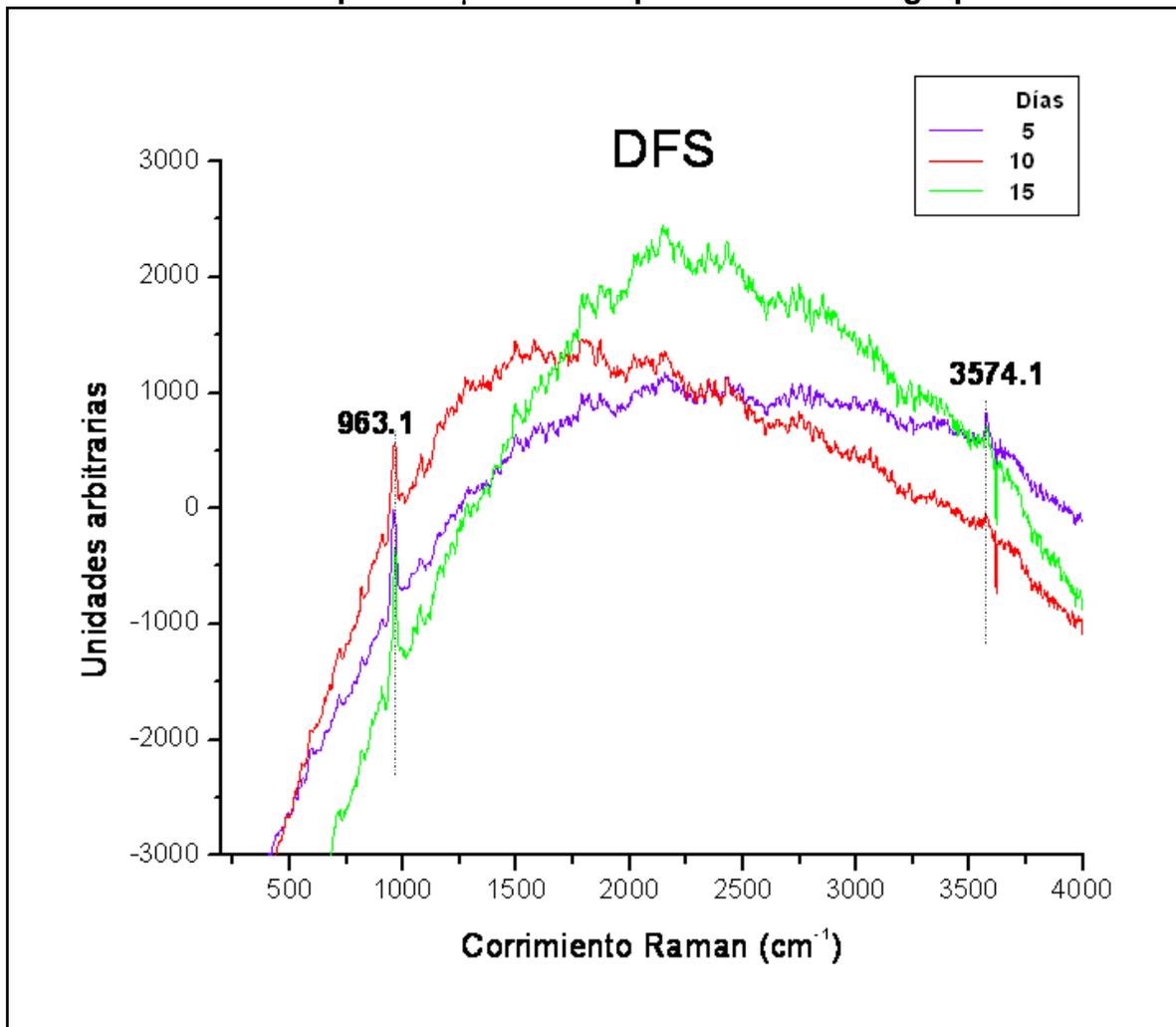
Gráfica 9.- Espectros μ -Raman representativos del grupo Sano.



Fuente directa

En la gráfica 10 se comparan los espectros del grupo tratado con DFS a 5, 10 y 15 días donde las bandas del grupo PO_4^{3-} se identificaron en 963.1 cm^{-1} y el grupo OH^- a 3574.1 cm^{-1} , el comportamiento del DFS a 5, 10 y 15 días se presenta similar en la identificación de las bandas características.

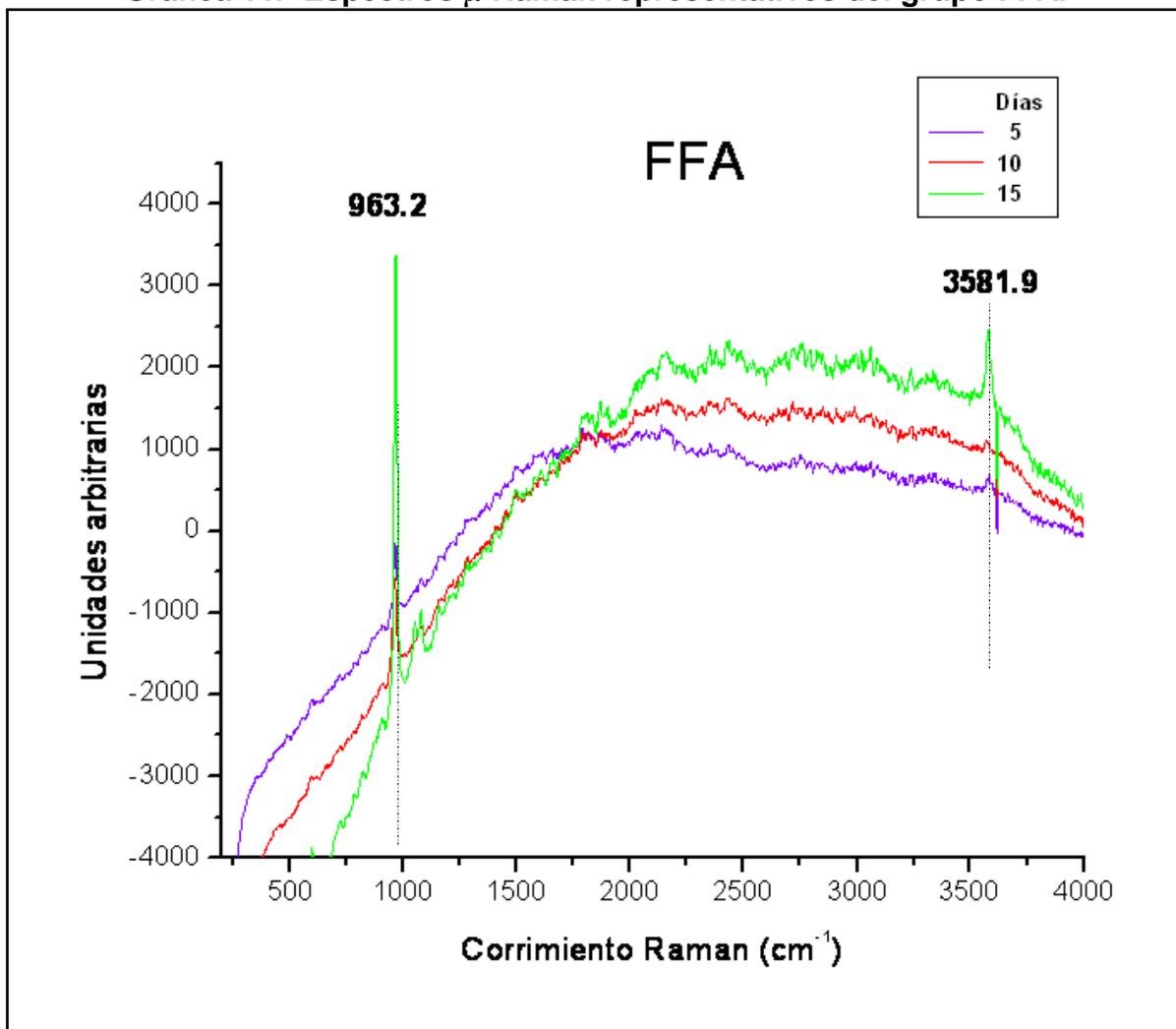
Gráfica 10.- Espectros μ -Raman representativos del grupo DFS.



Fuente directa

En la gráfica 11 se comparan los espectros del grupo tratado con FFA a 5, 10 y 15 días, donde las bandas del grupo PO_4^{3-} se identificaron en 963.2 cm^{-1} y el grupo OH^- a 3581.9 cm^{-1} , en el comportamiento del FFA se identificó que conforme se obtenían las muestras del pH cíclico se obtenía una recuperación en la remineralización del esmalte dental, teniendo a 15 días bandas características como las del grupo sano.

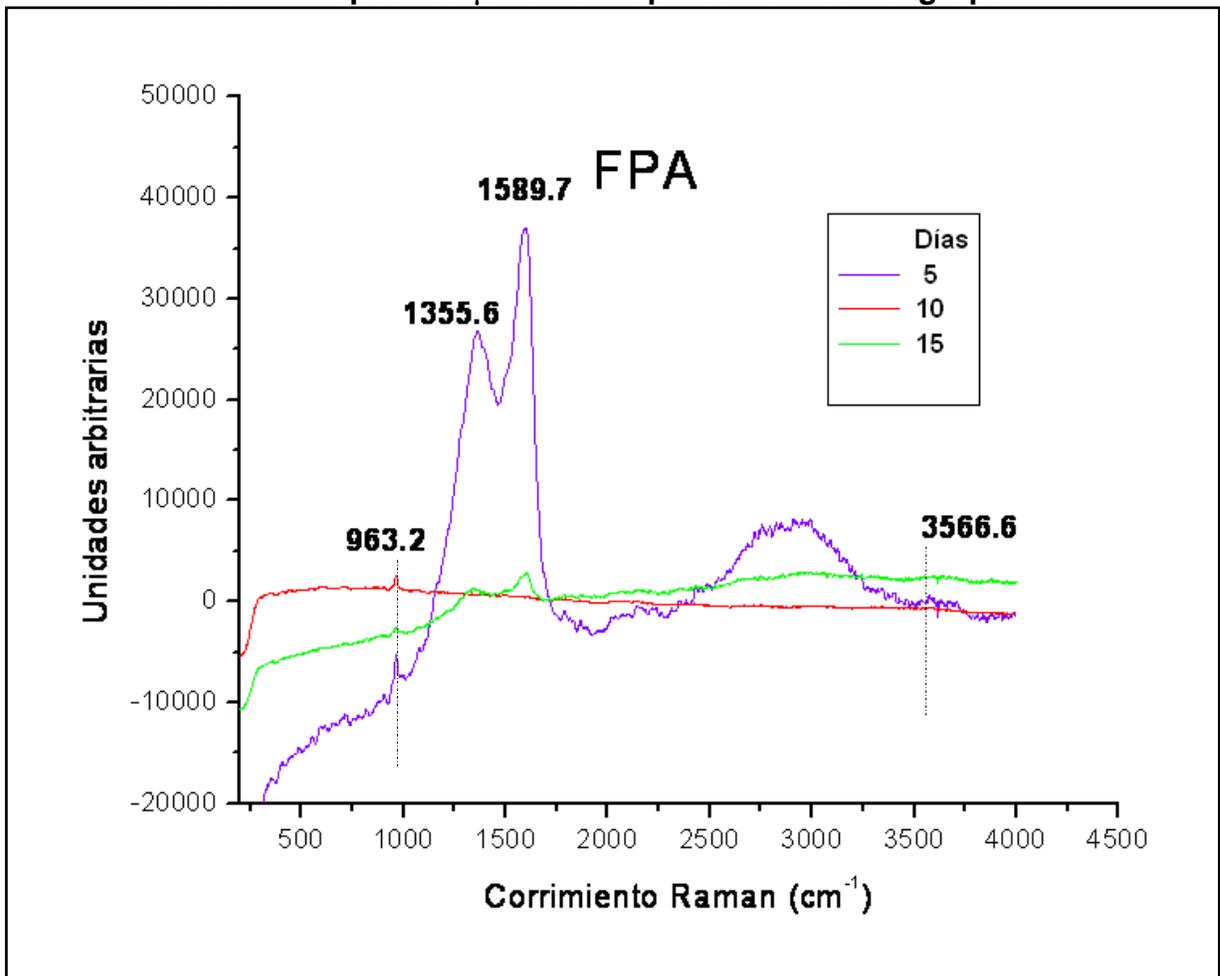
Gráfica 11.- Espectros μ -Raman representativos del grupo FFA.



Fuente directa

En la gráfica 12 se comparan los espectros del grupo tratado con FPA a 5, 10 y 15 días, donde las bandas del grupo PO_4^{3-} se identificaron en 963.2 cm^{-1} y el grupo OH^- a 3566.6 cm^{-1} , en el comportamiento del FFA a 5 días presentaron bandas correspondientes al grupo NO_3^- a 1355.6 cm^{-1} y al grupo NH_4 en 1589.7 cm^{-1} , a 10 y 15 días no se observan las bandas correspondientes al grupo PO_4^{3-} y tampoco al grupo OH^- concluyendo que a mayor días de aplicación del FPA menor remineralización.

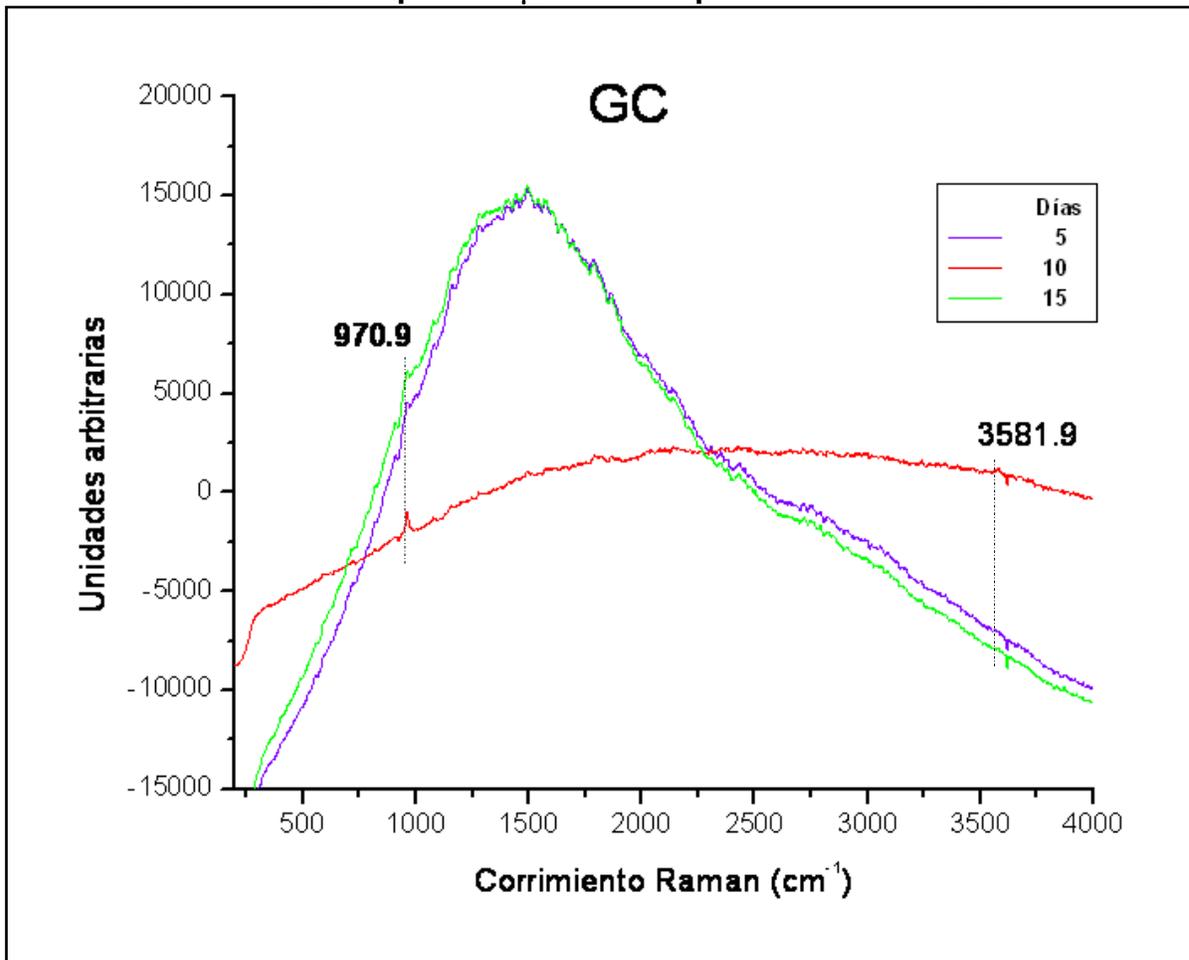
Gráfica 12.- Espectros μ -Raman representativos del grupo FPA.



Fuente directa

En la gráfica 13 se compararon los espectros del GC a 5, 10 y 15 días, donde las bandas del grupo PO_4^{3-} (970.9 cm^{-1}) y del grupo OH^- (3566.6 cm^{-1}) no se identificaron debido a la gran fluorescencia inherente a la muestra biológica.

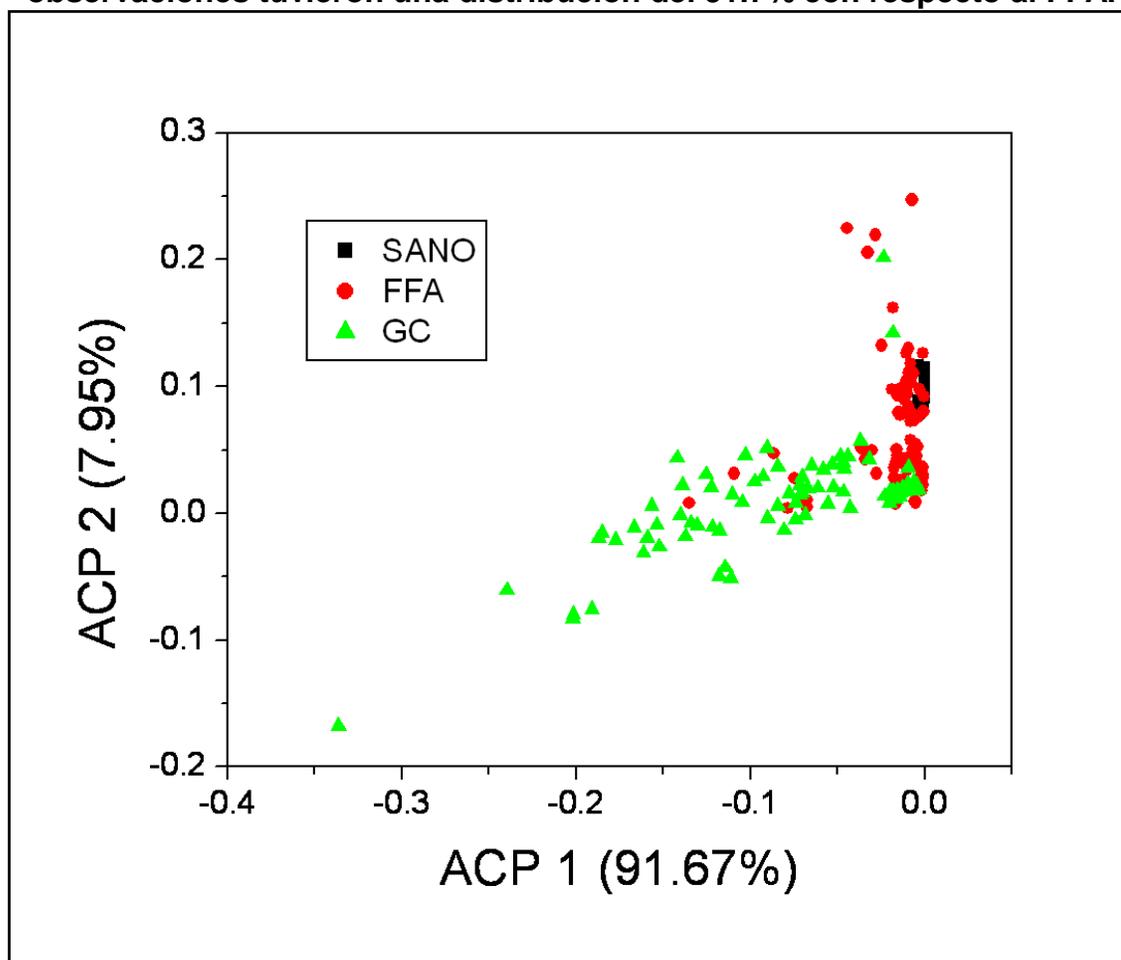
Gráfica 13.- Espectros μ -Raman representativos del GC.



Fuente directa

Los espectros representativos de cada grupo se obtuvieron a partir del Análisis de Componentes Principales (ACP) sobre 490 espectros Raman siendo la media=0 y la varianza=1 en toda la estadística. El grupo que fue tratado con FFA tuvo una variabilidad de ACP₁ de 91.67% vs ACP₂ de 7.95% (Gráfica 14), éste presentó una dispersión similar a la del grupo sano que como ya se mencionó es el grupo que presenta las bandas características de los grupos OH⁻ y PO₄³⁻ y es el que se comparará en todas las gráficas subsecuentes con los diferentes grupos que fueron tratados con compuestos fluorados de diferentes vehículos. En esta gráfica el grupo control presentó una dispersión heterogénea, el comportamiento del grupo control se puede atribuir a que no se le aplicó ningún compuesto fluorado, pero estuvo en condiciones de pH cíclico.

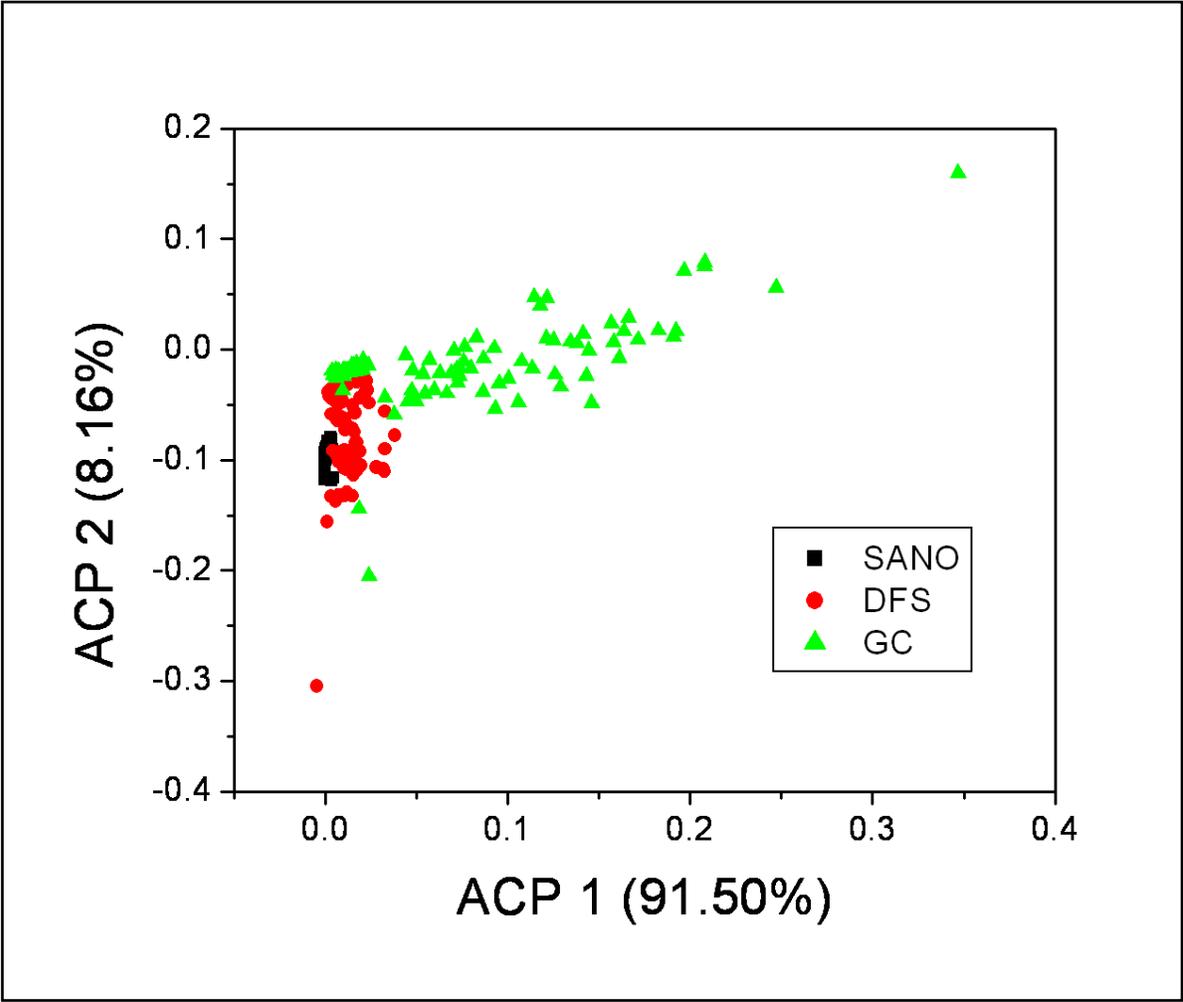
Gráfica 14- Dispersión del grupo tratado con FFA donde la variación de las observaciones tuvieron una distribución del 91.7% con respecto al FFA.



Fuente directa

El grupo tratado con DFS tuvo una variabilidad de ACP_1 de 91.50% vs ACP_2 de 8.16% (Gráfica 15). En todas sus observaciones presentó un comportamiento muy semejante de acuerdo a la distribución de la dispersión del grupo sano; respecto al grupo control otra vez se observó un comportamiento distinto recordando que este grupo no se le aplicó compuesto fluorado y estuvo inmerso en el pH cíclico; en el esmalte dental se encontró una desmineralización atribuida a la falta del intercambio iónico que se da cuando se aplica en la superficie del esmalte dental un compuesto fluorado.

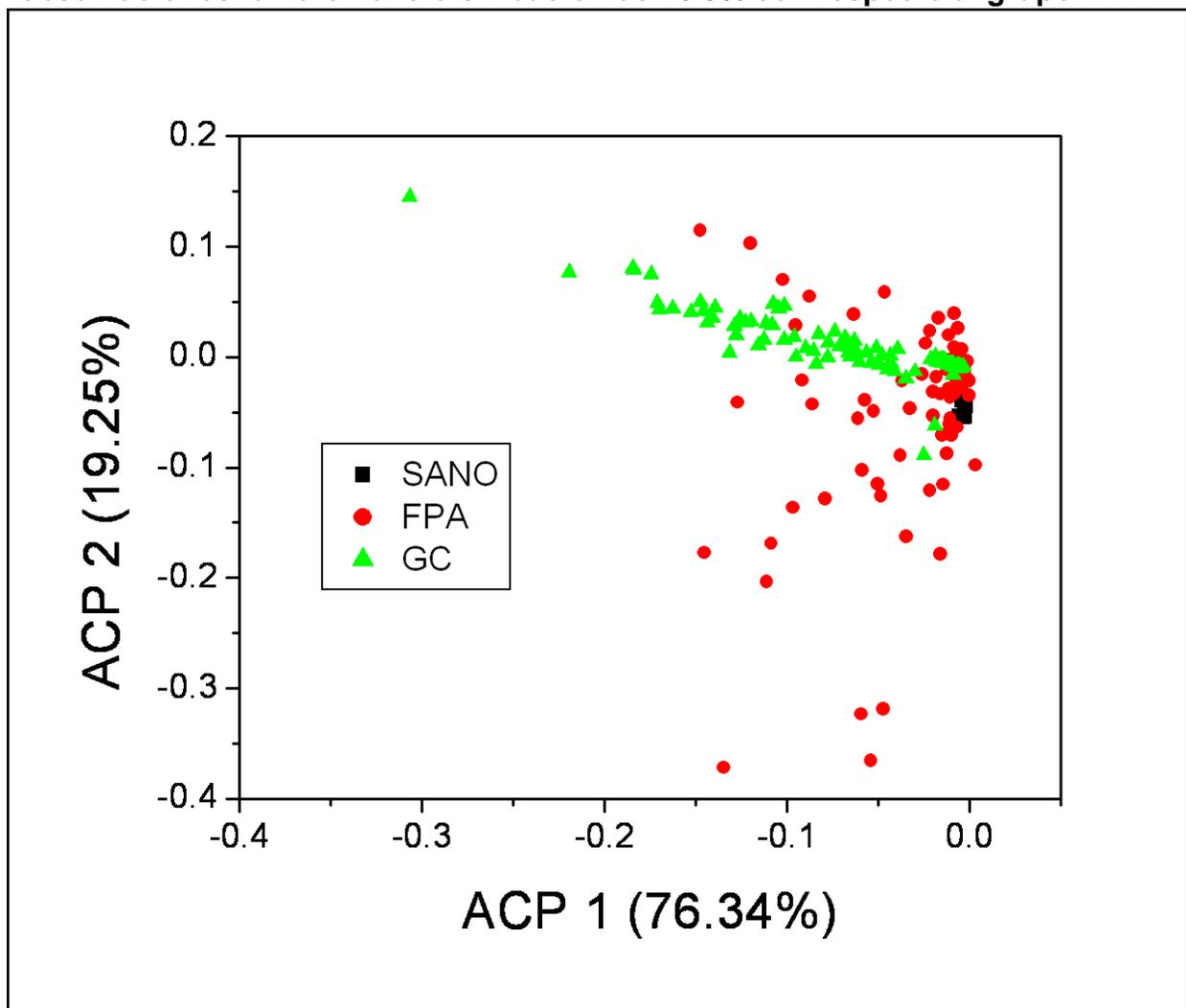
Gráfica 15.- Dispersión de las observaciones del grupo tratado con DFS donde la distribución de las observaciones fueron del 91.7% con respecto al grupo DFS.



Fuente directa

El grupo tratado con FPA presentó en su análisis estadístico una variabilidad o varianza de ACP_1 de 76.34% vs ACP_2 de 19.25%. El comportamiento de las observaciones del grupo tratado con Fluoruro de Plata Amoniacal está en relación intrínseca con los componentes químicos del compuesto, recordando que en la obtención de los resultados presentan bandas características de Nitrato y Amonio y no aparecen las bandas características de la hidroxiapatita; es por esto que la distribución de las observaciones del grupo control y del grupo FPA fueron muy dispersas comparándolos con el grupo sano (Gráfica 16).

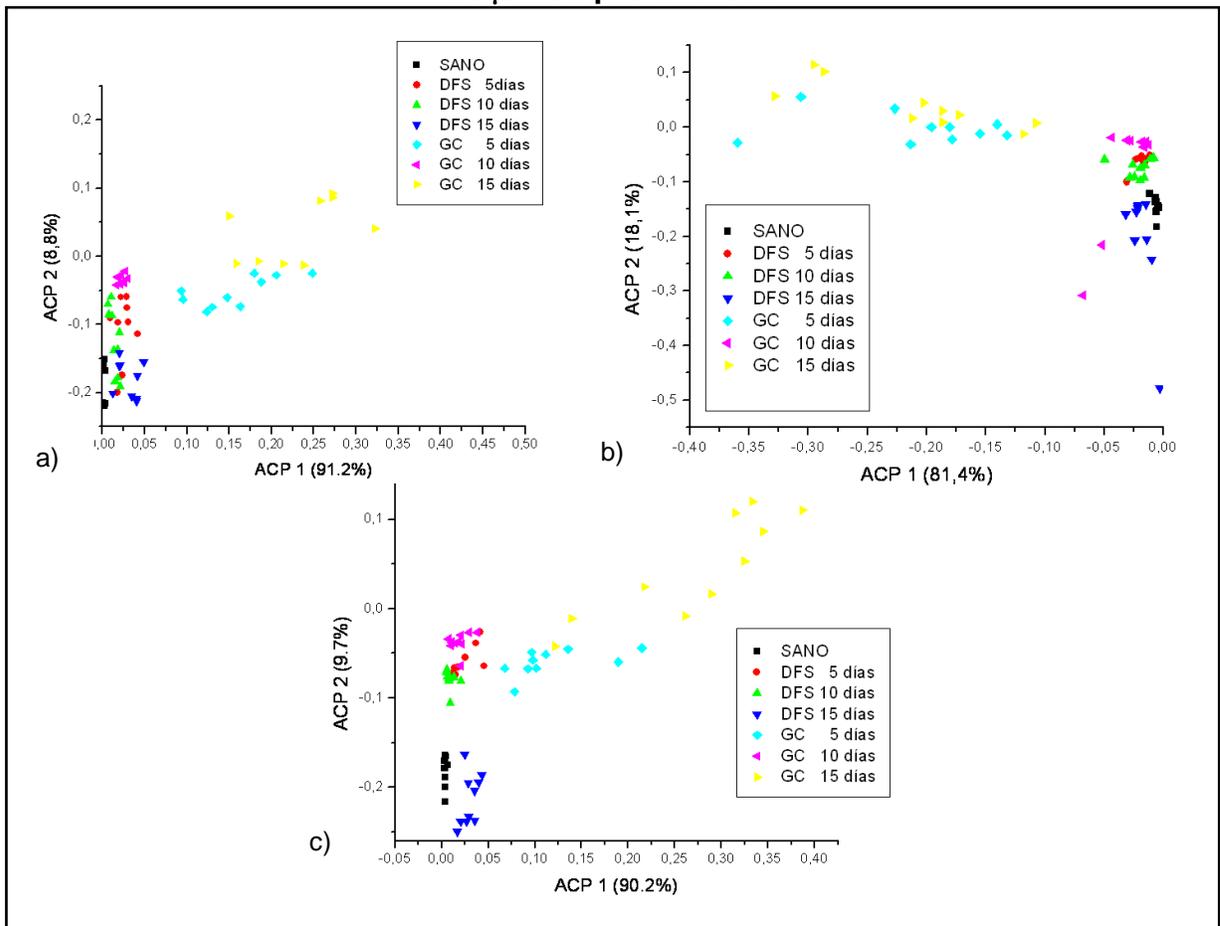
Gráfica 16.- Dispersión del grupo tratado con FPA donde la variación de las observaciones tuvieron una distribución de 76.3% con respecto al grupo FPA.



Fuente directa

En la figura 63 se presentan las observaciones del grupo tratado con DFS a 5, 10 y 15 días y a 50, 100 y 150 μm de profundidad, se comparó con el grupo Sano y el grupo control; como se muestra en los siguientes apartados a) a 50 μm la variabilidad fue de ACP_1 91.2% y ACP_2 8.8% siendo el DFS a 5, 10, 15 y el GC a 10 días el que tuvo una dispersión muy similar a la del grupo Sano; b) la variabilidad a 100 μm fue de ACP_1 81.4% y ACP_2 18.1% teniendo una dispersión el DFS en todas sus observaciones similar a la del grupo Sano; c) la variabilidad fue de ACP_1 90.2% y ACP_2 9.7% siendo el DFS a 15 días el más parecido al grupo Sano, entre 5 y 10 días del DFS se comportaron igual y el grupo control con su dispersión característica.

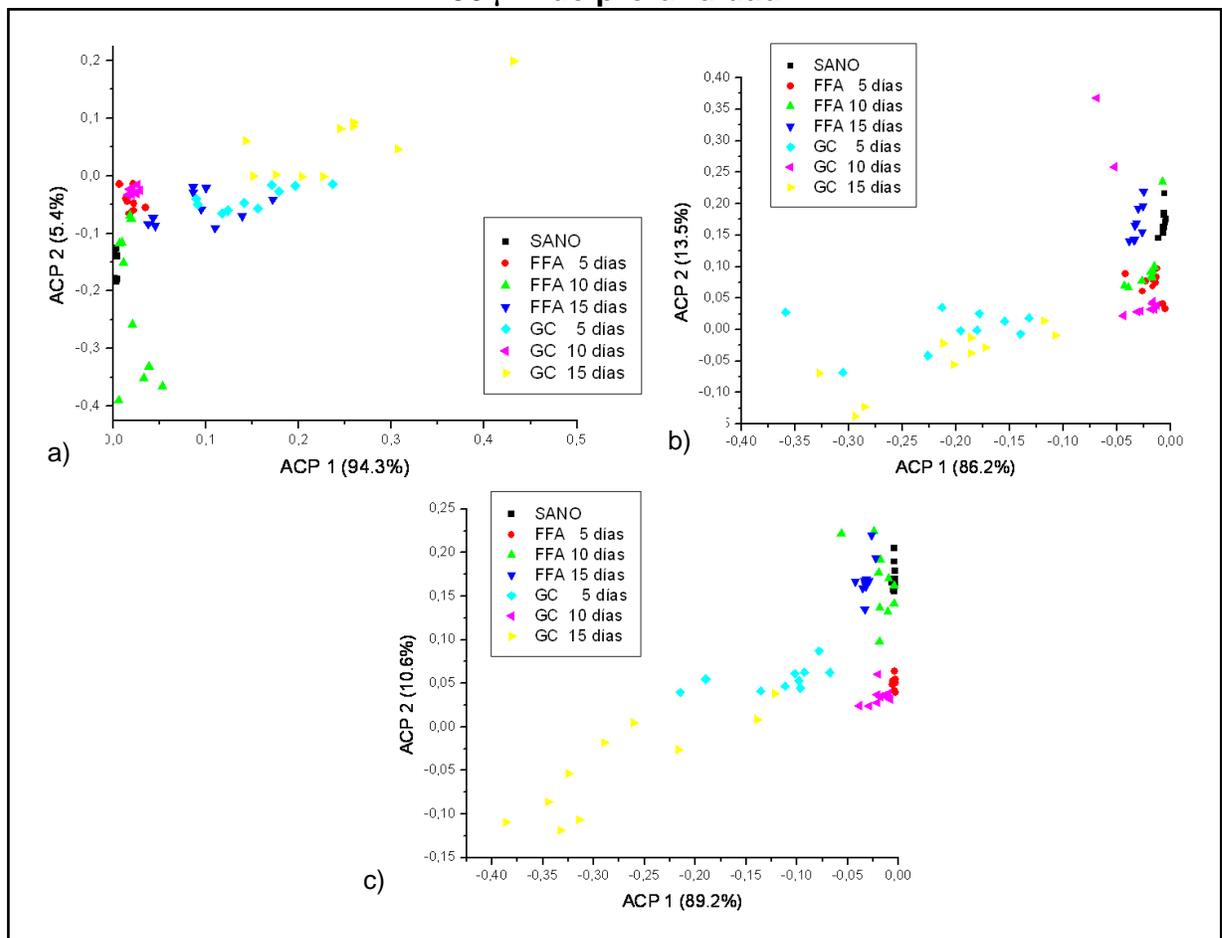
Figura 63.-Distribución de las observaciones del grupo tratado con DFS. a) Se comparan los grupos DFS, Sano y GC a 50 μm en pH cíclico; b) a 100 μm ; c) a 150 μm de profundidad.



Fuente directa

En la figura 64 se presentan las observaciones del grupo FFA a 5, 10 y 15 días de tratamiento así como a 50, 100 y 150 μm de profundidad, se comparó con el grupo Sano y el grupo control; en el apartado a) a 50 μm la variabilidad fue de ACP_1 94.3% y ACP_2 5.4% siendo el FFA a 5 días y el GC a 10 días los que tuvieron un comportamiento similar al del grupo sano, en cambio el FFA a 10 y 15 días y el GC a 15 días tuvieron una gran dispersión; b) la variabilidad a 100 μm fue de ACP_1 86.2% ACP_2 13.5%, el grupo FFA tiene una dispersión de todas sus observaciones muy similar a 5, 10 y 15 días y el GC a 10 días comparándolo con el Sano; c) la variabilidad fue de ACP_1 89.2% y ACP_2 10.6% al día 5, 10 y 15 del grupo FFA y 10 días del GC fueron los más parecidos al grupo Sano, no así el GC a 5 y 15 días.

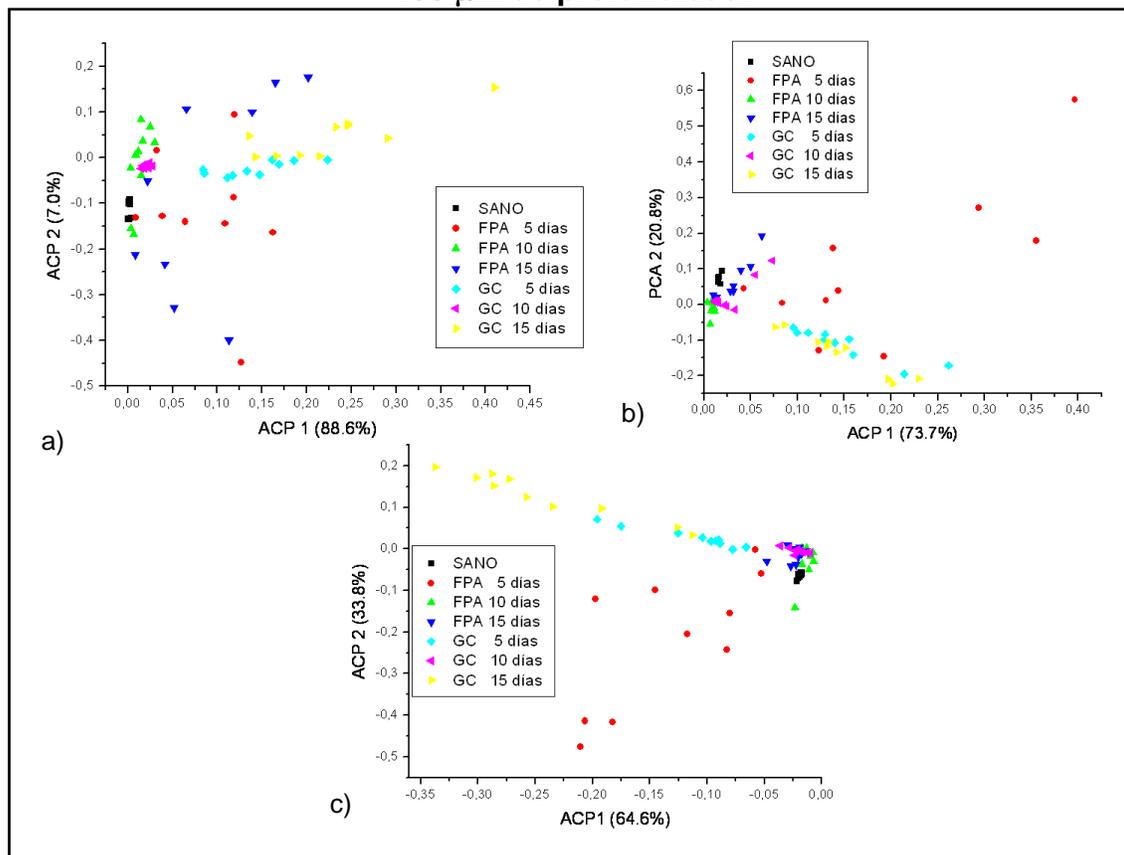
Figura 64.-Distribución de las observaciones del grupo tratado con FFA a) Se comparan los grupos DFS, Sano y GC a 50 μm en pH cíclico; b) a 100 μm ; c) a 150 μm de profundidad.



Fuente directa

En la figura 65 se presentan las observaciones del grupo FPA a 5, 10 y 15 días de tratamiento así como a 50, 100 y 150 μm de profundidad, se comparó con el grupo Sano y el GC; de la siguiente manera a) la variabilidad fue de ACP_1 88.6% y ACP_2 7.0% a 50 μm donde ningún grupo tuvo un comportamiento similar al Sano, todos estuvieron muy dispersos en la gráfica; b) la variabilidad a 100 μm fue de ACP_1 73.7% y ACP_2 20.8% a 100 μm el grupo FPA a 10 y 15 días al igual que el GC a 10 días tuvieron un comportamiento muy similar al grupo Sano, sin embargo del FPA a 5 días así como el GC a 5 y 15 días presentaron una distribución muy heterogénea comparada con el grupo Sano; c) la variabilidad fue de ACP_1 64.6% y ACP_2 33.8% a 150 μm el FPA a 10 y 15 días y el GC a 10 días fueron los más parecidos al grupo Sano, sin embargo el GC a 5 y 15 días y el FPA a 5 días presentó una dispersión apartada del grupo Sano.

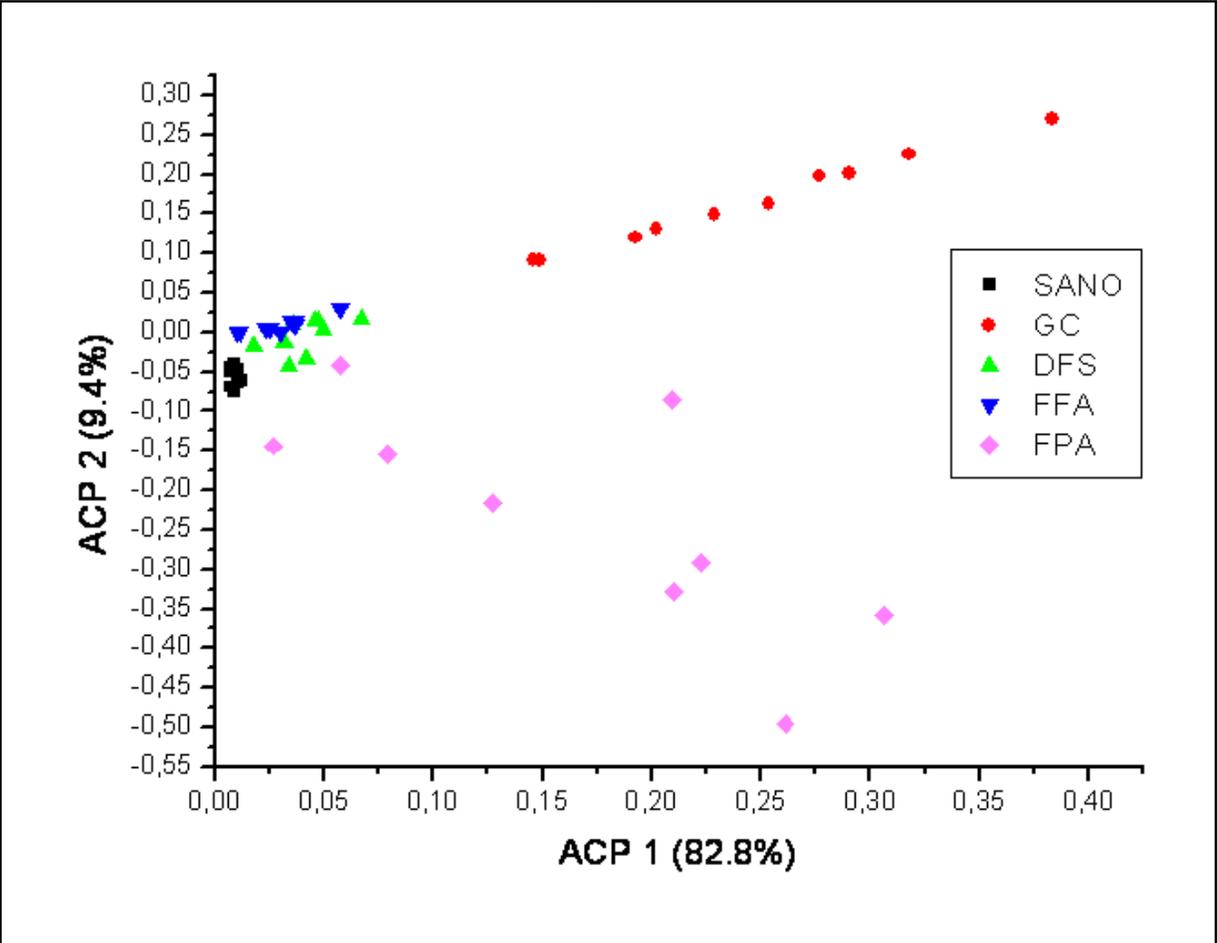
Figura 65.-Distribución de las observaciones del grupo tratado con FPA a) Se comparan los grupos DFS, Sano y GC a 50 μm en pH cíclico; b) a 100 μm ; c) a 150 μm de profundidad.



Fuente directa

Se realizó una comparación con todas las observaciones de los grupos experimentales (Sano, DFS, FPA, FFA y GC) a los 5 días de estar inmersos en el pH cíclico y con la aplicación diaria del compuesto a 50 μm de profundidad (Gráfica 17). El valor porcentual fue ACP_1 82.8% y ACP_2 9.4%, donde el grupo DFS y el FFA tuvo una distribución muy similar al grupo Sano; el grupo FPA tuvo una dispersión muy diferente a la del grupo control y ambos fueron mayormente dispersos comparándolos con el grupo DFS y FFA. La distribución de las observaciones del grupo control tuvo una disposición en el plano cartesiano con una tendencia lineal.

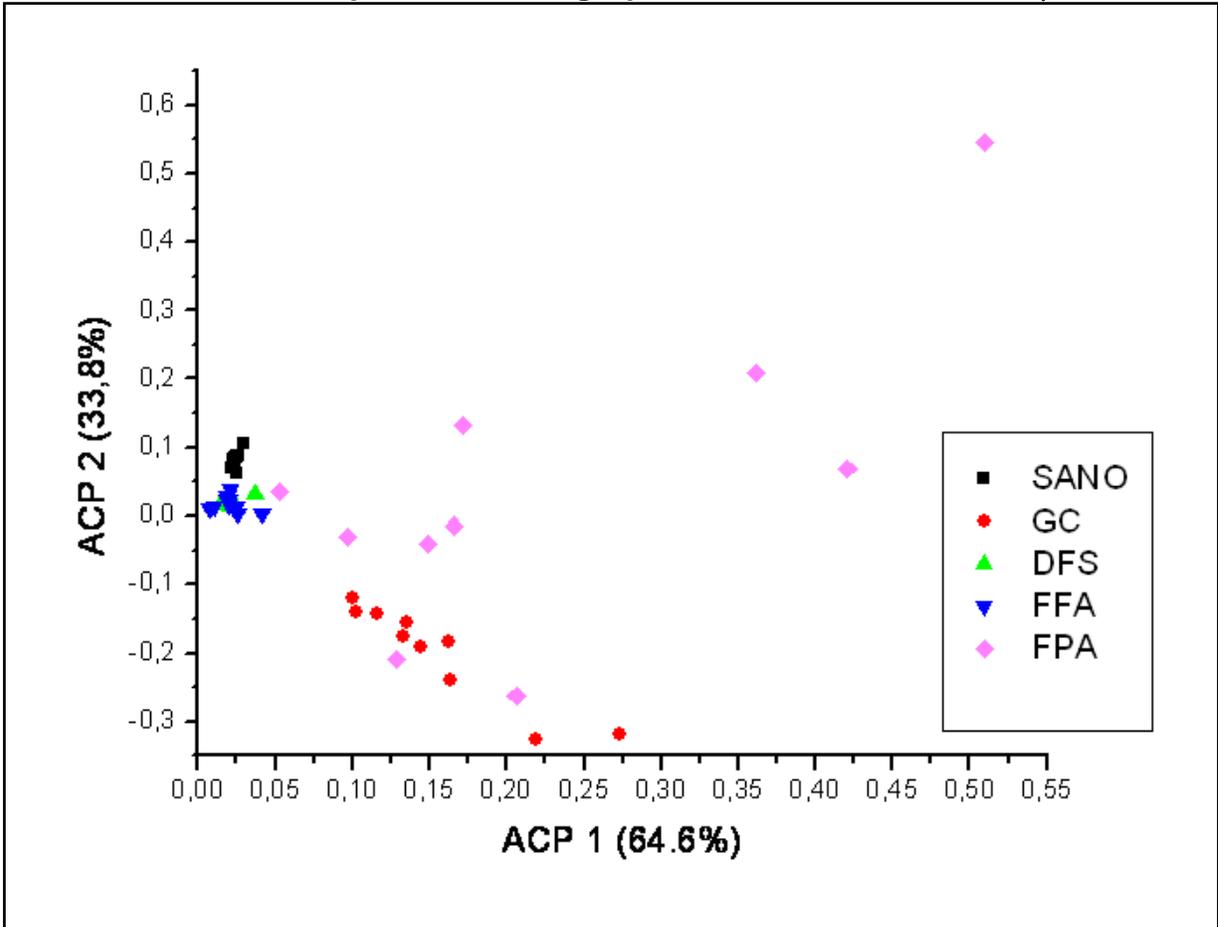
Gráfica 17.- Dispersión de todos los grupos después de 5 días de tratamiento a 50 μm .



Fuente directa.

Se siguieron realizando las comparaciones con todas las observaciones de los grupos experimentales (Sano, DFS, FPA, FFA y GC) a los 5 días de tratamiento a 100 μm de profundidad (Gráfica 18). El valor porcentual fue ACP_1 64.6% y ACP_2 33.8%, donde el grupo DFS, el FFA y el Sano tuvieron una distribución de las observaciones casi iguales; no así el grupo tratado con FPA ya que mostró una dispersión muy diferente a la del DFS y FFA y el grupo FPA tuvo una dispersión muy heterogénea en el plano cartesiano, esto se puede atribuir a los componentes del FPA al no presentar las bandas características de la hidroxiapatita.

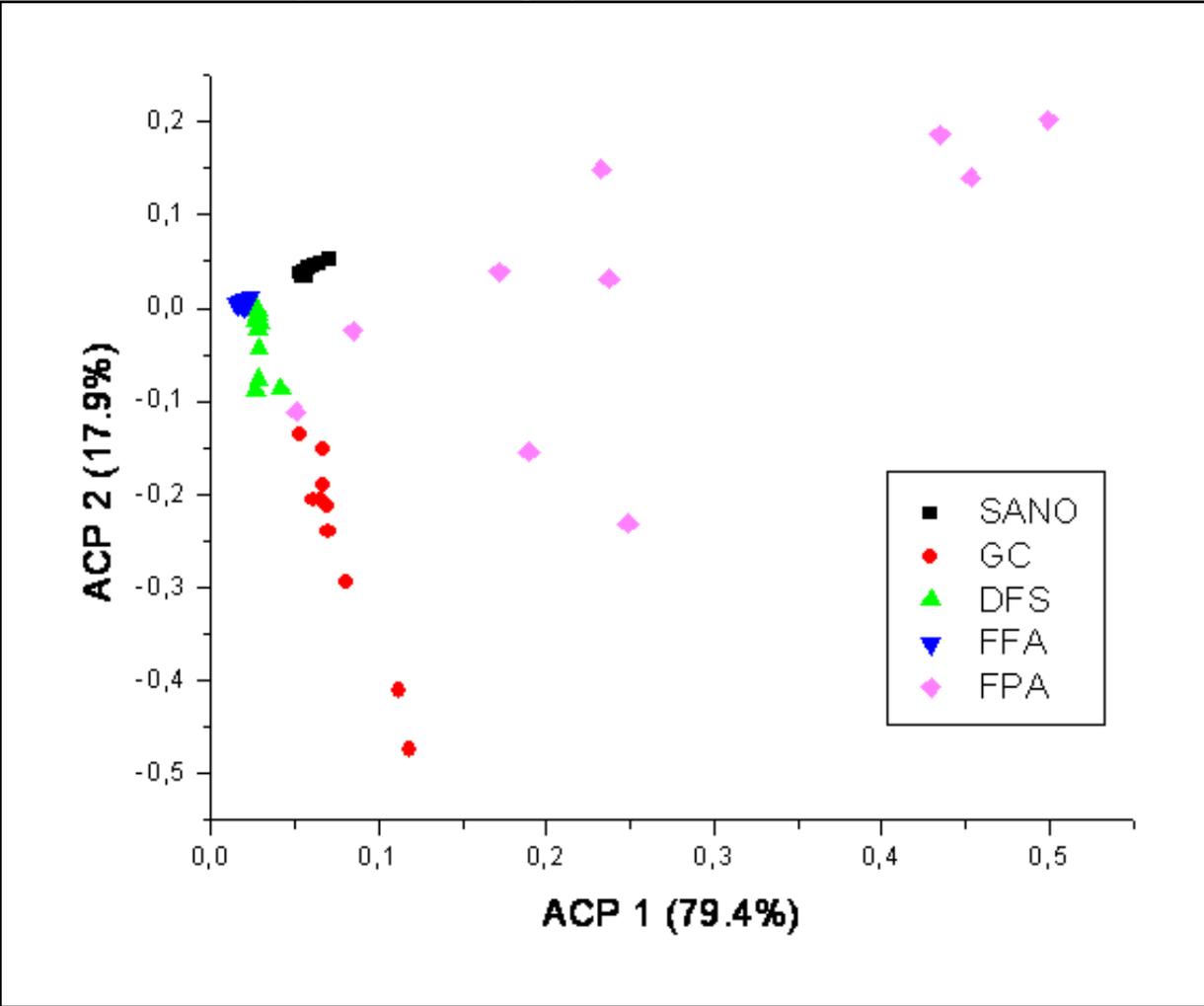
Gráfica 18.- Dispersión de los grupos tratados a 5 días a 100 μm .



Fuente directa

En la gráfica 19 se presenta la comparación de todas las observaciones de los grupos experimentales después de 5 días de tratamiento a 150 μm de profundidad. El valor porcentual fue ACP_1 79.4% y ACP_2 17.9%, donde el grupo DFS, el FFA y el Sano presentaron una distribución de las observaciones casi iguales; no así el grupo tratado con FPA ya que mostró una dispersión muy diferente a la del DFS y FFA y el grupo FPA tuvo una dispersión muy heterogénea.

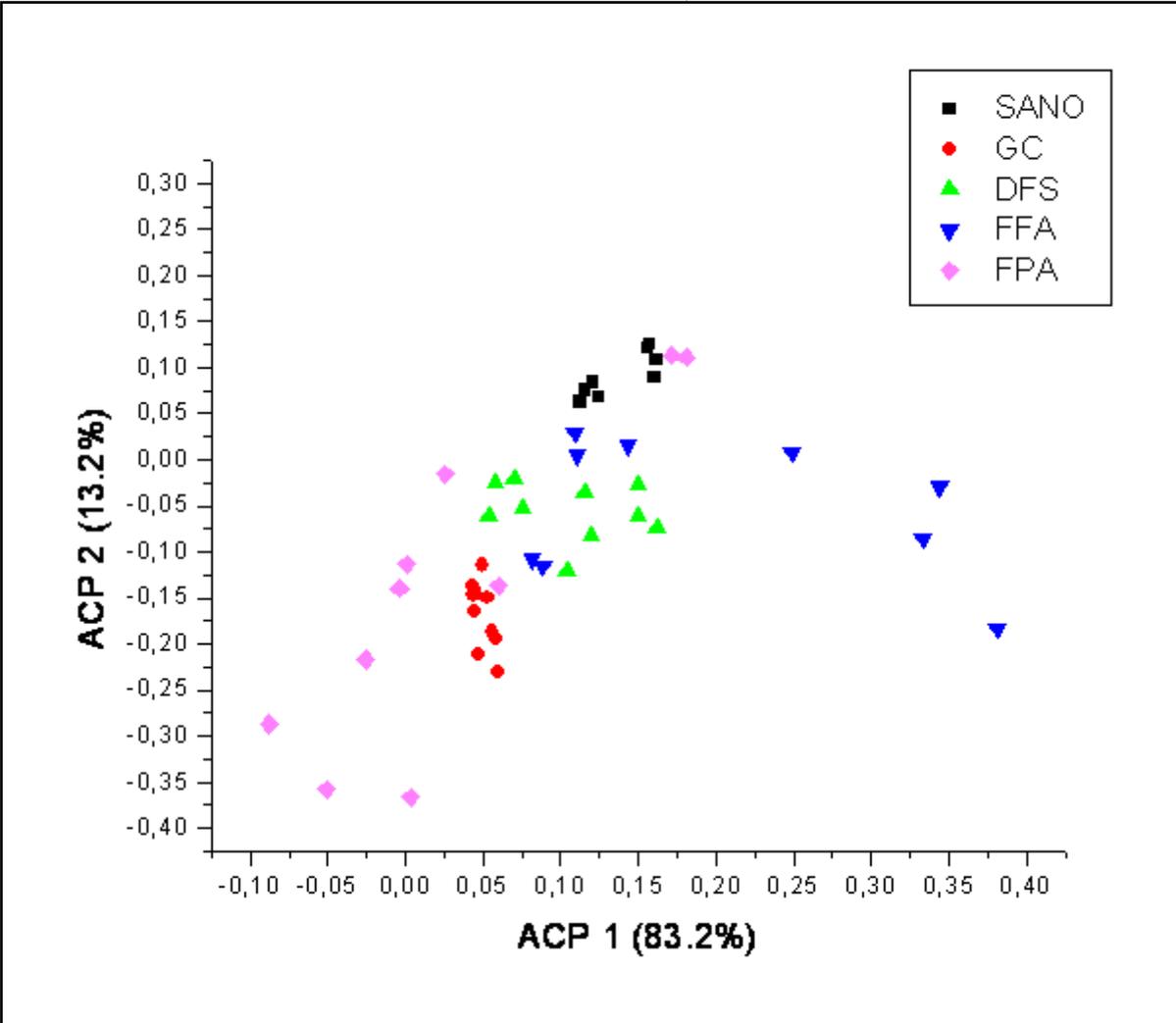
Gráfica 19.- Dispersión de los grupos a 5 días de tratamiento a 150 μm .



Fuente directa

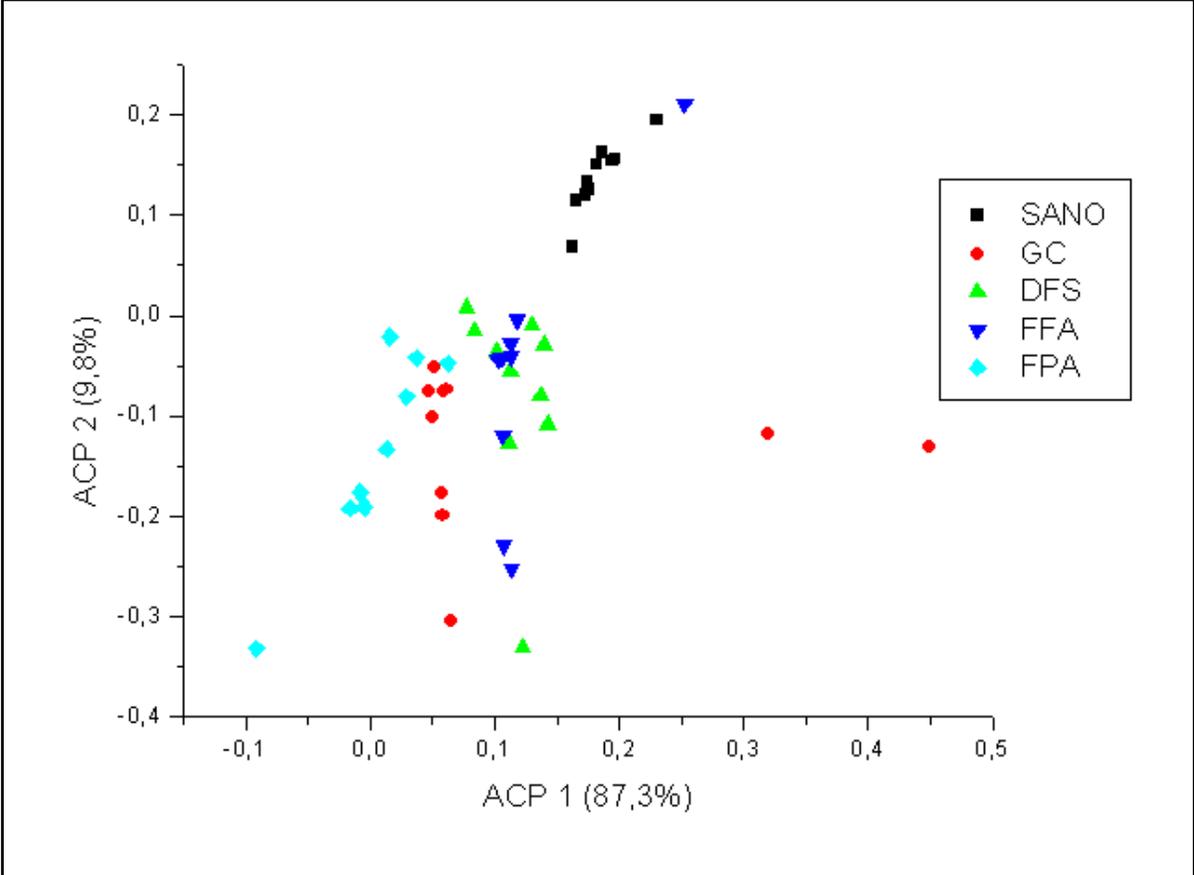
En la gráfica 20 se observa el comportamiento de todos los grupos después de 10 días de tratamiento a 50 μm de profundidad. La variabilidad fue ACP_1 83.2% y ACP_2 13.2%, donde todos los grupos DFS, FFA, FPA. GC tuvieron un comportamiento diferente entre sí.

Gráfica 20.- Dispersión de los grupos tratados después de 10 días de tratamiento a 50 μm .



El comportamiento de los grupos experimentales a 10 días de tratamiento a 100 μm tuvieron una dispersión muy heterogénea con una variabilidad de ACP_1 87.3% y ACP_2 9.18%, donde todos los grupos experimentales mostraron un comportamiento diferente entre sí como se observa en la gráfica 21.

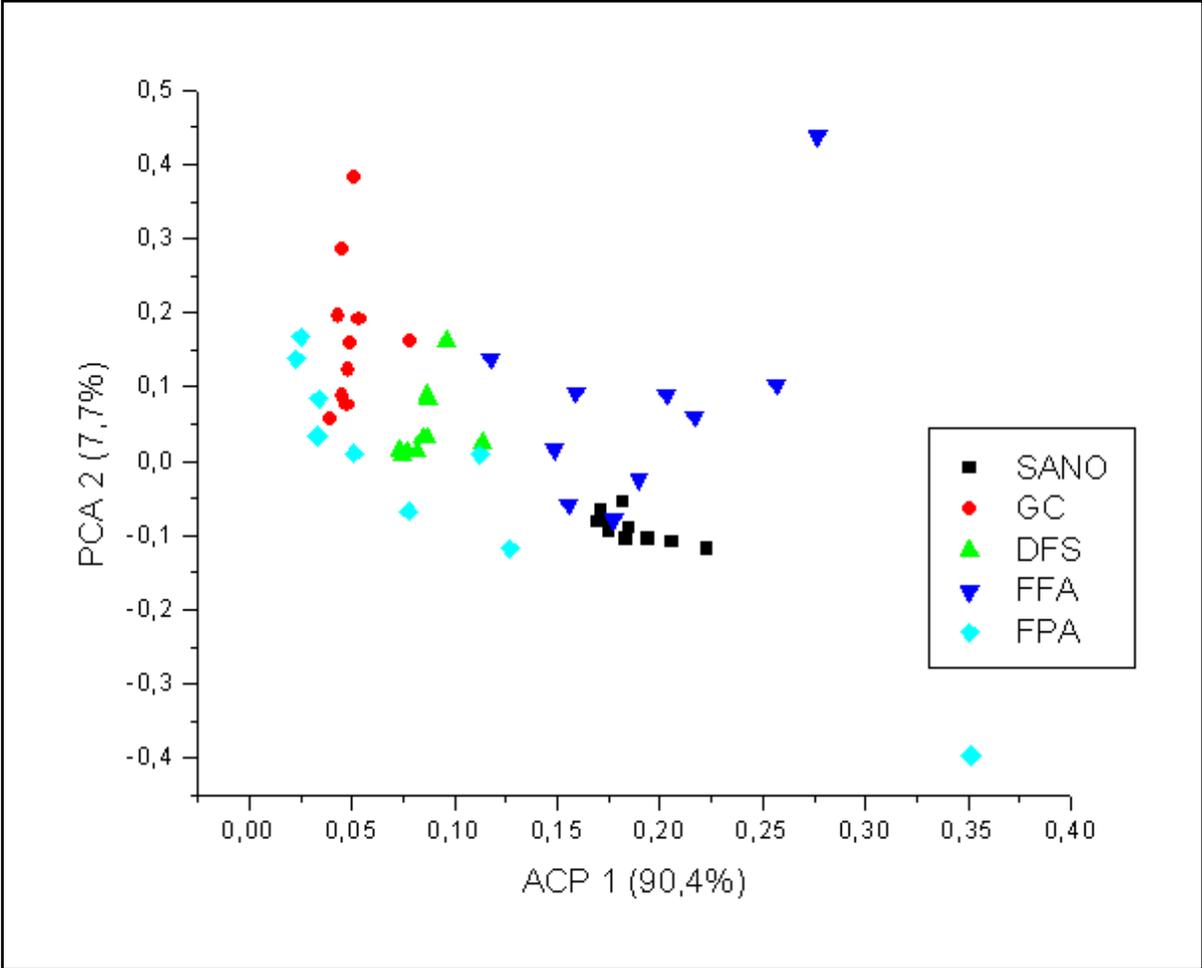
Gráfica 21.- Dispersión de los grupos tratados después de 10 días a 100 μm .



Fuente directa

En la gráfica 22 se determinó el comportamiento de todos los grupos tratados después de 10 días de tratamiento a 150 μm de profundidad. La variabilidad fue ACP_1 83.2% y ACP_2 13.2%, donde todos los grupos DFS, FFA, FPA. GC tuvieron un comportamiento diferente entre sí.

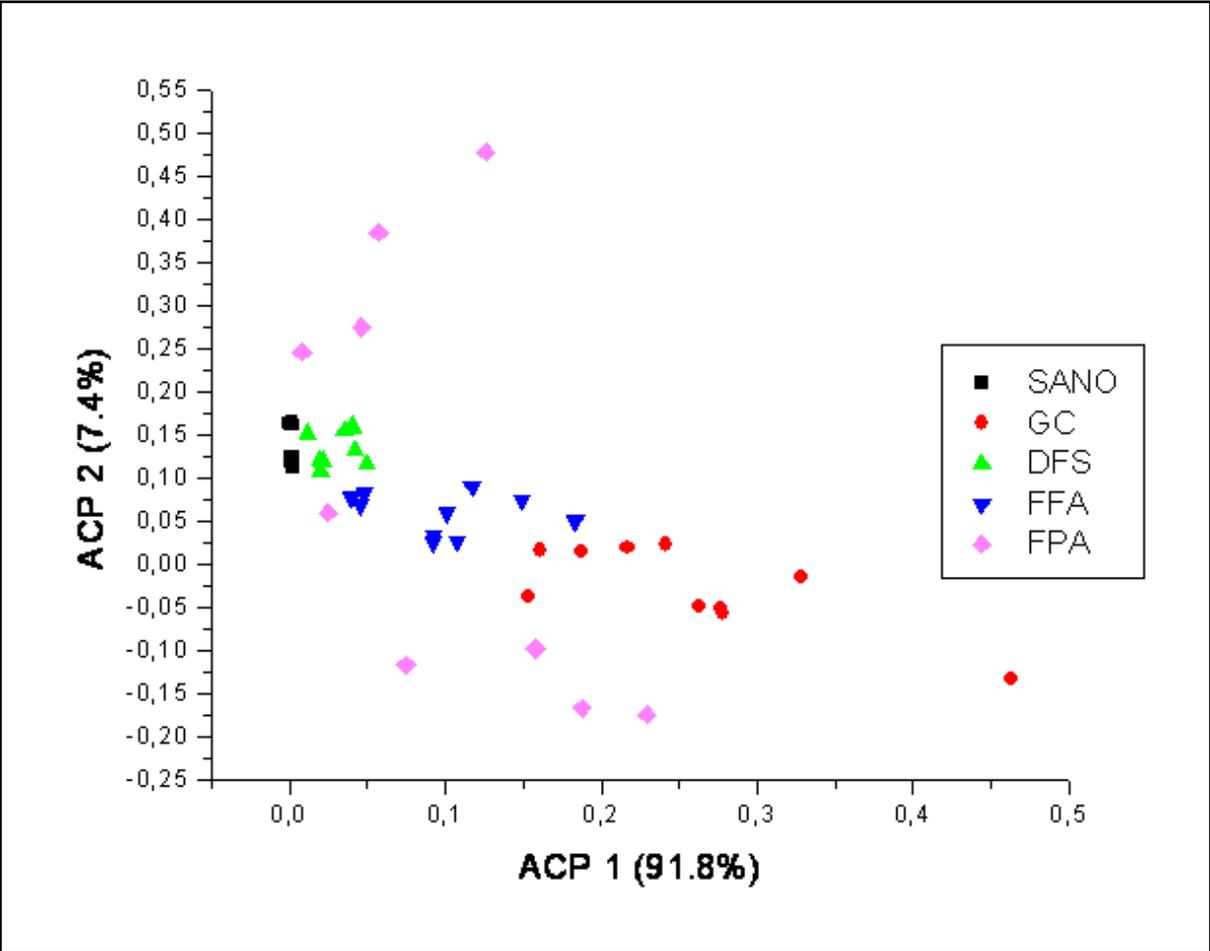
Gráfica 22.- Dispersión de los grupos tratados a 10 días a 150 μm .



Fuente directa

En la gráfica 23 se observa el comportamiento de todos los grupos después de 15 días de tratamiento a 50 μm de profundidad. La variabilidad fue ACP_1 91.8% y ACP_2 7.4%, donde todos los grupos DFS, FFA, FPA. GC tuvieron un comportamiento diferente entre sí.

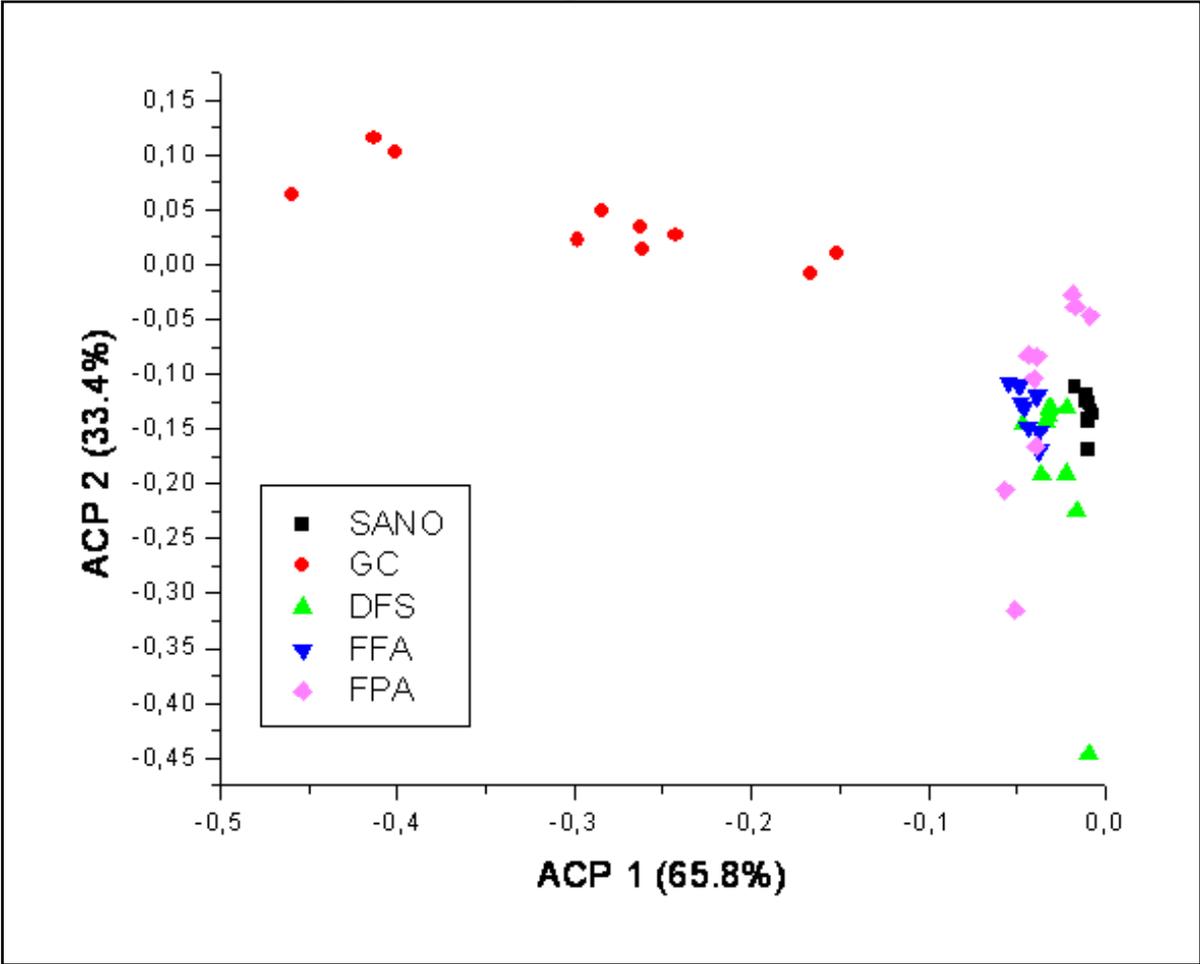
Gráfica 23.- Dispersión de los grupos tratados a 15 días a 50 μm .



Fuente directa

En la gráfica 24 se observa el comportamiento de todos los grupos a 15 días de tratamiento a 100 μm de profundidad. La variabilidad fue ACP_1 65.8% y ACP_2 33.4%, donde los grupos DFS, FFA, se comportaron de manera similar al grupo sano, mientras que el grupo control se presentó una distribución heterogénea con respecto a los demás grupos.

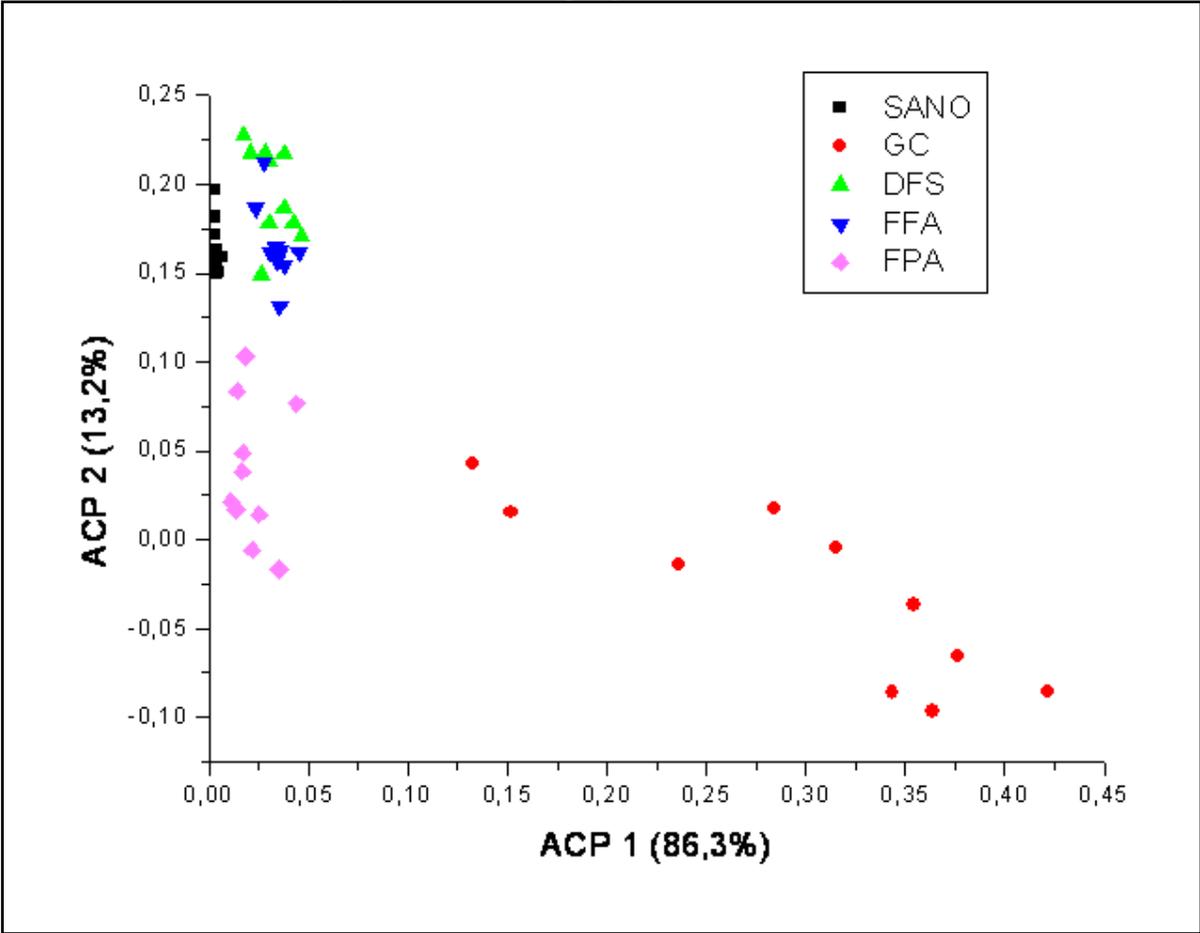
Gráfica 24.- Dispersión de los grupos tratados a 15 días a 100 μm .



Fuente directa

En la gráfica 25 se observa el comportamiento de todos los grupos después de 15 días de tratamiento a 150 μm de profundidad. El valor porcentual fue ACP_1 86.3% y ACP_2 13.2%, donde todos los grupos DFS, FFA, presentaron una distribución de sus observaciones similares a las del grupo Sano, excepto el GC por no habersele aplicado un compuesto fluorado durante 15 días; y el grupo FPA presentó un distribución más homogénea comparándolo con el grupo Sano.

Gráfica 25.- Dispersión de los grupos tratados a 15 días a 150 μm .



IX. DISCUSIÓN

Actualmente existen materiales y productos con actividad anticariogénica, entre ellos destacan los compuestos fluorados, el xilitol y recientemente los compuestos de FPC-FCA. ^(47; 48) Todos los materiales anticariogénicos pueden ser estudiados en diferentes modelos experimentales, ya sean *in vivo*, *in situ* o *in vitro*.^(49; 50) Aunque los dos primeros son preferidos por significar la complejidad biológica del proceso de desmineralización y remineralización, se prefiere utilizar modelos *in vitro*, porque hacen posible un estudio detallado de la dinámica ocurrida durante el intercambio de minerales desde los tejidos dentales, además de permitir llevar a cabo experimentos bajo condiciones altamente controladas ⁽⁵¹⁾. Este trabajo se desarrolló *in vitro* por las ventajas del control de las variables y la posibilidad de repetir otras muestras en función de la modificación o existencia de condiciones que pudieron alterar el curso del mismo. Además, el modelo experimental que se utilizó en este trabajo ha sido ampliamente referido en la literatura reciente. ^(52; 53; 54)

En condiciones fisiológicas, el esmalte se encuentra sometido a cambios ambientales físicos y químicos que llevan a un cambio en la estructura y composición; la variabilidad y la intensidad de estos factores causan la desmineralización y/o remineralización del esmalte dental, de manera que esto depende de la frecuencia en la ingesta y la composición de los alimentos, así como de la formación y proliferación la placa dentobacteriana y el pH salival.

El proceso de remineralización ocurre desde que los dientes emergen en la cavidad oral, ya que la superficie del esmalte está sometida constantemente a periodos de desmineralización y remineralización de duración e intensidad variable.⁽³⁸⁾

En la literatura se han reportado diferentes métodos *in vitro*, donde se describe los procesos que ocurren en el esmalte cuando es expuesto a un ambiente ácido⁽³⁶⁾. Sin embargo, el proceso de desmineralización en boca inmediatamente es compensado por las condiciones amortiguadoras existentes, por lo que los modelos que describen la caries como un proceso de desmineralización en algunos casos no consideran el efecto buffer oral. Esta circunstancia fue solucionada con el desarrollo de los modelos de pH cíclico. ^(36; 38; 39) En este modelo experimental se simulan

adecuadamente las condiciones fisiológicas de los periodos de desmineralización y remineralización. Se ha documentado que a través de este modelo se puede simular el ambiente natural de la cavidad oral ^(48; 53; 6) por lo cual es aplicado comúnmente para estudiar el proceso de caries y el efecto de agentes preventivos contra la misma. Además, este método ha demostrado ser exitoso para evaluar la progresión de la lesión así como determinar los cambios en el contenido mineral en las lesiones del esmalte.⁽⁵²⁾ Para conocer el efecto de los compuestos fluorados en las subsuperficie del esmalte dental se eligió el modelo de pH cíclico porque simula de mejor manera la situación *in vivo* y se tiene el control de todas las variables.^(43; 55)

Las lesiones de caries inicial creada artificialmente en el esmalte dental presenta todas las características histológicas de las lesiones naturales de caries, y con la ventaja que son reproducibles más homogéneamente, por lo cual son muy utilizadas en modelos *in vitro* para estudiar la remineralización del esmalte⁽³⁶⁾. Este modelo experimental crea un área de lesión bien definida en el esmalte, y se pueden medir diferentes zonas de un mismo espécimen según la prueba a utilizar.^(56; 57)

Con el propósito de evaluar el proceso de remineralización se han utilizado técnicas instrumentales de caracterización, tales como la microscopia electrónica de barrido, la microradiografía, la microdensitometría, la luz polarizada, la espectroscopia de absorción atómica, así como la microdureza ya sea Knoop o Vickers.^(58; 59; 60) En nuestro estudio se utilizó la prueba de Microdureza por ser una técnica práctica y de fácil valoración en comparación con otros métodos.

Kodaka⁽⁵⁰⁾ reportó que la microdureza del esmalte decrecía con el contenido mineral del tejido por el peso. Los valores de microdureza así como la densidad decrecen desde la superficie a la unión amelodentinaria mientras que las proteínas del esmalte aumentan. Estos datos sugieren que los valores de microdureza están relacionados con el contenido mineral del esmalte concluyendo que los valores de microdureza no reflejan pequeñas diferencias en el contenido mineral y orgánico del esmalte en condiciones normales pero sí detecta cambios mayores como los que se presentan en el esmalte al inicio del proceso carioso⁽⁵⁰⁾.

En un estudio para valorar *in vivo* la resistencia, del esmalte dental ante el ataque ácido, antes y después de la aplicación tópica de diferentes agentes fluorados (FFA, NaF y DFS)⁽⁶¹⁾, se determinó que todos los tratamientos tuvieron un incremento de la resistencia al ataque ácido e indicaron que el grupo tratado con DFS presentó una homogeneidad mayor del efecto sobre el esmalte dental. Un aspecto importante que debe ser tomado en cuenta es que la determinación del efecto de los compuestos fluorados fue realizada de manera directa, es decir, que la resistencia fue calculada por medio de la observación en la superficie del esmalte y no por valores cuantitativos. En los modelos experimentales es necesario obtener registros que permitan establecer asociaciones entre las variables. En el modelo empleado en esta tesis, se utilizaron valores obtenidos del cálculo de la dimensión de las indentaciones y de μ -Raman en la subsuperficie del esmalte dental, en diferentes profundidades y localizaciones (50, 100 y 150 μm).

En 2002 Chu y col.⁽⁶²⁾ valoraron la eficacia del FPA y NaF para el tratamiento inhibitorio de la caries dental, determinando que la aplicación única anual de FPA presentó resultados mayormente satisfactorios que el NaF, concluyendo que el FPA tiene mayor eficacia en el tratamiento de la inhibición de la caries.⁽⁶²⁾ Este efecto inhibitorio puede ser atribuido a la formación de fosfatos de plata en la superficie del diente después de la aplicación de FPA.^(13; 62), esto tiene un efecto benéfico en la resistencia del esmalte al medio ácido. Se entiende que el fluoruro modifica la composición química de la HA transformándola en FA, entonces las propiedades físicas van a cambiar y esto podrá ser determinado con pruebas mecánicas. Es importante mencionar que, si la aplicación única anual de FPA lograba un efecto de inhibición de la caries, en este estudio la aplicación diaria no representó un incremento en los valores de microdureza en este grupo (50, 100, y 150 μm).

La dureza es una propiedad específica de los materiales y la forma que se determina varía de acuerdo al método ⁽²⁷⁾. Para hacer las marcas, no importando el método, se utilizan indentadores de forma diferente, en este estudio se utilizó un indentador Vickers, porque es el método que ha sido más empleado además de ser un método indicado en los biocerámicos. ⁽²⁵⁾ Strassler⁽⁶³⁾ determinó la microdureza en la

superficie del esmalte en dientes humanos y dientes de bovino, utilizando un indentador de modo Knoop y no se logró establecer asociación estadísticamente significativa ($p >= 0.001$). El estudio de la superficie del esmalte dental es importante porque puede asociarse el efecto directo de los compuestos fluorados, sin embargo muy pocos estudios refieren la interacción en la subsuperficie del esmalte dental.

En la primera parte de este estudio se determinó la microdureza como resultado de la exposición de la superficie del esmalte previamente desmineralizada y tratada con soluciones fluoradas que tenían presentación distinta, bajo condiciones de pH cíclico, realizando un corte longitudinal al término de éste para determinar a 50, 100 y 150 μm de profundidad así como también en sentido oclusal, medio y cervical. Los resultados mostraron que no había diferencias estadísticamente significativas.

Las condiciones utilizadas para la determinación de la microdureza en modo Vickers fueron de 25 gramos de carga (25g_f) durante 20 segundos. Las condiciones de carga utilizadas en diferentes artículos, consideran rangos variables entre 25g_f ⁽⁶⁴⁾ y 300g_f ⁽⁵⁷⁾. En nuestro estudio se consideró la utilización de 25g_f de carga para la realización de las indentaciones con indentador Vickers, ya que las cargas de más de 100 gramos ya no son consideradas como valores de microdureza sino más bien de dureza. Por otro lado, el tiempo de carga para realizar las indentaciones también es variable, algunos estudios refieren tiempos que oscilan de 5 a 15 segundos.⁽⁵⁰⁾ En este trabajo se tomó como tiempo 20s para la realización de la indentación.

Tsuda⁽³⁰⁾ menciona respecto a la técnica de caracterización μ -Raman, que los cristales de hidroxiapatita sintética han sido muy estudiados mediante la espectroscopia μ -Raman, donde es fácil observar las bandas características del grupo PO_4^{3-} y del grupo OH^- , menciona también que la fluorescencia es inherente a las muestras biológicas. Una de las ventajas de usar μ -Raman es el que se puede colocar muestras en cualquier estado de agregación y del equipo, que puede obtenerse una resolución de $\sim 1\text{mm}$ hasta volúmenes muy pequeños de $\sim 10\text{mm}^3$.

La utilización de las espectroscopías, Infra Rojo (IR) y Raman (R) son complementarias y permiten observar modos vibracionales de los componentes de una muestra. En este trabajo se empleó el μ -Raman para llevar a cabo un análisis puntual de la subsuperficie del esmalte dental a 50, 100 y 150 μm de profundidad. Desde 1971 se comenzó a usar la técnica de μ -Raman para identificar los grupos funcionales en compuestos minerales y es hasta 1993 cuando se comienza a utilizar en investigaciones dentales informando sobre los problemas de fluorescencia de los materiales biológicos. Tsuda ⁽³⁰⁾ menciona que se puede identificar el CaF_2 en un corrimiento de 322 cm^{-1} en el esmalte dental cuando tiene una pérdida de mineralización y se le aplica a la muestra diferentes concentraciones de fluoruros para disminuir la pérdida mineral, sin embargo en esta investigación los espectros fueron adquiridos en un intervalo de $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ teniendo esto como limitante para la detección del CaF_2 . Tsuda ⁽⁶⁵⁾ en otro artículo menciona la utilización de los cristales puros de hidroxiapatita y del esmalte dental para determinar la orientación de los prismas en sentido longitudinal y transversal. En la preparación de la muestra, a los dientes se les realizó un corte transversal y se obtuvieron varios espectros, donde se determinó que no había diferencias estadísticamente significativas en la incidencia del láser en sentido transversal y longitudinal, de tal forma que en esta investigación se realizaron los corrimientos de los espectros en sentido longitudinal de acuerdo a la disposición de los prismas del esmalte.^(30; 65)

Por otro lado Penel ⁽³³⁾ menciona que la hidroxiapatita es un material biológico de gran interés dentro de la familia de las apatitas, por ser un componente de huesos y dientes y que el emplear μ -Raman es de gran utilidad ya que es posible identificar los modos vibracionales característicos del grupo PO_4^{3-} y del grupo OH^- ya que la muestra no es modificada en su estructura. Esto quiere decir que es una técnica no destructiva y se observan las bandas características que al igual que en este trabajo coinciden como el grupo PO_4^{3-} en un intervalo de $900\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ y el grupo OH^- de $3510\text{--}3650\text{ cm}^{-1}$. Lo anterior coincide con lo informado por Sócrates⁽⁴⁶⁾ y Kirchner⁽⁶⁶⁾.

Gilchrist ⁽³²⁾ realizó un estudio donde comparó las diferentes concentraciones de fosfato en esmalte dental desmineralizado (caries) y esmalte de la primera dentición

utilizando espectroscopia μ -Raman, haciendo referencia a una intensidad de hasta 25888 ua en el grupo de esmalte con caries y en diente de la primera dentición con una intensidad de hasta 59625 ua, y no encontró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. En este trabajo se utilizó esmalte dental sano y se comparó con esmalte dental desmineralizado y tratado con compuestos fluorados a 5, 10 y 15 días obteniendo una intensidad máxima de 14500 ua en el grupo FFA a 15 días y hasta 900 ua como la intensidad más baja del mismo grupo.

Kirchner ⁽⁶⁶⁾ en su artículo realizó un estudio comparando dientes humanos de 4 a 16 siglos (400-1600 años) con dientes de la primera y segunda dentición, para determinar los cambios en la composición orgánica e inorgánica de la muestra utilizando μ -Raman. A la muestra le realizó un corte transversal y ninguno mostró fluorescencia en sus espectros. Su trabajo se inclinó únicamente para establecer el grupo funcional del PO_4^{3-} en un intervalo de 900-1000 cm^{-1} aunque también se identificó grupo CH_2 y NH en la región de 1200-1680 cm^{-1} . Comparando esos resultados con esta investigación se llegó a la conclusión que a pesar de los años de la muestra no presentó cambios en lo que respecta al grupo PO_4^{3-} . ⁽⁶⁶⁾

Inosita ⁽⁶⁷⁾ en su artículo comenta del uso del μ -Raman como técnica para poder identificar la intensidad de la banda del grupo PO_4^{3-} en esmalte dental con caries (N=10) para determinar la distribución del grupo PO_4^{3-} y un grupo amida I en la zona de fosetas y fisuras. En éste estudio se realizó en la superficies vestibular y lingual de cada molar inferior con esmalte dental sano y desmineralizado *in vitro*.

Minal ⁽⁶⁸⁾ en su artículo investigó la superficie del esmalte dental para hacer diferencias entre la superficie de esmalte sano y esmalte con caries por medio de μ -Raman analizando sus resultados con el Análisis de Componentes Principales (ACP), menciona que las intensidades son muy variables cuando se toman los espectros en la zona oclusal, debido a la disposición de los prismas del esmalte. La presencia o ausencia de bandas del grupo PO_4^{3-} depende de la sustitución del Carbonato en la apatita de la red cristalina y sus resultados demostraron que no hubo diferencias observadas en dientes sanos y en dientes con caries en la región del grupo PO_4^{3-} (900-1100 cm^{-1}). En comparación con esta investigación el Grupo

Control (GC) al no presentar las bandas características de los grupos PO_4^{3-} e OH^- no significa que no existan, sólo que es tanta la fluorescencia que no permite ver las bandas del grupo control.

De acuerdo a la revisión bibliográfica llevada a cabo, no existe en la literatura un trabajo similar en el que se lleve a cabo una comparación del esmalte dental subsuperficial en las diferentes profundidades y localizaciones, tratados con tres de los compuestos fluorados más utilizados en la Clínica de Odontopediatría, bajo condiciones de pH cíclico.

X. CONCLUSIONES

- ❖ Los compuestos fluorados si tienen efecto sobre la subsuperficie del esmalte dental en condiciones de pH cíclico.
- ❖ Los diferentes compuestos fluorados los DFS (HVN 110.0), FPA (HVN 116.0), FFA (HVN 93.2) y GC (HVN 107.0) presentaron diferencias estadísticamente significativas de los valores de microdureza en todos los periodos experimentales.
- ❖ El efecto de los compuestos fluorados sobre los valores de microdureza dental subsuperficial entre los diferentes días fue estadísticamente significativo [Día 0 (HVN 254.0), 5 días (HVN 122.0), 10 días (HVN 110.0) y 15 días (HVN 81.8)].
- ❖ Los valores obtenidos a partir de la prueba de microdureza del esmalte dental entre las localizaciones oclusal (112.0), medio (112.0) y cervical (116.0). así como entre 50 μm (110.0), 100 μm (112.0) y 150 μm (116.0) de profundidad no fueron estadísticamente significativos.
- ❖ El grupo que presentó mayor valor de microdureza en la subsuperficie del esmalte dental fue el DFS a 5 días (164.90), seguido del FFA a 10 días (148.6) y el FPA a 5 días (139.78)
- ❖ De los espectros Raman de los grupos experimentales tratados durante 5 días solamente el grupo FPA presentó las bandas características del PO_4^{3-} en 963.4 cm^{-1} , y del OH^- en 3582.8 cm^{-1} .
- ❖ A 10 días de tratamiento todos los grupos experimentales presentaron bandas características del PO_4^{3-} a 965.9 cm^{-1} y del OH^- a 3579.5 cm^{-1} .
- ❖ A los 15 días del pH cíclico el FFA se identificaron nuevamente las bandas características del PO_4^{3-} y OH^- .
- ❖ Con base en los espectros Raman se observa un efecto remineralizante en el esmalte dental en cualquier periodo de tiempo en los grupos tratados con DFS y FFA a 5, 10 y 15 días.
- ❖ En los espectros Raman del grupo tratado con FPA a 50, 100 y 150 μm se observaron solamente bandas características del NO_3^- y NH_4^+ .
- ❖ De los 3 compuestos fluorados (DFS, FPA, FFA) estudiados en este trabajo el FFA y DFS tienen el efecto de recuperar la mineralización del esmalte dental

con las aplicaciones de los compuestos fluorados, es decir que a mayor tiempo de tratamiento, mayor efecto en la remineralización del esmalte dental.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Low D, Duraman N, Fulton J, Tezuka N.** A comparative study of the microstructure-property relationship in human adult and baby teeth. *Ceram Eng Sci Proc.* 6, 2005, Vol. 26, 145-152.
2. **Veiderma M, Tonsuaadu K, Knubovets R, Peld M.** Impact of anionic substitutions on apatite structure and properties. *J Organometallic Chemistry.* 2005, Vol. 690, 2638-2643.
3. **Gómez M, Campos A.** *Histología y Embriología Bucodental.* 2a . España : Medica Panamericana, 2004. págs. 273 - 315.
4. **Wu, C.** Grape products and Oral Health. *J Nutrition.* 2009, Vol. 139, 1818-1823.
5. **Samuel S, Rubinstein C.** Microhardness of Enamel Restored with Fluoride and Non-Fluoride Releasing Dental Materials. *Braz Dent J.* 1, 2001, Vol. 12, 35-38.
6. **Tantbirojn D, Huang A, Ericson M, Poolthong S.** Change in surface hardness of enamel by a cola drink and CPP-ACP paste. *J Dentistry.* 2008, Vol. 36, 74-79.
7. **Lazzari., Eugene.** *Bioquímica Dental.* México : Nueva Editorial Interamericana, 1970.
8. **Featherstone, J.** Remineralization the Natural Caries Repair Process the Need for New Approaches. *Adv Dent Res.* 4, 2009, Vol. 21, 4-7.
9. **Garcia F, Hicks M.** Maintaining the integrity of the enamel surface: The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *JADA.* 2008, Vol. 139, 25S-34S.
10. **Young A, Tenuta L.** Initial Erosion Models. *Caries Research.* 2011, Vol. 45, 33-42.
11. **Seif T, Boveda C, Calatrava L.** *Cariología Prevencion, Diagnostico y Tratamiento Contemporaneo de la Caries Dental.* s.l.: Actualidades Medico Odontologicas Latinoamerica, 1997. págs. 242 - 254.
12. **Rosenblatt A, Standford T, Niederman R.** Silver Diamine Fluoride: A Caries "Silver-Fluoride Bullet". *J Dent Res.* 2, 2009, Vol. 88, 116-125.
13. **Yamaga R, Nishino M, Yoshida S, Yokomizo I.** Diammine Silver Fluoride and its clinical application. *J Osaka.* 12, 1972, 1 - 20.

14. **Technical Note.** *Saforide Aprovevement No. (45AM) 18.* 872790 Morita Inc, Japan, 1970.
15. **Seppä, L.** Fluoride Varnishes in Caries Prevention. *Med Princ Pract.* 2004, Vol. 13, 307-311.
16. **Newburn, E.** *Cariology.* 3a. Chicago, Illinois : Quintessence books, 1989. págs. 331-353.
17. **Maia L, de Souza I, Cury J.** Effect of a combination of fluoride dentifrice and varnish on enamel surface rehardening and fluoride uptake in vitro. *Eur J Oral Sci.* 111, 2003, Vol. 1, 68-72.
18. **Hazelrigg C, Dean J, Fontana M.** Fluoride Varnish Concentration Gradient and Its Effect on Enamel Demineralization. *Pediatric Dentistry.* 25, 2003, Vol. 2, 119-126.
19. **Arends J, Schuthof J.** Fluoride Content in Human Enamel After Fluoride Application and Washing an in Vitro Study. *Caries Res.* 9, 1975, Vol. 5, 363-372.
20. **Newbrun, E.** Topical Fluorides in Caries Prevention and Management: A North American Perspective. *J Dental.* 10, 2001, Vol. 65, 1078-1083.
21. **Jardim J, Pagot M, Maltz M.** Artificial enamel dental caries treated with different topical fluoride regimes: An in situ study. *J Dentistry.* 36, 2008, 396-401.
22. **Paes A, Tabchoury C, Zero D, Cury J.** Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. *Am J Dent.* 16, 2003, Vol. 2, 91-95.
23. **Goldstein J, Newbury D, Joy D, Lyman C, Echlin P, Lifshin E, Sawyer L, Michael J.** *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis.* 3th. New York : Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2003. págs. 1-9.
24. **Koritsanszky T, Coppens P.** Chemical Applications of X-Ray Charge-Density Analysis. *Chem Rev.* 2001, Vol. 101, 1583-1627.
25. **Wang L, D'Alpino P, Lopes L, Pereira J.** Mechanical properties of dental restorative materials: relative contribution of laboratory tests. *J Appl Oral Sci.* 11, 2003, Vol. 3, 162-167.
26. **Attin T, Koidl W, Buchalla W, Schaller H, Kielbassa A, Hellwig E.** Correlation of microhardness and wear in differently eroded bovine dental enamel. *Oral Biol.* 3, 1997, Vol. 42, 243-250.

27. **ASTM**. International Designation: E 384-06. *Standard Test Method for Microindentation Hardness of Materials*. United States : s.n., 2007.
28. **Chuenarrom C, Benjakul P, Daosodsai P**. Effect of Indentation Load and Time on Knoop and Vickers Microhardness Tests for Enamel and Dentin. *Materials Research*. 4, 2009, Vol. 12, 473-476.
29. **Gutiérrez M, Reyes J**. Microhardness and Chemical Composition of Human Tooth. *Materials Research*. 3, 2003, Vol. 6, 367-373.
30. **Tsuda H, Arends J**. Raman Spectroscopy in Dental Research: A Short Review of Recent Studies. *Adv Dent Res*. 4, 1997, Vol. 11, 539-547.
31. **Pucéat E, Reynard B, Lécuyer C**. Can crystallinity be used to determine the degree of chemical alteration of biogenic apatates? *Chemical Geology*. 2004, Vol. 205, 83-97.
32. **Gilchrist F, Santini A, Harley K, Deery C**. The use of micro-Raman spectroscopy to differentiate between sound and eroded primary enamel. *J Pediatric Den*. 2007, Vol. 17, 274-280.
33. **Penel G, Leroy G, Sombret B, Huvenne J, Bres E**. Infrared and Raman microspectrometry study of fluor-fluor-hydroxy and hydroxy-apatite powders. *J Dent Mat*. 1997, Vol. 8, 271-276.
34. **Williams Q, Knittle E**. Infrared and Raman Spectra of Ca₅(PO₄)₃F₂-Fluorapatite at high pressures: Compression- Induced changes in phosphate site and Davydov Splittings. *J Phys Chem Solids*. 4, 1996, Vol. 57, 417-422.
35. **Antonakos A, Liarokapis E, Leventouri T**. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials*. 2007, Vol. 28, 3043-3054.
36. **ten Cate J, Duijsters P**. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res*. 16, 1982, 201-210.
37. **ten Cate J, Buijs M, Damen J**. pH-cycling of enamel and dentin lesions in the presence of low concentrations of fluoride. *Eur J Oral Sci*. 103, 1995, Vol. 6, 362-367.
38. **Herkströter F, Witjes M, Arends J**. Demineralization of Human Dentine Compared with Enamel in a pH-Cycling Apparatus with a Constant Composition during De-and Remineralization Periods. *Caries Res*. 25, 1991, 317-322.
39. **Argenta R, Tabchoury C, Cury J**. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. *Pesqui Odontol Bras*. 17, 2003, Vol. 3, 241-246.

40. **Tucker K, Adams M, Shaw L, Smith A.** Human enamel as a substrate for in vitro acid dissolution studies influence of tooth surface and morphology. *Caries Res.* 2, 1998, Vol. 32, 135-140.
41. **ten Cate, Damen J, Buijs M.** Inhibition of dentin demineralization by fluoride in vitro. *Caries Res.* 2, 1998, Vol. 32, 141-147.
42. **Itthagaran A, Wei S.** The effect of different commercial dentifrices on enamel lesion progression: an in vitro pH-cycling study. *Int Den J.* 50, 2000, 21-28.
43. **Ivancakova R, Hogan M, Harless J, Wefel J.** Effect of Fluoridated Milk on Progression of Root Surface Lesions in vitro under pH Cycling Conditions. *Caries Res.* 37, 2003, 166-171.
44. **Mukai Y, Lagerweij M, ten Cate J.** Effect of a Solution with High Fluoride Concentration on Remineralization of Shallow and Deep Root Surface Caries in Vitro. *Caries Res.* 5, 2001, Vol. 35, 317-324.
45. **Orth R, Pereira C, Aparecido J.** A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. *Pesqui Odontol Bras.* 3, 2003, Vol. 17, 241-246.
46. **Sócrates, George.** *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies.* 3th. England, Lon. : John Wiley, 2006, págs. 96, 198.
47. **Ly K, Milgrom P, Rothen M.** The potential of dental-protective chewing gum in oral health interventions. *Journal of the American Dental Association.* 2008, Vol. 139, págs. 553-563.
48. **Walsh, L.** Contemporary technologies for remineralization therapies:A review. *International Dentistry SA.* Australasian Edition, Vol. 4, 4, págs. 34-46.
49. **Reynolds E, Cain C, Webber E, Black C, Riley P.** Antocariogenicity of Calcium Phosphate Complex of Tryptic Casein Phosphopeptides in the Rat. *J Dental Res.* 6, 1995, Vol. 74, 1272-1279., págs. 445-54.
50. **Kodaka T, Debari K, Yamada M.** Correlation between microhardness and mineral content in sound human enamel. *Caries Research.* 1992, Vol. 26, págs. 139-141.
51. **White, D.** The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. *Advance on Dental Research.* 1995, Vol. 9, 3, págs. 175-193.

52. **Itthagarun A, Wei S, Wefel J.** Morphology of initial lesions of enamel treated with different commercial dentifrices using a pH cycling model: scanning electron microscopy observations. 1999, Vol. 49, págs. 352-360.
53. **Kumar V, Itthagarum A, King N.** The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesions:an in vitro study. *Australian Dental Journal.* 2008, Vol. 53, págs. 34-40.
54. **Tantbirojn D, Huang A, Ericson MD.** Change in surface hardness of enamel by a cola drink and a CPP-ACP paste. *Journal of Dentistry.* 2008, Vol. 36, págs. 74-79.
55. **Nelson D, Coote G, Shartiati M, Featherstone J.** High resolution fluoride profiles of artificial in vitro lesions treated with fluoride dentifrices and mouthrinses during pH cycling conditions. *Caries Res.* 4, 1992, Vol. 26, 254-262.
56. **Buzalaf M, Hannas A, Magalhães A, Rios D, Honório H, Delbem A.** pH-cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. *Journal of Applied Oral Science.* 4, 2010, Vol. 18, 316-334.
57. **Asma, A.** The effect of repeated applications of Enamel surface treatment on in vitro bovine-enamel hardness after multiple exposures to cola-drink. *Pakistan Oral & Dental Journal.* 1, 2010, Vol. 30.
58. **Reynolds E, Cai F, Cochrane N, Shen P, Walker G, Morgan M.** Fluoride and Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate. *Journal of Dental Research.* 2008, Vol. 87, 4, págs. 244-248.
59. **Xiaojuna D, Jingb L, Xuehuac G, Hongd R, Youchenge Y, Zhangyuf G, Sung J.** Effects of CPP-ACP Paste on the Shear Bond Strength of Orthodontic Brackets. *Angle Orthodontist.* 2009, Vol. 79, 5.
60. **Reynolds E, Cai F, Shen P, Walker G.** Remineralization of Enamel Lesions by Various Forms of Calcium in a Mouthrinse or Sugar-free Chewing Gum. *Journal of Dental Research.* 2003, 2003, Vol. 82, 3, págs. 206-211.
61. **De la Cruz C, Camacho G, Castillo G, Cervantes A, Sánchez B.,** Resistencia al ataque ácido en esmalte dental humano antes y después de la aplicación tópica de tres agentes fluorados. *ADM.* LVIII, 2001, 31-35.
62. **Chu C, Lo E, Lin H.** Effectiveness of silver diammine fluoride and sodium fluoride varnish in arresting dentin caries in Chinese pre-school children. *J Dent Research.* 11, 2002, Vol. 81, 767-770.

63. **Strassler H, Minah G, Kula K.** Microbiological and Microhardness Evaluation of Artificial Enamel Fissures Worn Intraorally by Humans. *J Clinical Microbiology*. 1, 1986, Vol. 23, 6-10.
64. **Lata S, Varghese NO, Varughese JM.** Remineralization potential of fluoride and amorphous calcium phosphate-casein phosphopeptide on enamel lesions: An in vitro comparative evaluation. *Journal of Conservative Dentistry*. 2010, Vol. 13, 1.
65. **Tsuda H, Arends J.** Orientational Micro-Raman Spectroscopy on Hydroxyapatite Single Crystals and Human Enamel Crystallinities. *J Dent Res*. 11, 1994, Vol. 73, 1703-1710.
66. **Kirchner M, Edwards H.** Ancient and Modern Specimens of Human Teeth o Fourier Transform Raman Spectroscopic Study. *J Raman Spectroscopy*. 1997, Vol. 28, 171.178.
67. **Kinoshita H, Miyoshin N, Fukunaga Y, Ogawa T, Sano K.** Functional mapping of carious enamel in human teeth Raman microspectroscopy. *J Raman Spectroscopy*. 2008, Vol. 39, 655-660.
68. **Mihály J, Gombás V, Afishah A, Mink J.** FT-Raman investigation of human dental enamel surfaces. *J Raman Spectroscopy*. 2009, Vol. 40, 898-902.
69. Demineralization models in pediatric dentistry 322-29
70. **Ten Cate JM, Duijsters PPE.** Alternating Demineralization and Remineralization of Artificial Enamel Lesions. *Caries Research*. 1982, Vol. 16, págs. 201-210.

XII. ANEXOS

1. Pruebas estadísticas.

La estadística no paramétrica esta basada en un modelo que especifica sólo condiciones muy generales y ninguna acerca de la distribución, por lo que se dice que son de libre distribución, las observaciones son independientes y la escala de medición puede ser ordinal, y para algunas pruebas hasta nominal. Cuando la distribución de los datos en una escala de intervalo o de razón no se ajusta a una distribución normal, también es adecuado utilizar la estadística no paramétrica.

El tipo de análisis depende del número de variables a comparar. Se llama multivariado cuando se busca una asociación entre una variable dependiente y muchas independientes, varias dependientes y una independiente o múltiples dependientes e independientes.

2. Prueba de Kruskal-Wallis

Es la prueba no paramétrica equivalente al ANOVA de una vía, por lo que es un análisis de varianza unifactorial por rangos. Es muy útil para decidir si $k(k > 2)$ muestras independientes son diferentes basándose en la mediana, por lo que no se distribuyen normalmente. Si las muestras provienen de la misma población, es decir, son iguales, los rangos promedio deberían ser aproximadamente los mismos. Con esta prueba se evalúa la diferencia entre los rangos promedio para determinar si son lo suficiente dispares para no ser de la misma población.

Si la prueba de Kruskal-Wallis es significativa, nos indica al igual que ANOVA que al menos uno de los grupos es diferente, pero no dice cuál(es) es(son).

3. Prueba de Ji cuadrada (X^2)

También llamada chi cuadrada, aunque su nombre correcto es ji cuadrada pues se trata de la letra griega. Es la prueba adecuada para analizar las diferencias entre frecuencias o proporciones. Generalmente requiere de un sustancial número de

observaciones para ser informativa, no obstante, es ampliamente utilizada en reportes de ensayos clínicos, estudios observacionales, estudios de casos y controles, encuestas y estudios de laboratorio de tipo experimental. El uso más común de esta prueba es cuando una de las variables dependientes presenta dos o más observaciones ayuda a estimar si hay diferencia entre las diferentes observaciones.

4. Prueba de Rangos asignados de Wilcoxon

Es la prueba no paramétrica para la comparación de dos grupos dependientes análoga a la t pareada. Se basa en los rangos de las observaciones individuales, se utiliza para datos en escala ordinal, de intervalo o razón. En ella se adjudica mayor peso a los pares que muestran mayores diferencias entre dos condiciones, más que a los pares cuya diferencia es pequeña. La N representa el total de pares comparados.

La interpretación de esta prueba es: si la suma de los rangos positivos es diferente a la de los rangos negativos, inferimos que el grupo X es diferente al grupo Y .

5. Análisis Multivariado

En el análisis multivariado se busca la asociación entre una o varias variables dependientes y más de una variable independiente. Su objetivo, es identificar tendencias y hacer estimaciones, considerando las variables extra a una asociación bivariada. El número de variables puede ser reducido por la eliminación o discriminación de las que no parecen importantes, buscándose diferentes modelos para simplificar las estimaciones. Cuando se calcula un sólo coeficiente de correlación multivariable, se refleja el efecto simultáneo de todas las variables independientes en la variable dependiente.

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un grupo de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un número menor, perdiendo la menor cantidad de información posible

Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí. Un aspecto clave en ACP es la interpretación de los factores, ya que ésta no viene dada a priori, sino que será deducida tras observar la relación de los factores con las variables iniciales (habrá, pues, que estudiar tanto el signo como la magnitud de las correlaciones). Esto no siempre es fácil, y será de vital importancia el conocimiento que el experto tenga sobre la materia de investigación.

a) Análisis de la matriz de correlaciones

Un análisis de componentes principales tiene sentido si existen altas correlaciones entre las variables, ya que esto es indicativo de que existe información redundante y, por tanto, pocos factores explicarán gran parte de la variabilidad total.

b) Selección de los factores

La elección de los factores se realiza de tal forma que el primero recoja la mayor proporción posible de la variabilidad original; el segundo factor debe recoger la máxima variabilidad posible no recogida por el primero, y así sucesivamente. Del total de factores se elegirán aquellos que recojan el porcentaje de variabilidad que se considere suficiente. A éstos se les denominará componentes principales.

c) Análisis de la matriz factorial

Una vez seleccionados los componentes principales, se representan en forma de matriz. Cada elemento de ésta representa los coeficientes factoriales de las variables (las correlaciones entre las variables y los componentes principales). La matriz tendrá tantas columnas como componentes principales y tantas filas como variables.

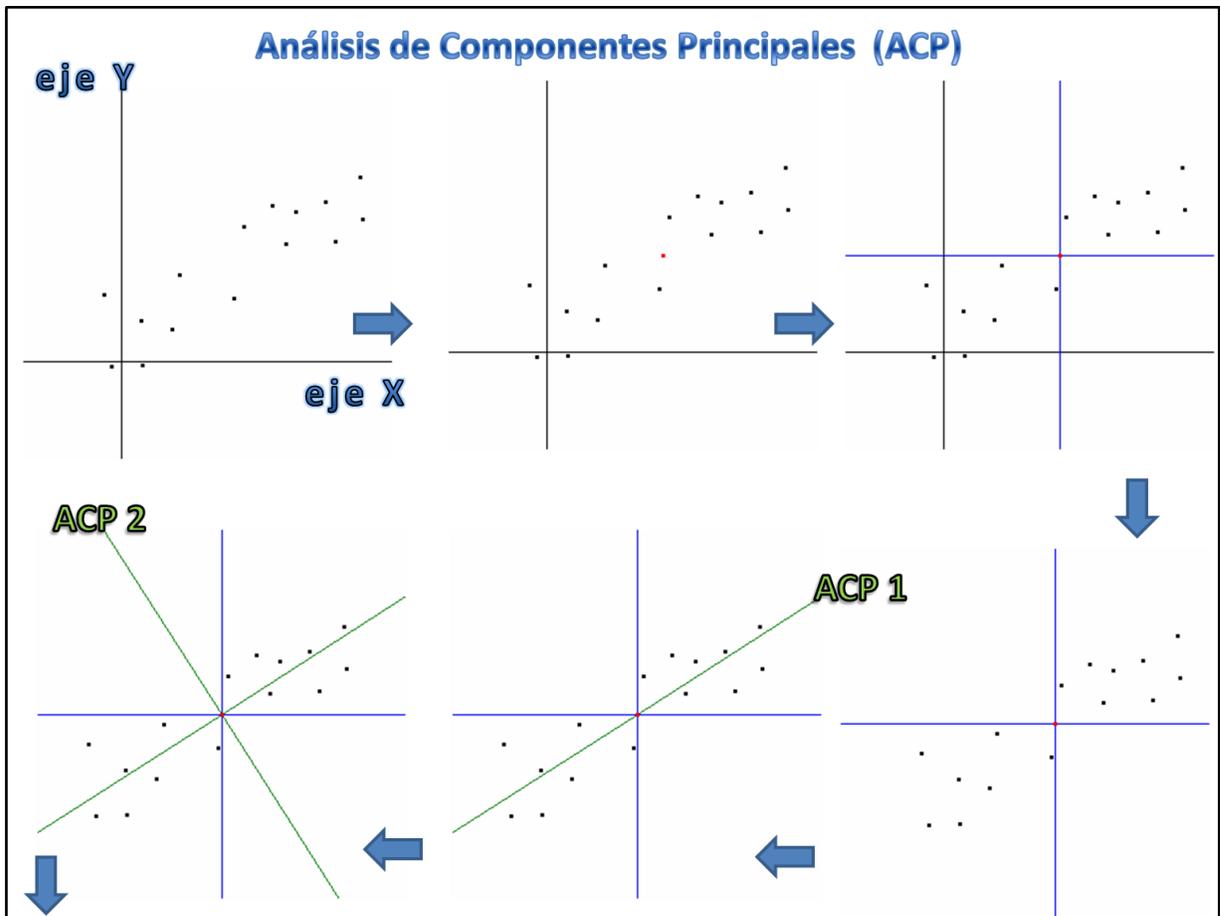
d) Interpretación de los factores

Para que un factor sea fácilmente interpretable debe tener las siguientes características, que son difíciles de conseguir:

- Los coeficientes factoriales deben ser próximos a 1.
- Una variable debe tener coeficientes elevados sólo con un factor.
- No deben existir factores con coeficientes similares.

e) Cálculo de las puntuaciones factoriales

Son las puntuaciones que tienen los componentes principales para cada caso, que nos permitirán su representación gráfica.



El gráfico de saturaciones (denominado gráfico de componentes en la salida del ordenador) permite realizar la representación gráfica de la matriz de componentes que se estén analizando.

XIV

Análisis de Componentes Principales (ACP)

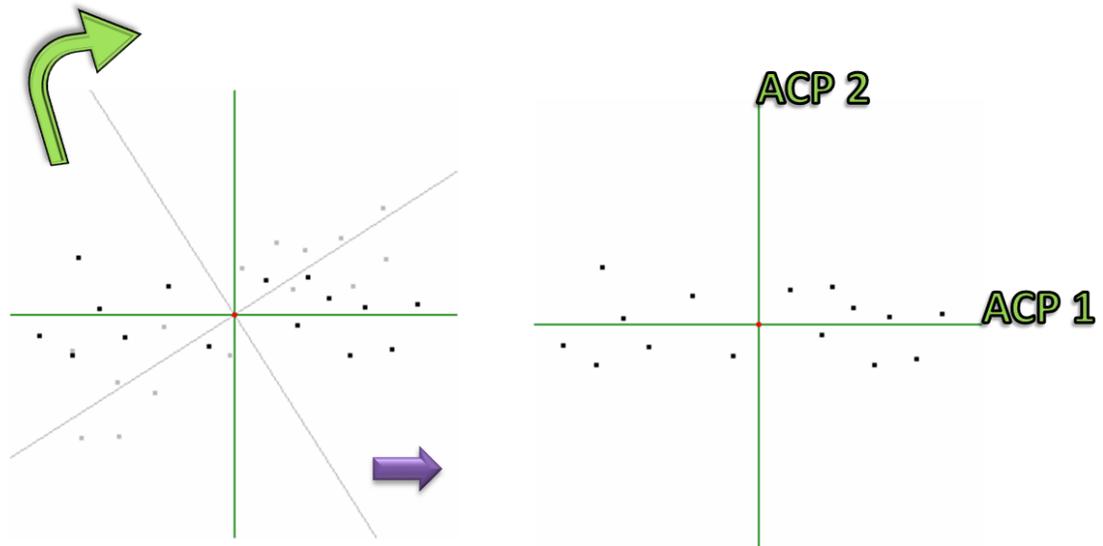


Tabla de valores de microdureza Vickers, carga de 25gf

Load 25 gf (0.025 kgf)										
Diagonal (μ m)	Vickers Hardness Number									
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
5	1854	1782	1714	1650	1590	1532	1478	1427	1378	1332
6	1288	1246	1206	1168	1132	1097	1064	1033	1002	974
7	946	919	894	870	846	824	802	782	762	743
8	724	706	689	673	657	642	627	612	599	585
9	572	560	548	536	525	514	503	493	483	473
10	464	454	446	437	429	420	413	405	397	390
11	383	376	369	363	357	350	344	339	333	327
12	322	317	311	306	301	297	292	287	283	279
13	274	270	266	262	258	254	251	247	243	240
14	236	233	230	227	224	220	217	214	212	209
15	206	203	201	198	195	193	190	188	186	183
16	181	179	177	174	172	170	168	166	164	162
17	160	159	157	155	153	151	150	148	146	145
18	143	141	140	138	137	135	134	133	131	130
19	128	127	126	124	123	122	121	119	118	117
20	116	115	114	112	111	110	109	108	107	106
21	105	104	103	102	101	100	99.3	98.4	97.5	96.6
22	95.8	94.9	94.0	93.2	92.4	91.6	90.7	89.9	89.2	88.4
23	87.6	86.9	86.1	85.4	84.6	83.9	83.2	82.5	81.8	81.1
24	80.5	79.8	79.1	78.5	77.9	77.2	76.6	76.0	75.4	74.8
25	74.2	73.6	73.0	72.4	71.8	71.3	70.7	70.2	69.6	69.1
26	68.6	68.0	67.5	67.0	66.5	66.0	65.5	65.0	64.5	64.1
27	63.6	63.1	62.6	62.2	61.7	61.3	60.8	60.4	60.0	59.5
28	59.1	58.7	58.3	57.9	57.5	57.1	56.7	56.3	55.9	55.5
29	55.1	54.7	54.4	54.0	53.6	53.3	52.9	52.5	52.2	51.8
30	51.5	51.2	50.8	50.5	50.2	49.8	49.5	49.2	48.9	48.5
31	48.2	47.9	47.6	47.3	47.0	46.7	46.4	46.1	45.8	45.5
32	45.3	45.0	44.7	44.4	44.2	43.9	43.6	43.3	43.1	42.8
33	42.6	42.3	42.1	41.8	41.5	41.3	41.1	40.8	40.6	40.3
34	40.1	39.9	39.6	39.4	39.2	38.9	38.7	38.5	38.3	38.1
35	37.8	37.6	37.4	37.2	37.0	36.8	36.6	36.4	36.2	36.0
36	35.8	35.6	35.4	35.2	35.0	34.8	34.6	34.4	34.2	34.0
37	33.9	33.7	33.5	33.3	33.1	33.0	32.8	32.6	32.4	32.3
38	32.1	31.9	31.8	31.6	31.4	31.3	31.1	30.9	30.8	30.6
39	30.5	30.3	30.2	30.0	29.9	29.7	29.6	29.4	29.3	29.1
40	29.0	28.8	28.7	28.5	28.4	28.3	28.1	28.0	27.8	27.7
41	27.6	27.4	27.3	27.2	27.0	26.9	26.8	26.7	26.5	26.4
42	26.3	26.2	26.0	25.9	25.8	25.7	25.5	25.4	25.3	25.2
43	25.1	25.0	24.8	24.7	24.6	24.5	24.4	24.3	24.2	24.1
44	23.9	23.8	23.7	23.6	23.5	23.4	23.3	23.2	23.1	23.0
45	22.9	22.8	22.7	22.6	22.5	22.4	22.3	22.2	22.1	22.0
46	21.9	21.8	21.7	21.6	21.5	21.4	21.3	21.3	21.2	21.1
47	21.0	20.9	20.8	20.7	20.6	20.5	20.5	20.4	20.3	20.2
48	20.1	20.0	20.0	19.9	19.8	19.7	19.6	19.5	19.5	19.4
49	19.3	19.2	19.1	19.1	19.0	18.9	18.8	18.8	18.7	18.6

Fuente Technical Manual of Matzuzawa Hardness Tester, Japan 1985.

XII. Trabajos presentados en eventos académicos.

Se presentaron los resultados más relevantes en los siguientes eventos académicos:

- Reunión Anual de la División Mexicana de la International Association for Dental Research (IADR) Acapulco, Guerrero, 2010.
- Primer Congreso de Alumnos de Posgrado con el proyecto académico” Mayo, 2011.
- Encuentro Académico de la División Mexicana de la International Association for Dental Research (IADR), Junio, 2011.
- XX International Material Research Congress. Cancún Quintana Roo, México, Agosto 2011.
- World Dental Federation (FDI) Annual World Dental Congress. Centro Banamex México D.F.
- Primer Congreso de Biomateriales Dentales