UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# Estudio in vitro de la difusión de algunas especies químicas en esmalte dental humano

**Gelen Patricia Bernett Zurita**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Odontología, Maestría en Odontología

Bogotá, Colombia

Diciembre- 2015

# Estudio in vitro de la difusión de algunas especies químicas en esmalte dental humano

**Gelen Patricia Bernett Zurita**

Tesis de maestría en investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
**Maestría en Odontología**

Director:
MSc. Edgar Delgado Mejía
Magister en Ciencias (Química)
Profesor Asociado Facultad de Ciencias

Codirectora:
PhD. Carolina Torres Rodríguez
Doctorado Investigación en Odontología
Profesora asociada Facultad de Odontología

Línea de Investigación:
Línea de investigación en Materiales Dentales.

Grupo de Investigación:
Grupo de Aplicación de Materiales a la Odontología (GRAMO) de la Universidad Nacional de Colombia.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Odontología, Maestría en Odontología
Bogotá, Colombia
Diciembre-2015

*A quien guía, acompaña y respalda mi vida, Dios. A quienes me impulsan a ser cada vez mejor, mi familia. A quienes alientan cada paso que emprendo, mis amigos. A quienes buscan ése algo más que dejar en los demás, mis maestros.*

# Agradecimientos

A mis directores de tesis, por su confianza en mí, excelente guía y trabajo conjunto.

A mis padres y hermanos, que estuvieron siempre con su amor, compañía y apoyo.

A mis familiares, por su atención y sus palabras de aliento.

A la Dra. Clementina Infante Contreras, quien trabaja arduamente por mejorar la formación académica e investigativa de sus estudiantes.

A mis profesores Martha Lucía Calle Ujueta, Luis Alberto López Pérez y Hannia Camargo Huertas, por sus pertinentes aportes, y valiosa e incondicional ayuda.

A mis compañeros, por sus distintas contribuciones durante todo este proceso.

# Resumen

La presente investigación exploratoria tuvo como propósito estudiar la difusión de algunas especies químicas en el esmalte dental humano sano (ES) y en esmalte dental con desmineralización inducida (EDI), en función de su tamaño, carga neta, polaridad y radios hidrodinámicos efectivos, mediante microscopía electrónica de barrido con análisis de energía dispersiva de rayos X (SEM-EDX). Previo consentimiento informado, se obtuvieron 65 terceros molares humanos sanos extraídos por indicación ortodóntica. Los dientes se repartieron aleatoriamente en tres grupos: Grupo 1 (G1) (n=30) esmalte sano (ES), Grupo 2 (G2) (n=30) esmalte dental con desmineralización inducida (EDI) y Grupo control (GC) (n=5). Se evaluó e implementó un método químico de desmineralización de esmalte dental con ácido láctico a pH 5,4. Se utilizó una solución indicadora, producida en la Universidad Nacional de Colombia, que actuó como fuente proveedora de iones de potasio ($K^{++}$), cloro ($Cl^{-}$), cadmio ($Cd^{++}$), bromo ($Br^{-}$), estroncio ($Sr^{++}$), yodo ($I^{-}$), a una concentración baja (C1) y a una concentración alta (C2), durante tres tiempos ($t_1$= 4 días, $t_2$= 8 días, $t_3$= 16 días), a 36.5 °C. Se analizó en cada espécimen, el porcentaje atómico de los iones a tres profundidades del esmalte tratado (S=50, M= 100, I= 150 micrómetros) por medio de microscopía SEM-EDX. Se realizó un análisis de medidas repetidas ajustando un modelo de regresión beta con el software R versión 3.0.2. En ES a C1, se encontró en promedio un 0.280% de $Br^{-}$, 0.615% de $Cl^{-}$, 0.150 % de $I^{-}$, 0.310% de $Sr^{++}$, 0.178 % de $K^{+}$ y 0.375**%** de $Cd^{++}$, y a C2 se encontró 0.430%, 0.695%, 0.188 %, 0.504%, 0.246%, 0.535, respectivamente. Con EDI, los promedios atómicos incrementaron tanto a C1 a 0.358% de $Br^{-}$, 0.621% de $Cl^{-}$, 0.189% de $I^{-}$, 0.426% $Sr^{++}$, 0.227% de $K^{++}$ y 0.669% $Cd^{++}$como a C2 a 0.408% $Br^{-}$, 0.690% $Cl^{-}$, 0.269% $I^{-}$, 0.455% $Sr^{++}$, 0.256% $K^{++}$ y 0.513% $Cd^{++}$. La difusión de $Cd^{++}$ fue la mayor entre los cationes y la difusión de $Cl^{-}$ fue la mayor entre los aniones estudiados, en ambos casos por tener los radios iónicos menores. El tiempo de exposición y la profundidad no fueron significativos. El transporte de masa en esmalte dental humano parece depender de un mecanismo complejo y que procede más rápido de lo esperado para la difusión pura, siendo influenciado por factores como el grado de mineralización de la estructura del esmalte, la concentración, los radios iónicos y la polaridad de los componentes de la solución iónica.

**Palabras clave: difusión, iones, desmineralización dental, permeabilidad del esmalte dental.**

# Abstract

This work is an exploratory study of the diffusion of some chemical species in human sound dental enamel (SDE) and artificially demineralized dental enamel (DDE). Diffusion was analyzed as a function of species size, electrical polarity, net electrical charge and hydrodynamic radii. With previous consent, 65 sound third molars extracted by orthodontic indication were collected and randomly divided into three groups: G1 (n=30) SDE; G2 (n=30) DDE and control group (CG) (n=5). A quick chemical demineralizing method for SDE with racemic lactic acid (pH=5.4) was set up and evaluated. Solutions containing indicator diffusing ions (Cl-, Br-, I-, K+, Sr++, Cd++) were designed and prepared at two concentrations (low=C1, high=C2), exposure was done at three times ($t_1$=4, $t_2$= 8 and $t_3$= 16 days) at 36.5 °C. The atomic percentage for each ion at three depths in enamel (s= 50, m= 100 and i=150 µm) was determined by means of a scanning electron microscope fitted with a dispersive X- ray analyzer (SEM-EDAX). The statistical analysis was performed using repeated measurements adjusting a beta regression model with software R versión3.0.2. In SDE average ion contents found at C1 were: 0.280% $Br^-$, 0.615% $Cl^-$, 0.150% $I^-$, 0.310% $Sr^{++}$, 0.178% $K^+$ and 0.375**%** de $Cd^{++}$. At C2 average contents were 0.430%, 0.695%, 0.188 %, 0.504%, 0.246%, 0.535, respectively. With DDE average contents increased at C1 to: 0.358% $Br^-$, 0.621% $Cl^-$, 0.189% $I^-$, 0.426% $Sr^{++}$, 0.227% $K^{++}$ and 0.669% $Cd^{++}$, and also at C2 to the following values: 0.408% $Br^-$, 0.690% $Cl^-$, 0.269% $I^-$, 0.455% $Sr^{++}$, 0.256% $K^{++}$ and 0.513% $Cd^{++}$. Diffusion of $Cd^{++}$ and $Cl^-$ was larger due to their ionic radii being the smallest. Exposure time and depth showed no statistical significance. Mass transport in human dental enamel seems to depend on a complex mechanism and to proceed faster than expected for pure diffusion being influenced by factors such as degree of mineralization of enamel, concentration, ionic radii and component polarity of the ionic solutions.



**Keywords: diffusion, ions, dental enamel, tooth demineralization, dental enamel permeability.**

# Contenido

Pág.
**Resumen……..XIII**
**Abstract……..XV**

**Lista de figuras……XX**

**Lista de tablas……..XXIII**

**Lista de imágenes……...XXVI**

**Lista de gráficas……..XXIX**

**Introducción……1**

**1. Esmalte dental…….....5**

1.1 Formación…….....5

1.2 Composición…..……..……...7

1.2.1 Componente inorgánico……...……...7

1.2.2 Componente orgánico……..…….…….....8

1.3 Estructura……..……..…….....9

1.3.1 Topografía del esmalte dental…….....…….10

**2. Desmineralización dental……16**

2.1 Definición ……..16

2.2 Desmineralización dental poseruptiva……..……..……17

2.2.1 Caries dental…….....17

2.2.2 Erosión…….…….19

2.2.3 Tratamientos dentales…….....20

**3. Transporte de masa……...……...**22

3.1 Definición……..…….....22

3.2 Difusión…….……23

3.3 Leyes de Fick…….....25

3.3.1 Primera de Ley de Fick: Difusión en estado estacionario – difusión molecular…….....26

3.3.2 Segunda Ley de Fick: Difusión en estado no estacionario…….....28

**3.4 Conductividad electrolítica……..28**

3.4.1 Tipos de conductores……....29

3.4.2 Mecanismo de conducción electrolítica……...29

3.4.3 Interacción de los iones con el disolvente……...30

3.4.4 Número de transporte iónico…….....30

**4. Microscopías …….....32**

4.1 Estereomicroscopio……32
4.2 Microscopía óptica de luz polarizada……33

4.2.1 Principio……....34

**4.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)……..35**

4.3.1 Microscopía electrónica de barrido con análisis de espectroscopía de dispersión de rayos X (SEM- EDX)……38

**5.Objetivos…….....42**

5.1 Objetivo general……..……..42

5.2 Objetivos específicos……...42

**6. Hipótesis……43**

**7. Metodología……..44**

7.1. Tipo de investigación……44

7.2 Población……44

7.2.1 Unidades experimentales……..……..……44

7.2.2 Criterios de inclusión……44

7.2.3 Criterios de exclusión……..……44

7.2.4 Muestra……..……...45

7.3 Materiales y métodos……45

7.3.1 Obtención de la muestra……45

7.3.2 Almacenamiento de la muestra……..……..45

7.3.3 Fase de preparación de la muestra ……..……46

7.3.4 Tratamiento de la muestra…..……..……..58

7.4 Análisis estadístico de fase de tratamiento……..……..61

7.4.1 Variables……....63

**8. Resultados y discusión……...……...64**

8.1 Preparación de muestras……64

8.1.1 Método de desmineralización en esmalte dental humano…….……64

8.2 Tratamiento……....72

8.2.1 Prueba de Hipótesis……..76

8.2.2. Análisis de difusión……..78

**9. Conclusiones……83**

**10. Recomendaciones……..84**

**11. Aplicaciones clínicas……85**

**Anexo A: Consentimiento informado ……..…….....86**

**Anexo B: Cartilla informativa ……..……..87**

**Anexo C: Hoja de registro de actividades …..……..……..88**

**Anexo D: Registro clínico de dientes donados…….....89**

**Anexo E: Perfiles de promedio de porcentaje atómico por elemento según tiempo de tratamiento y estado del esmalte. Concentración 1…….....90**

**Anexo F: Perfiles de promedio de porcentaje atómico por elemento según tiempo de tratamiento y estado del esmalte. Concentración 2……91**

**Referencias bibliográficas……92**

# Lista de figuras

Pág.
**Figura 1.1:** Etapas de la formación del esmalte ..... 6

**Figura 1.2:** Estructura estequiométrica de hidroxiapatita ……..……7

**Figura 1.3:** Arreglo jerárquico de la estructura del esmalte dental …….....9

**Figura 1.4:** Prismas y espacio interprismático……...10

**Figura 4.1:** Filtros polarizadores de microscopio óptico de luz polarizada……..34

**Figura 4.2:** Tipos de Electrones producidos por interacción del haz incidente con una muestra……..……36

**Figura 4.3:** Componentes de la óptica del microscopio de barrido……..37

**Figura.4.4:** Mecanismo de acción de EDX……..……..41

# Lista de tablas

Pág.

**Tabla 7.1:** Disrtribución de la muestra de desmineralización ..... 51

**Tabla 7.2:** Categorías respuesta visual…….53

**Tabla 7.3:** Categoría respuesta radiográfica……54

**Tabla 7.4:** Categoría respuesta histológica……56

**Tabla 7.5:** Distribución de tratamientos de difusión……..58

**Tabla 7.6:** Ejemplo organización de datos para análisis estadístico……...61

**Tabla 7.7:** Variables de difusión……63

**Tabla 8.1:** Cambios visuales pH 2.4 y pH 5.4…….....65

**Tabla 8.2:** Comparación radiográfica en tratamientos con ácido pH 2,4 y 5,4……...66

**Tabla 8.3:** Análisis con software de imágenes……67

**Tabla 8.4:** Resultados cuantificación densidad de grises……68

**Tabla 8.5:** Resultados con microscopía óptica con luz polarizada……69

**Tabla 8.6:** Resultados de categorización de resultados ordinales……..…70

**Tabla 8.7:** Resultado índice de incidencia……..71

**Tabla 8.8:** Análisis de varianza de desmineralización……...71

**Tabla 8.9:** Prueba de hipótesis de difusión……76

**Tabla 8.10:** Promedio de porcentaje atómico de K+ vs Cd++ en ES……..…78

**Tabla 8.11:** Promedio de porcentaje atómico de K+ vs Sr++ en ES……..…….....78

**Tabla 8.12:** Promedio de porcentaje atómico de K+ vs Cd++ en EDI……...78

**Tabla 8.13:** Promedio de porcentaje atómico de K+ vs Sr++ en EDI……..……79

**Tabla 8.14:** Promedio de porcentaje atómico de aniones en ES……79

**Tabla 8.15:** Promedio de porcentaje atómico de aniones en EDI…….....79

**Tabla 8.16:** Promedio de porcentaje atómico de cationes en ES……..80

**Tabla 8.17:** Promedio de porcentaje atómico de cationes EDI……80

**Tabla 8.18:** Promedio de porcentaje atómico de los iones distribuidos según su polaridad y radio atómico en ES……..81

**Tabla 8.19:** Promedio de porcentaje atómico de los iones distribuidos según su polaridad y radio atómico en EDI……....81

**Tabla 8.20** Radios hidrodinámicos efectivos e iónicos de los elementos de la solución indicadora……82

# Lista de imágenes

**Imagen 1.1:** Porosidad superficial de esmalte dental……..…..11

**Imagen 1.2:** Estrías de Retzius……..13

**Imagen 1.3:** Penachos de Linderer……13

**Imagen 1.4:** Bandas de Hunter-Schreger……14

**Imagen 1.5**: Lamelas del esmalte……..14

**Imagen 1.6:** Periquematíes……15

**Imagen 2.1:** Erosión del esmalte……...19

**Imagen 4.1:** Estereomicroscopio……32

**Imagen 4.2:** Microscopio óptico de luz polarizada……..33

**Imagen 4.3:** Resultado del análisis cuantitativo por medio de SEM-EDX……40

**Imagen 7.1**: Materiales de aislamiento y creación de ventanas……47

**Imagen 7.2:** Tinción con azul de metileno en espécimen……..48

**Imagen 7.3:** Estereomicroscopía papel Contact……..49

**Imagen 7.4:** Estereomicroscopía cinta eléctrica de vinilo (Temflex ™- 3M)……..…..49

**Imagen 7.5:** Estereomicroscopía pvc negro (Tesa ®)……..…49

**Imagen 7.6:** Método de aislamiento……..50

**Imagen 7.7:** Almacenamiento de muestras en solución desmineralizante……51

**Imagen 7.8:** Tratamiento con solución desmineralizante……...52

**Imagen 7.9:** Condiciones de toma de radiografía periapical……53

**Imagen 7.10**: Representación de software para análisis digital de imágenes……55

**Imagen 7.11:** Montaje de secciones dentales…….....56

**Imagen 7.12**: Método de sellado reversible…….....57

**Imagen 7.13:** Análisis de SEM-EDX……60

# Lista de gráficas

**Gráfica 4.1**. Formación de rayos X……39
**Gráfica 4.2** Resultado del análisis cualitativo (espectro) por medio de SEM-EDX……40
**Grafica 8.1:** Perfiles de promedio de porcentaje atómico por elemento según concentración de solución indicadora y estado de mineralización del esmalte, con promedio de los tres tiempos……...……74

# Introducción

El esmalte dental es una de las estructuras más mineralizadas del cuerpo humano, con propiedades y comportamiento particulares. Está ubicado alrededor de la parte clínica de los órganos dentales, actuando como una barrera semipermeable al medio oral permitiendo tanto una interacción y comunicación del diente con su medio, como también protección mecánica y química a éste (1,2).

En cumplimiento de estas funciones, se expone a múltiples situaciones biológicas, patológicas y terapéuticas que generan deterioro en su estructura, sumado a los defectos que pueden resultaren la etapa preeruptiva (3). Ante esto, el esmalte cuenta con un mecanismo de ganancia de minerales gracias a la ubicación en un medio termodinámicamente supersaturado de dichas sustancias; sin embargo, esta respuesta se limita en situaciones que comprometan altamente su integridad, pues su característica acelular lo hace una sustancia incapaz de autorepararse o autoregenerarse (1).

Es así como se hace pertinente conocer los procesos físico-químicos que ocurren en el esmalte dental en situaciones fisiológicas y en condiciones patológicas, con el fin de otorgarle condiciones necesarias para su reparación por medio de materiales a base de sustancias minerales propias del esmalte tales como calcio y fosfato. Estos esfuerzos se han reflejado en la implementación de tratamientos como terapia con flúor (4,5,6,7,8) y sustancias remineralizantes como fosfatos de calcio amorfo (9,10).

Para diseñar estrategias eficaces, es necesario conocer cómo es la dinámica superficial de los iones en el esmalte dental. Pero la información reportada en la literatura es escasa, limitada, poco clara y desactualizada, por ejemplo artículos asociados con coeficientes de difusión de agua en restauraciones dentales (11), o de partículas de glucosa e iones de sodio como lo expresa Hardwick  en 1959 (12).

Basado en lo anterior, es pertinente estudiar cómo es la difusión de algunas especies químicas en el esmalte dental humano, que contribuyan a controlar procesos en la estructura dental.

# 1. Esmalte dental

Es una biocerámica nanocompuesta de origen epitelial (13) ubicada en la superficie externa coronal de los órganos dentarios. Constituye la estructura más mineralizada del cuerpo humano dado por su alto contenido inorgánico, que le permite actuar como estructura protectora física y química (14,15), además se comporta como una membrana semipermeable no homogénea permitiendo una comunicación selectiva del diente con el medio en el que se encuentra (16).

## 1.1 Formación

Un esmalte maduro mineralizado es el reflejo de la actividad genética y perfiles de expresión proteicos derivados de las células ectodérmicas formadoras (ameloblastos) lo que se conoce como amelogénesis, la cual se acompaña de una serie de intercambios bioquímicos denominado biomineralización (17).

En la odontogénesis, como en la mayoría de procesos morfogenéticos, las interacciones entre los grupos de células epiteliales y mesenquimales son fundamentales y guardan una reciprocidad durante todo el desarrollo dental (18). Se inician por la migración de células de la cresta neural, que inducen un engrosamiento del epitelio estomodeal formando la lámina dental, y por una serie de interacciones inductivas, las células mesenquimales quedan rodeadas por capas epiteliales en la medida que el primordio dental transcurre a través de los estadíos de brote, casquete y campana. Las capas epiteliales, llamadas en conjunto el órgano del esmalte, actúan a través de cinco etapas para producir el esmalte dental (Figura 1.1) (19).

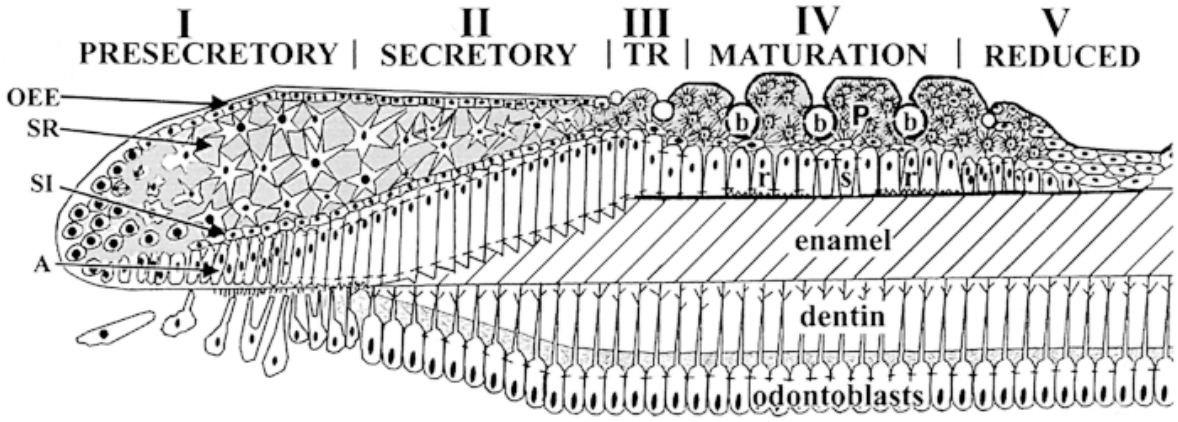



**Figura 1. 1** Etapas de la formación del esmalte. A, capa de ameloblastos. SI, estrato intermedio; SR, retículo estrellado; OEE, epitelio eterno del esmalte; b, vasos sanguíneos; P, células papilares; r and s, ameloblastos acortados. Tomada de *Sorkin, et al.2000 (19).*

Etapa 1 o presecretora, el epitelio interno del esmalte se compone de ameloblastos alargados, diferenciados y con mecanismos para la síntesis de proteínas y secreción de matriz orgánica. En la etapa 2 o secretora, los ameloblastos depositan las proteínas que se someten a auto-ensamblaje para formar la matriz del esmalte extracelular orgánico, o andamio, que controla la iniciación, tasa de crecimiento y la disposición de los cristales de hidroxiapatita carbonatada. Los ameloblastos y odontoblastos (células formadoras de dentina) que están alineados cara a cara, migran en dirección al tejido en formación, es así como los odontoblastos se dirigen lejos de la unión amelodentinal hacia la futura pulpa, mientras que los ameloblastos migran hacia el exterior hacia la superficie del diente en formación, adquiriendo un grupo de barras terminales basales y apicales, como un proceso apical especializado, llamado el proceso de Tomes. Después de la deposición del espesor total de esmalte en la Etapa III, la etapa de transición (TR), los ameloblastos columnares se acortan mientras que las otras células del órgano del esmalte (el estrato intermedio, retículo estrellado y el epitelio del esmalte exterior) alteran su morfología y se convierten en células papilares. En la etapa IV, la etapa de maduración, se eliminan las proteínas del esmalte y el agua, para iniciar con el proceso de biomineralización reemplazando dicho contenido orgánico por fosfatos de calcio. Consecuentemente, a pesar de que su origen embrionario es proteico, el esmalte maduro termina siendo esencialmente una capa de compuesto biocerámico (14-19).

# 1.2 Composición

Siendo una estructura acelular, el esmalte está constituido en un 80-90% de su volumen por componente inorgánico, representado en cristales de hidroxiapatita carbonatada de calcio. El restante 10-20% lo constituye material orgánico y agua (20).
La distribución de la composición no es homogénea, ya que la proporción del contenido mineral va disminuyendo hacia el interior del esmalte, siendo el contenido de agua y proteínas mayor hacia la zona de la unión amelodentinal (15).

## 1.2.1 Componente inorgánico

La fórmula estequiométrica de la hidroxiapatita es Ca10(PO4)6(OH)2 (21,22), representada con una estructura hexagonal compacta, en la que el ion hidroxilo se encuentra encerrado en un triángulo de iones de calcio, que a su vez está rodeado por otro triangulo de iones fosfatos rotado 60° fuera de fase. Estos triángulos están finalmente ubicados, dentro de un hexágono de iones calcio (Figura1.2) (23).

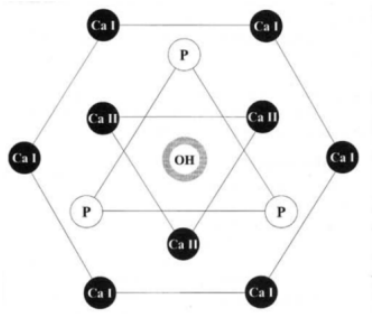



**Figura.1.2** Estructura estequiométrica de hidroxiapatita.

Esta estructura, tanto en esmalte como en otros tejidos duros, presenta múltiples variaciones asociadas a defectos por vacancias de iones sobretodo de calcio e hidroxilo y a sustituciones por iones carbonato, fluoruro, sodio, magnesio, las que influyen en el comportamiento de la apatita. Es así como la adición de ion fluoruro, por ejemplo, hace que los triángulos de calcio sean atraídos al centro de la estructura, disminuyendo la energía de la red y estabilizando la estructura, reflejándose en la reducción del Kps

formando cristales más difíciles de disolver (16). En el caso de reemplazo por iones de carbonato y magnesio, sucede lo contrario ya que se observa un Kps aumentado, expresado en una apatita más inestable y más soluble en medio ácido, debido a la falta de acomodación de estos iones en la red estructural (15).

Adicionalmente, la presencia de estas sustituciones no es homogénea, los iones fluoruro en esmalte se encuentra en mayor proporción hacia la superficie, cayendo notoriamente hacia el interior de la estructura. Esto ocurre probablemente porque durante la amelogénesis, el flúor proveniente del medio se deposita en la superficie, ocasionando la formación de un mineral poco permeable que restringe el paso de más iones hacia el interior. Contrariamente ocurre con el carbonato y el magnesio, que se pueden depositar en la apatita en formación, haciendo que su distribución, respectivamente, aumente en un 2% y 0.2% en la superficie, y en un 4-6% y 0.5% en zonas más cercanas a la dentina. Aunque en algunas regiones, como las fisuras de los molares también se pueden encontrar altas concentraciones de ión carbonato (15).

### 1.2.2 Componente orgánico

A pesar de ser muy bajas las concentraciones, existe un componente orgánico formado por péptidos muy pequeños y aminoácidos, que representan la matriz original del desarrollo, pero que en esmalte maduro cumplen un papel de matriz para los cristales de hidroxiapatita (14).

Este componente orgánico, asciende sólo de 0,5 a 1% en peso. Sin embargo, estos restos mínimos de proteína pueden actuar como un agente plastificante, lo que permite cierto deslizamiento entre los prismas del esmalte, para aliviar las tensiones y proporcionar un poco de endurecimiento (24). También se ha demostrado que cumple un papel importante en las vías de difusión interprismática, por lo que es de suma importancia en los estudios de sorción y de difusión (14).

## 1.3 Estructura

La estructura del esmalte dental es el reflejo de los procesos de amelogénesis y biomineralización, exhibiendo una organización jerárquica y compleja como lo demostró F.-Z. Cui y J. Ge. (Figura 1.3) quienes a partir de sus análisis con HRTEM, SEM y AFM identificaron 7 niveles de ensamblaje de la estructura adamantina desde una escala nanométrica hasta llegar a una milimétrica (25):

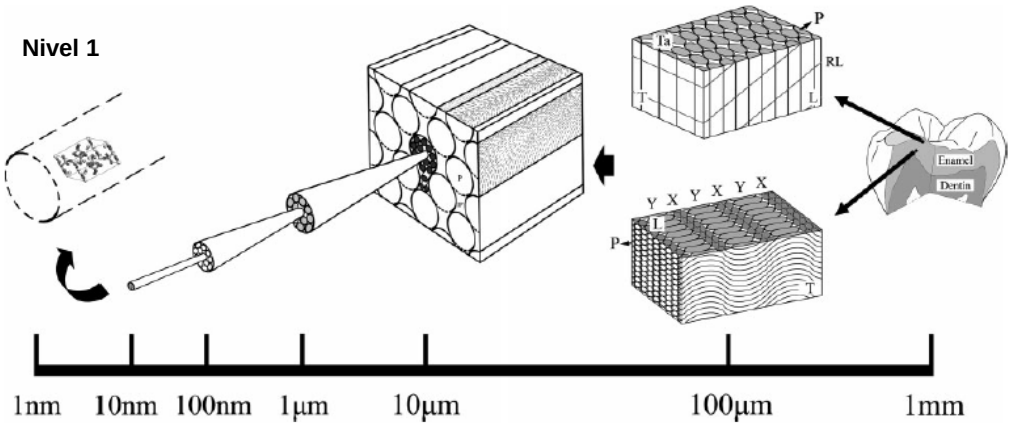



**Figura 1.3** Arreglo jerárquico de la estructura del esmalte dental (25).

La unidad estructural más pequeñas es el cristal de hidroxiapatita hexagonal, con una anchura media de 68 nm, el espesor de 26 nm y con una longitud hasta de 1mm (nivel 1). Siguiendo en la escala nanométrica, los cristales se agrupan dentro de la matriz cilíndrica secretada por los ameloblastos en nanofibras, las cuales a su vez se agrupan constituyendo las fibrillas y por último las fibras (Nivel 2-4). Un grupo de fibras con otro se ensamblan para conformar los prismas (nivel 5). En la microescala, los prismas se reúnen en bandas de prisma (nivel 6), que presentan diferentes arreglos en todo el espesor de la capa de esmalte (Nivel 7) para satisfacer las necesidades mecánicas y físicas de esmalte en el medio oral (25).

Los cristales de hidroxiapatita se acomodan paralelos a los ejes longitudinales de los prismas, cambiando un poco esta orientación hacia la periferia aproximadamente a 45° de cada prisma en donde se exhibe un mayor espacio intercristalino (18,26). Aunque dichos espacios no están vacíos, ya que están ocupados por agua (11% en volumen) y

material orgánico (2% en volumen) (Figura 1.4) (24,27), a demás pueden ser zonas importantes de intercambio de minerales y demás sustancias con el medio, como también zonas de vulnerabilidad para entrada de agentes agresores (28).

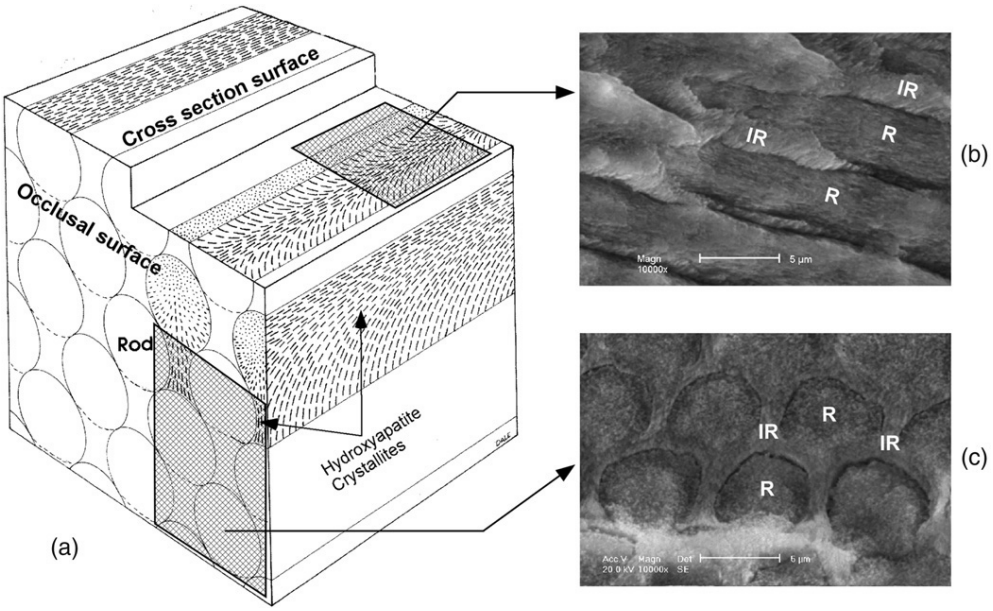



**Figura 1.4** Prismas y espacio interprismático**.** (a) Ilustración esquemática de la estructura jerárquica de esmalte. (b) y (c) imágenes de SEM de diferentes caras. R, prima; IR, espacio interprismático. Tomado de Li Hong He, Michael V. Swain (24).

Es así como también la densidad de los cristales y por ende la de los primas, está relacionada con el contenido mineral del esmalte, puesto que a medida que se va aproximando a la dentina se observa una disminución de la densidad cristalina, y un aumento de la porosidad, del material orgánico y del fluido. Aunque en algunas zonas específicas las disposición de los cristales, la porosidad y el contenido proteico es mucho más compleja, lo que sí es más probable es que el aumento en el contenido de proteínas y la baja mineralización, es indicativo de mayor porosidad, asociado con un pobre empaquetamiento de los primas (25).

## 1.3.1 Topografía del esmalte

Existen otras entidades que aportan características importantes en la estructura del esmalte dental y que se relacionan con la disposición prismática. Son de gran interés

debido a su intervención en procesos de intercambio con el medio oral asociados con su forma, dirección y contenido.

- **Poros**

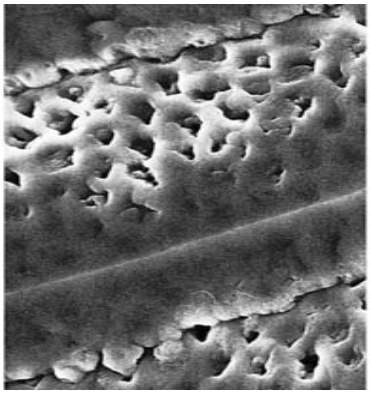


**Imagen 1.1**. Porosidad superficial de esmalte dental. Microfotografía SEM. Tomada de Thylstrup A, Fejerskov O, 1994 (24).

Los resultados obtenidos con la microscopía óptica de luz polarizada sugieren que el esmalte se comporta como un tamiz molecular debido a la presencia de poros extremadamente pequeños (Imagen 1.1) (19). Las funciones de distribución de volumen de poros muestran un sistema bimodal de poros con radios hidráulicos más pequeños (0,7 y 1,3 nm) para el esmalte canino que para el esmalte de molares e incisivos (1,0 y 2,5 nm) (29).

La distribución y la densidad de porosidad del esmalte están asociadas con los tres niveles de perfección de empaquetamiento de los cristales de hidroxiapatita: cuerpo del prisma, cola del prisma, zona de unión prismática (30).

- El cuerpo del prisma, presenta el empaquetamiento de cristales más cerrado, con una orientación esencialmente paralela entre cada cristal y con respecto al eje del prisma. Adicionalmente, los espacios intercristalinos son reducidos por la interdigitación de los perfiles irregulares cristalinos. Sin embargo, poros con sección transversal poligonal aparecen con diámetros de 1- 10 nm, como resultado de la

desorientación de algunos cristales en el eje a. Estos poros se extienden por alguna distancia en tres dimensiones en forma de diminutos túbulos (29).

- En la cola de los primas, los cristales se separan desde el eje prismático alrededor de unos 15° - 45° en dirección cervical. Adicionalmente se separan lateralmente, donde se reparten hacia el cuerpo de otro prisma. Esta separación en la orientación de los cristales, causa un aumento en la porosidad (29).
- Zona de límites o uniones de prisma, es una zona en donde el cuerpo de un prisma se encuentra con la cola de otro, ocurriendo un cambio drástico en la orientación de los cristales, ocasionando un incremento considerable en la porosidad. En el esmalte humano, las uniones prismáticas son incompletas en su mayoría en sentido transversal y forman poros laminares, que se extienden desde la unión amelodentinal hasta la superficie externa. Aunque en la superficie del esmalte, estos sistemas de poros existen de forma independiente y separada, hacia el interior se interconectan formando una red tridimensional de poros laminares, especialmente en los molares (29).

Es por esto que en regiones donde el esmalte presenta una gran porosidad, como por ejemplo en la zona cervical de las coronas dentales y en casos de hipomineralización, son relacionadas con una inadecuada estructura prismática (29).

- **Estructuras secundarias**

Son el resultado del diferente grado de mineralización de la estructura (31,32).

- Estrías de Retzius: corresponden a líneas de crecimiento incremental, se ven como serie de bandas oscuras y en corte transversal se ven como anillos concéntricos, y se caracteriza por ser una zona con baja densidad cristalina (Imagen 1.2).

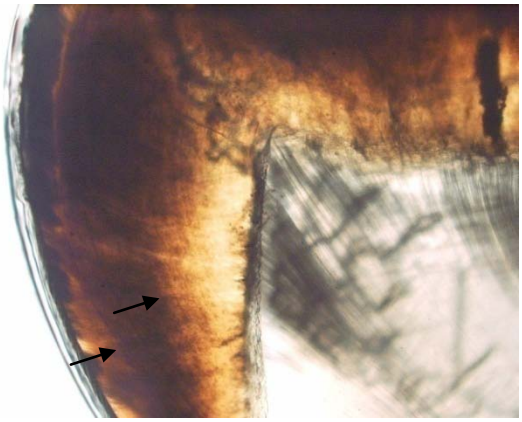


**Imagen 1.2** Estrías de Retzius**.** Microfotografía original de luz transmitida 4x (Bernett, 2014)

- Penachos de Linderer: prismas de esmalte hipocalcificados, que se ubican desde la UAD (unión amelodentinal) hasta una tercera parte del espesor del esmalte dental (Imagen 1.3).

**Imagen 1.3.** Penachos de Linderer. Microfotografía original de luz transmitida 4x esmalte sano (Bernett, 2014)

- Bandas de Hunter-Schreger: son bandas oscuras (diazonas) y claras (parazonas) que se observan en el esmalte dental luego de un corte transversal. Esto se ve así porque los prismas tienen oblicuidades; cuando el desgaste corta al prisma longitudinalmente, refleja más la luz y se ve más claro; cuando el mismo desgaste lo toma en forma transversal se ve más oscura porque refleja menos la luz (Imagen 1.4).

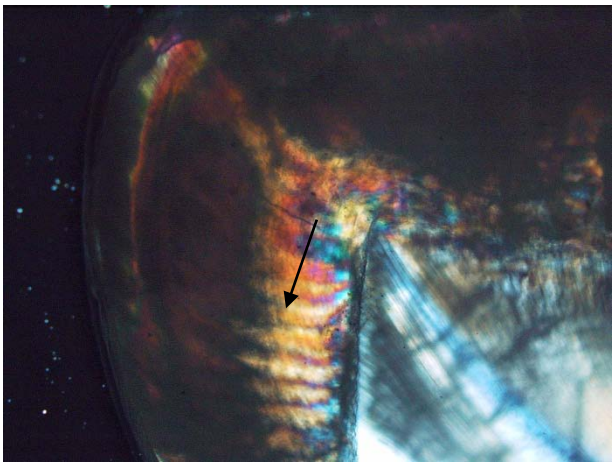


**Imagen 1.4**. Bandas de Hunter-Schreger. Microfotografía original de luz polarizada 4x esmalte sano (Bernett, 2014)

- Lamelas del esmalte: haces de sustancia orgánica extendida desde la superficie del esmalte hacia la Conexión Amelodentinaria (31) y están agrupadas más densamente en la superficie interproximal que en otras superficies (Imagen 1.5)

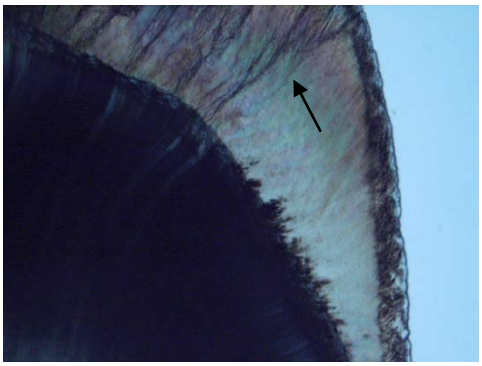
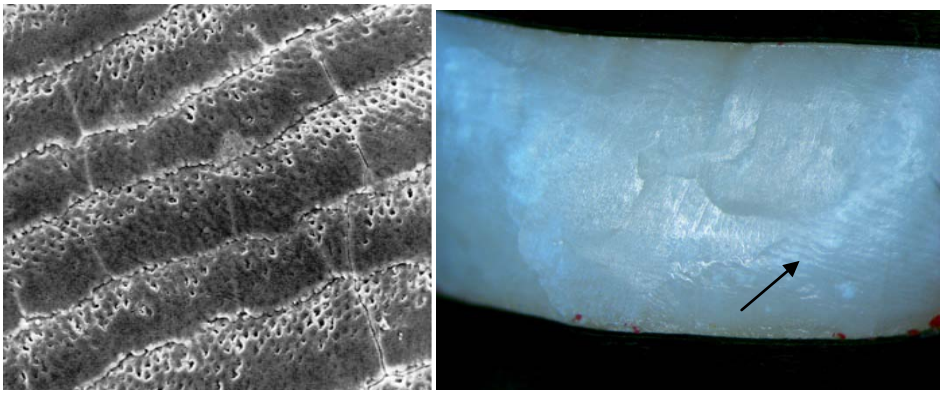


**Imagen 1.5** Lamelas del esmalte. Microfotografía original de luz transmitida 4x (Bernett, 2014).

- Periquematíes: son manifestaciones superficiales de las estrías de Retzius, que se hacen más evidentes en dientes recién erupcionados (33,34) (Imagen 1.6).



**a** **b**

**Imagen 1.6.** Periquematíes**.** a. Microfotografía SEM (Tomada de Thylstrup A, Fejerskov O); b. Imagen original con estereomicroscopio a 20x (Bernett, 2014)

- Fisuras y fosas del esmalte: invaginaciones de morfología y profundidad variable que corresponden a zonas de hipomineralización (32).

# 2. Desmineralización dental

Como se mencionó la composición del esmalte dental está compuesto en gran parte por contenido mineral, representado por cristales de hidroxiapatita biológica que establece una interacción constante con el medio oral por medio de procesos continuos de desmineralización- remineralización, con el fin de mantener condiciones equilibradas que preserven la estructura en general (35).

## 2.1 Definición

Es la pérdida de minerales o porción inorgánica de una estructura. En el caso de la hidroxiapatita dental, siendo un mineral cristalino organizado de iones de calcio ($Ca^{+2}$), iones fosfato ($PO_4^{-3}$) e iones hidroxilo ($OH^-$) en una relación estequiométrica 10:6:2 unidos entre sí por medio de enlaces iónicos, al estar en contacto en un medio acuoso como la saliva ocurre disolución de los cristales debido a la alta constante dieléctrica del agua. Pero cuando la concentración de $Ca^{+2}$, $PO_4^{-3}$ e iones hidroxilo $OH^-$ sube en la solución, la disolución de hidroxiapatita disminuye hasta detenerse en la medida que la solución se satura (27,35).

Sin embargo, este proceso es dependiente y altamente influenciado por las fluctuaciones de pH como las ocurridas durante la ingesta de alimentos, sobretodo de carbohidratos, que al metabolizarse en la placa dental forman ácidos que reaccionan en la superficie del esmalte y alteran la estructura cristalina de la hidroxiapatita, pero a su vez tornándola más susceptible a ser remineralizada, lo cual se logra siempre y cuando la producción de dichos ácidos se detenga y el pH suba permitiendo una reincorporación de los iones a la estructura (36).

Cuando el ácido remueve una cantidad tal de cristales que ocasiona el colapso de la matriz de proteína estructural, la desmineralización se torna irreversible, ocurriendo lo siguiente:

$$
\begin{array}{l}
Ca_5(PO_4)_3OH \leftrightarrow 5Ca^{2+} + 3PO_4^{3-} + OH^- \\
\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad \downarrow H^+ \quad \downarrow H^+ \\
\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad HPO_4^{2-} \quad H_2O \\
\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad \downarrow H^+ \\
\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad H_2PO_4^{2-}
\end{array}
$$

Los $PO_4^{-3}$ y los iones $OH^-$ se combinan con $H^+$ para formar $HPO_4^{-2}$ y $H_2O$, respectivamente, eliminando de este modo una proporción de iones $PO_4^{-3}$ y de iones $OH^-$ de la solución volviéndola insaturada, es así como la fuerza impulsora para la disolución es el grado de insaturación (1,27,36).

## 2.2. Desmineralización dental poseruptiva:

Posterior a la erupción dental, existes tres formas de disolución de minerales: caries, erosión y algunos tratamientos dentales como grabado ácido previo restauraciones adhesivas y procedimientos de aclaramiento dental.

### 2.2.1 Caries dental

Se considera como un proceso dinámico, patológico, complejo de origen bacteriano que afecta a las estructuras duras dentarias. Este mecanismo se lleva a cabo por la pérdida de minerales que se origina por el constante ataque de ácidos producidos por las bacterias, quienes fermentan los hidratos de carbono para producir ácidos como el ácido láctico, fórmico, acético y propiónico (27). Estos ácidos se difunden a través de la placa y dentro del esmalte o de la dentina, si estuviera expuesta, con producción de iones hidrógeno que disuelven la porción mineral en iones calcio, fosfato y producción de agua

(desmineralización). Las lesiones cariosas están íntimamente relacionadas con sitios retentivos de placa bacteriana como tercio cervicales, superficies interproximales, caras oclusales y superficies dentales con restauraciones dentales y aparatología ortodóntica (37).

La detección histológica de caries indica que la pérdida de material mineral inicia en la periferia de los primas, asociándolo a la mayor accesibilidad o mayor solubilidad en esta zona (fase separada mineral o los cristales superficiales). También se cree que en la zona de inicio de desmineralización, existe un empaquetamiento menos fuerte de los cristales, permitiendo una difusión fácil de ácidos, iones y protones. La disolución subsecuente es dirigida por las estrías cruzadas, finalizando en la disolución de los cuerpos del prisma (38,39).

Del gran número de bacterias que se encuentran en la cavidad bucal, los microorganismos pertenecientes al género estreptococo, básicamente las especies *mutans*(con sus serotipos c, e y f, *sanguis*, *sobrinusycricetus*), han sido asociados con la caries, tanto en animales de experimentación como en humanos (40). Los factores de virulencia son aquellas condiciones o características específicas de cada microorganismo que lo hacen patógeno. En el caso del Estreptococo mutans, los más involucrados en la producción de caries son:

- Acidogenicidad: el estreptococo puede fermentar los azúcares de la dieta para producir principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo. Esto hace que baje el pH y se desmineralice el esmalte dental.
- Aciduricidad: es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.
- Acidofilicidad: el Estreptococo mutans puede resistir la acidez del medio bombeando protones (H +) fuera de la célula.
- Síntesis de glucanos y fructanos: por medio de enzimas como glucosil y fructosiltransferasas (GTF y FTF), se producen los polímeros glucano y fructano, a partir de la sacarosa. Los glucanos insolubles pueden ayudar a la célula a adherirse al diente y ser usados como reserva de nutrientes.

- Síntesis de polisacáridos intracelulares, como el glucógeno: sirven como reserva alimenticia y mantienen la producción de ácido durante largos períodos aún en ausencia de consumo de azúcar.
- Producción de dextranasa: además de movilizar reservas de energía, esta enzima puede regular la actividad de las glucosiltranferasas removiendo productos finales de glucano (19, 40).

## 2.2.2 Erosión

La erosión se caracteriza por disolución y eliminación de una capa ultrafina de esmalte cada vez que se expone a un medio ácido. Se caracteriza por una disolución completa de la apatita mineral del esmalte y la dentina, en contraste a la caries, que se desarrolla con un cuerpo de lesión en la subsuperficie y conservando la capa superficial tanto tiempo como permanezca la integridad estructural más interna (27,41).

**Imagen 2.1**. Erosión del esmalte. Tomada de Thylstrup A, Fejerskov O (27).

Como se observa en la imagen 2.1, El color del esmalte erosionado permanece inalterado, la superficie se vuelve suave y por lo general brillante además es característico que el diente se vuelve redondeado. Sólo superficies expuestas directamente a la materia ácida se ven afectadas, generalmente las superficies linguales de los incisivos superiores suelen ser más afectados que las superficies labiales.

La erosión se clasifica de acuerdo a dos principios: la profundidad de la lesión y la patogénesis de la erosión.

- Clasificación de la erosión de acuerdo con la profundidad de la lesión se basa en la observación de la exposición de la dentina:

0: Intacto, sano, no hay señales de erosión.

1: Erosión exclusivamente de esmalte; ni rastro de la exposición de la dentina. La superficie parece lisa y no hay indicios de periquematies y otros signos de detalles anatómicos menores. La dentina no está expuesta.

2: Erosión en esmalte con exposición de dentina. El área de exposición de la dentina es menos del 50%.

3: Erosión en esmalte con exposición de dentina. Existe más del 50% de dentina expuesta.

- La erosión también se clasifica de acuerdo a la patogénesis de la lesión. Se han utilizado diversos sistemas de clasificación.

Una simple clasificación es:

• La erosión causada por los alimentos y bebidas: debido al consumo excesivo de frutas, jugos, vinos secos, vinagres, bebidas energizantes, refrescos los cuales contienen ácidos cítrico, fosfórico, ascórbico, málico, tartárico y carbónico.

• La erosión causada por el ácido del estómago (regurgitación, vómitos, trastornos de la alimentación)

• La erosión ocupacional por los ácidos en el aire

• La erosión idiopática (causa desconocida) (27).

### 2.2.3 Tratamientos dentales

- Grabado ácido para restauraciones adhesivas dentales: para mejorar los resultados de los sistemas adhesivos, hace muchos años se implementa el tratamiento ácido del esmalte, transformando su superficie lisa y suave en una superficie acentuadamente irregular y con mayor energía superficial, esto ocasiona por supuesto una pérdida de mineral y aumento de porosidad superficial (42,43).

- Blanqueamiento dental: los agentes más utilizados para este procedimiento estético es el peróxido de hidrogeno y el peróxido de carbamida. Los cuales se utilizan a distintas concentraciones y actuando como agentes oxidantes que rompen los

componentes orgánicos de los anillos de carbono de los pigmentos contenidos en la matriz del esmalte, convirtiéndolos en moléculas de cadenas más cortas y menos pigmentadas, pero este proceso continúa por mucho tiempo en la superficie generando descomposición del material orgánico de bajo peso molecular. Muchos efectos sobre la estructura del esmalte se han reportado como aumento en la rugosidad, disminución de la dureza, aumento de permeabilidad (44,45,46).

# 3. Transporte de masa

El esmalte dental al estar en contacto con el medio oral cuenta con la posibilidad de establecer una interacción con las sustancias que se encuentran a su disposición, dándose a través de él distintos procesos de transporte de masa.

## 3.1 Definición

Movimiento de uno o más componentes de una mezcla desde una zona de alta concentración del o de los componentes a otra zona donde la concentración es menor. Gracias a este proceso se observa muy frecuentemente que al existir una falta de equilibrio de un producto en un medio, éste se redistribuye hasta establecer un "equilibrio" o "igualdad". Con frecuencia, a esta tendencia se le menciona como la *fuerza impulsora*, mecanismo que se encuentra detrás de muchos fenómenos de transporte que ocurren en forma natural (47).

Si se define la cantidad de un producto por unidad de volumen como la *concentración* del mismo, puede decirse que el flujo de un producto siempre se presenta en la dirección de la concentración decreciente; es decir, desde la región de alta concentración hacia la de baja concentración. El producto sencillamente se mueve en el curso de la redistribución y, de este modo, el flujo es un *proceso de difusión.*

Es importante distinguir entre dos conceptos que son, la *transferencia de masa* y el *movimiento de masas de fluido* (o *flujo de fluidos*) que se presenta en un nivel macroscópico conforme un fluido se transporta de un lugar a otro. La transferencia de masa requiere la presencia de dos regiones con composiciones químicas diferentes y se

refiere al movimiento de especies químicas desde una región de alta concentración hacia una de concentración menor. La fuerza impulsora primaria para el flujo de fluidos es la *diferencia de presión*, en tanto que, para la transferencia de masa es la *diferencia de concentración*. La transferencia de masa tiene un límite, que se conoce como **equilibrio** entre las fases. El equilibrio se alcanza cuando no existe fuerza directriz y la transferencia neta cesa (47).

Estos procesos de transferencia se pueden evidenciar claramente en la dinámica superficial del esmalte dental con el medio oral, antes descrito, en donde existe un flujo de iones de la porción inorgánica de la hidroxiapatita sobresaturada hacia el medio oral insaturado de estos componentes, hasta alcanzar un equilibrio que mantiene el medio saturado y la estructura adamantina estable.

## 3.2 Difusión

Es el fenómeno de transporte de masa que ocurre entre dos medios por movimiento atómico, iónico y/o macromolecular, el cual se puede presentar tanto en gases, sólidos y líquidos (48).

Existen una serie de factores que explican e influyen en el proceso de difusión, como lo son:

- La concentración: la fuerza impulsora para la transferencia de masa es la *diferencia de concentración.* De modo que si no existe diferencia entre las concentraciones de una especie en regiones diferentes de un medio, no habrá transferencia de masa.

- *Espaciamiento molecular*. En general, entre mayor sea éste, más alta es la razón de difusión. Lo típico es que la razón de difusión sea mucho más alta en los gases que en los líquidos y sólidos. Los coeficientes de difusión en las mezclas gaseosas son unos cuantos órdenes de magnitud más grandes que los correspondientes a las soluciones líquidas o sólidas.

Las moléculas que existen en una mezcla gaseosa chocan continuamente entre sí y el proceso de difusión es fuertemente influido por estas colisiones. La colisión de moléculas semejantes tiene poca consecuencia, ya que son idénticas y no hay diferencia respecto a cuál de ellas cruza cierto plano. Sin embargo, la de moléculas diferentes influye sobre la razón de la difusión, puesto que moléculas diferentes pueden tener masas distintas y, por consiguiente, cantidades de movimiento diferentes; en consecuencia, las moléculas más pesadas dominan el proceso de difusión. Los coeficientes de difusión y, por ende, la razón de difusión de los gases depende intensamente de la *temperatura*, ya que ésta es una medida de la velocidad promedio de las moléculas del gas. Por lo tanto, la razón de difusión es más alta a temperaturas más elevadas (48).

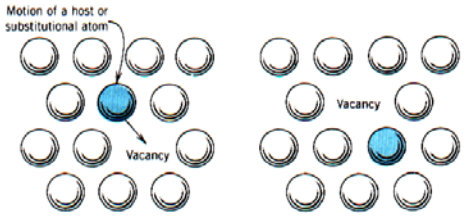
La difusión también puede ocurrir en los líquidos y en los sólidos, al igual que en los gases. Por ejemplo, llega un momento en el que una taza de agua que se deja en un cuarto se evapora, como resultado de que las moléculas de agua se difunden hacia el aire (*transferencia de masa líquida a gaseosa*). Un trozo de CO2 sólido (hielo seco) también se hace más pequeño con el transcurso del tiempo, ya que sus moléculas de CO2 se difunden hacia el aire (*transferencia de masa sólida a gaseosa*). Las moléculas de un lápiz de color introducido en un vaso de agua se difunden hacia ésta, como se evidencia por la dispersión gradual del color en esa agua (*transferencia de masa sólida a líquida*) (48,49).

En el caso de sólidos hay unas consideraciones, como que para que ocurra movimiento de átomos son necesarias dos condiciones:

1 Existir espacio libre adyacente.
2 Los átomos deben tener energía suficiente para romper los enlaces químicos y causar una distorsión en el reticulado cristalino.

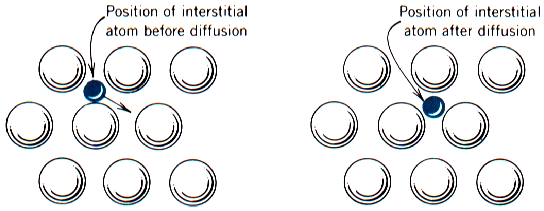
Este movimiento puede ocurrir en el volumen del material aprovechando vacancias o intersticios, a lo largo de defectos lineales: dislocaciones, a lo largo de defectos bidimensionales: límites de grano, superficies externas. En este sentido la difusión en sólidos, se puede presentar de dos tipos (49):

- Difusión por vacantes: en la que los átomos substitucionales cambian de posición con vacancias existentes en la estructura cristalina. Entonces, la cantidad de movimiento es una función del número de vacancias presentes, a su vez el número de vacancias aumenta exponencialmente con la temperatura.




Tomada de Callister W (49).

- *Difusión intersticial*: aquí los átomos intersticiales migran para posiciones intersticiales adyacentes no ocupadas de la estructura. No hay necesidad de que existan vacancias vecinas, siendo este tipo de difusión más rápida que la anterior. En metales y aleaciones, la difusión de impurezas de radio atómico muy pequeño en relación al radio atómico de la matriz es muy común. Ejemplos: hidrógeno, carbono, nitrógeno y oxigeno en el acero.




Tomada de Callister W (49).

## 3.3 Leyes de Fick

Propuesta en 1855, afirma que la razón de difusión de una especie química en el espacio de una mezcla gaseosa (o de una solución líquida o sólida) es proporcional al *gradiente de concentración* de esa especie en ese lugar (49,50).

Hay dos modos de transferencia de masa (difusión):

- Molecular: La masa puede transferirse por medio del movimiento molecular fortuito en los fluidos (movimiento individual de las moléculas), debido a una diferencia de concentraciones. La difusión molecular puede ocurrir en sistemas de fluidos estancados o en fluidos que se están moviendo.

- Convectiva: La masa puede transferirse debido al movimiento global del fluido. Puede ocurrir que el movimiento se efectúe en régimen laminar o turbulento. El flujo turbulento resulta del movimiento de grandes grupos de moléculas y es influenciado por las características dinámicas del flujo. Tales como densidad, viscosidad, etc. (49,50).

### 3.3.1 Primera de Ley de Fick: Difusión en estado estacionario – difusión molecular

La razón de difusión de masa, $m \cdot$ dif, de una especie química *A* en un medio en reposo, en la dirección *x*, es proporcional al gradiente de concentración *dC*/*dx* en esa dirección y se expresa mediante la ley de Fick de la difusión por:

$$m \cdot dif = -D_{AB} A \frac{dC_A}{dx}$$

Donde *DAB* es el coeficiente de difusión (o *difusividad de la masa*) de la especie en la mezcla, el cual es una medida de la rapidez con la que se difunde un producto en ese medio; se tiene también el signo negativo para hacer que el flujo en la dirección positiva sea una cantidad positiva (además *dcA*/*dx* es una cantidad negativa, ya que la concentración decrece en la dirección del flujo), y *CA* es la concentración de esa especie en la mezcla en ese lugar.

Esta relación lineal entre la razón de difusión y el gradiente de concentración, propuesta por Fick, expresa que (48,49):

Flujo de masa = constante de proporcionalidad x gradiente de concentración

Desde un punto de vista macroscópico, la difusión es un proceso que depende del tiempo, pues la cantidad de un elemento transportado dentro de otro es una función del tiempo.

Normalmente esta velocidad se expresa como densidad de flujo (J), definida como la masa (o número de átomos), M, que difunden perpendicularmente a través de la unidad de área de un sólido por unidad de tiempo. La expresión matemática se puede representar por:

$$J = \frac{M}{At}$$

Donde A es el área a través de la cual ocurre la difusión y t es el tiempo que dura la difusión.

La densidad de flujo (J) se expresa en kilogramos o átomos por metro cuadrado por segundo (kg/m2 · s).

La condición para que exista estado estacional es que el flujo de difusión no cambie con el tiempo. Un ejemplo clásico de la difusión en estado estacionario es la difusión de átomos de un gas a través de una lámina metálica cuyas concentraciones (o presiones) de las sustancias que difunden se mantienen constantes a ambos lados de la lámina (48-50).

La constante de proporcionalidad en la ley de Fick se define como otra propiedad de transporte conocida como el **coeficiente de difusión binaria** o **difusividad de la masa**, *DAB.*

Los valores del coeficiente de difusión (D) dependen de:

- Las propiedades de la sustancia que se difunde
- Las propiedades del medio a través del cual se difunde
- La temperatura y de la presión (condiciones hidrodinámicas del sistema).

Los coeficientes de difusión de los sólidos y de los líquidos tienden a crecer con la temperatura, exhibiendo al mismo tiempo una fuerte dependencia respecto a la composición. El proceso de difusión en los sólidos y los líquidos es mucho más

complicado que en los gases y, en este caso, los coeficientes de difusión se determinan casi exclusivamente en forma experimental.

### 3.3.2 Segunda Ley de Fick: Difusión en estado no estacionario

La mayoría de las situaciones prácticas de difusión son en estado no estacionario.

En una zona determinada del solido el flujo de difusión y el gradiente de difusión varían con el tiempo, generando acumulación o agotamiento de las sustancias que difunden. En condiciones no estacionarias es conveniente utilizar la ecuación de derivadas parciales:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial C}{\partial x}\left(D\frac{\partial C}{\partial x}\right)$$

Y si el coeficiente de difusión es independiente de la composición, lo cual deberá comprobarse para cada situación particular de difusión, la ecuación se simplifica a (40-41):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

## 3.4 Conductividad electrolítica

Las soluciones son mezclas homogéneas de moléculas (en casos particulares también de átomos, iones) de dos o más sustancias entre las cuales existen interacciones físicas y frecuentemente químicas.

Un conductor es un material que ofrece una mínima resistencia al paso de una corriente eléctrica; por su parte, el inverso de la resistencia es conocido como *conductancia* (48).

### 3.4.1 Tipos de conductores

Los conductores sólidos y líquidos, en los que el paso de corriente eléctrica origina un flujo de electrones (conducción electrónica), se llaman conductores de primera clase. Pertenecen a este tipo, los metales sólidos y líquidos, y algunos no metales (grafito; sulfuro de cinc y de plomo) (51).

Los conductores de segunda clase, son las sustancias en las que el paso de corriente origina el traslado de iones (conducción iónica) y transformaciones químicas en los sitios de entrada y salida de la corriente (reacciones electroquímicas). Típicos conductores de segunda clase, son las soluciones de sales, ácidos y bases de agua y algunos otros disolventes, así como las sales fundidas y las sales sólidas. Como regla, se transporta la electricidad, por iones positivos (cationes) y por negativos (aniones).Los conductores de segunda clase se denominan electrolitos. Pueden ser sustancias puras o soluciones (52).

### 3.4.2 Mecanismo de Conducción Electrolítica

Para disoluciones diluidas, enunció S. Arrhenius (1887) la *teoría de la disociación electrolítica,* que forma la base del moderno tratamiento de los electrolitos. Se admite la hipótesis de que cuando se disuelve en agua un ácido, una base o una sal, la misma se disocia espontáneamente en iones positivos y negativos; esto es:

$$MA = M^{+} + A^{-}$$

Estos iones se pueden mover independientemente, y son sencillamente guiados a los electrodos de signo opuesto por el campo eléctrico aplicado. Se supuso que la proporción de moléculas que se disociaban en iones variaba con la concentración, y se consideró que el *grado de disociación*, (α) o sea, la fracción del electrolito total que se divide en iones se aproxima a la unidad a dilución infinita; es decir, en disoluciones extremadamente diluidas casi toda la totalidad del ácido, base o sal, está disociado en iones (51).

### 3.4.3 Interacción de los iones con el disolvente.

Al disolverse sustancias con redes cristalinas iónicas en líquidos, de altas constantes dieléctricas, los iones de la capa superficial de la red y las moléculas dipolares del disolvente se atraen mutuamente con una fuerza *F* que se expresa:

$$F = \frac{\mu_{1\epsilon_2}}{r^3}$$

Donde $\mu_1$ es el momento dipolar de la molécula del disolvente

$e_2$ es la carga del ion;

*r* es la distancia entre el ion y el extremo del dipolo más cercano a él.

En un proceso de disolución, como resultado de la atracción, se produce el acercamiento de los iones a las moléculas vecinas de disolvente, disminuye su energía potencial y se libera calor. La disolución va acompañada de compresión, la cual puede considerarse como una concentración del disolvente alrededor de los iones y la formación en cada ion de una capa de moléculas del disolvente unidas estrechamente con el ion. Esto se llama solvatación.

La solvatación primaria, consiste en la acción del ion sobre las moléculas más cercanas del disolvente, las cuales pierden su movimiento independiente de traslación y se mueven junto con el ion como una unidad cinética. El conjunto de estas moléculas forma una capa de solvatación. La solvatación secundaria, es la acción del ion sobre las moléculas del disolvente más lejanas. Esta acción influye sobre la estructura del disolvente en su conjunto y sobre las propiedades macroscópicas de la solución (51).

### 3.4.4 Número de transporte iónico

En los electrolitos, la electricidad es transportada simultáneamente por los iones positivos y negativos, por eso, surge naturalmente el problema de saber cuál es la participación de los iones de signo diferente en el proceso.

El número de transporte iónico es la parte de electricidad pasada por el electrolito y transportada por la clase dada de iones, es decir, es la relación entre la cantidad de

electricidad transportada por iones de una clase dada, a través de cualquier sección transversal del electrolito y la cantidad total de electricidad *I*, que pasa por el electrolito a través de esta misma sección (51).

El número de transporte del catión se expresa por:

$$t^{+} = \frac{I^{+}}{I}$$

Y para el anión

$$t^{-} = \frac{I^{-}}{I}$$

# 4. Microscopías

## 4.1 Estereomicroscopio

**Imagen 4.1**. Estereomicroscopio

Está diseñado para producir una imagen tridimensional (estereoscópica). En realidad son dos lupas, colocadas una al lado de la otra y con cierta oblicuidad entre sí (15 grados), que da a la imagen el efecto de profundidad. La lupa posee una capacidad de aumento limitada, que oscila entre 1,5x a 50x, y forma una imagen aumentada y derecha (53).

Este equipo tiene características que son valiosas en situaciones donde la observación tridimensional y percepción de la profundidad y el contraste es crítico para la interpretación de la estructura de la muestra. También son esenciales cuando se requiere micromanipulación de la muestra en un espacio de trabajo grande y cómodo. El amplio campo de visión y ampliación variable obtenida, es también útil para investigación biológica que requiere una cuidadosa manipulación de organismos vivos o estructuras delicadas y sensibles (54).

## 4.2 Microscopía óptica de luz polarizada

**Imagen 4.1** Microscopio óptico de luz polarizada

También se denomina microscopio petrográfico o metalúrgico por su uso inicial en el estudio de minerales, sin embargo su aplicación se ha extendido al campo de la biología, medicina, química y muchas otras disciplinas. Esta técnica microscópica puede emplear tanto la luz transmitida como la luz incidente (trans-iluminación y epi-iluminación respectivamente) (55).

El uso de la luz polarizada es la más efectiva en el estudio de muestras ricas en materiales birrefringentes, puesto que mejora de manera incomparable la calidad de la imagen. La luz proveniente de una fuente estándar de iluminación vibra y se propaga en todas las direcciones, pero al pasar por un filtro polarizador las ondas y su campo eléctrico oscilan todos en un mismo plano. El polarizador es un dispositivo que solo deja pasar la luz que vibra en un plano determinado denominado eje de polarización (Figura. 4.1) (55).

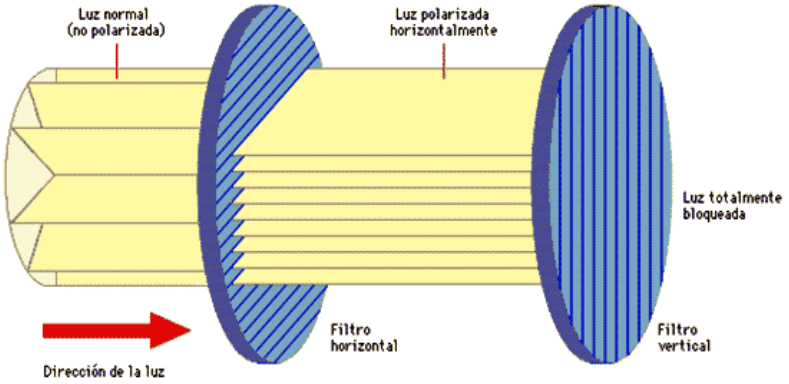



**Figura 4.1** Filtros polarizadores de microscopio optico de luz polarizada.

## 4.2.1. Principio

Muchos materiales tienen sus átomos uniformemente distribuidos en las tres direcciones principales del espacio y presentan una máxima simetría (cúbica o regular) o por el contrario, en algunos materiales sus átomos carecen de organización. Los primeros tienen las mismas propiedades ópticas, independientemente de la dirección en que se midan. Cuando la luz atraviesa sustancias con estas características, la velocidad es la misma en todas las direcciones y gracias a ello se denominan isótropos. Por el contrario, los materiales cuya organización cristalina es diferente (hexagonal, trigonal, tetragonal, rómbico, entre otras) poseen sus constituyentes dispuestos de manera asimétrica y varían según la dirección; en consecuencia el comportamiento de las ondas luminosas también es diferente, denominándose anisótropos. La estructura interna del espécimen determina su comportamiento isótropo o anisótropo (56).

Cuando se estudia el comportamiento de la luz al atravesar un espécimen, los materiales anisótropos presentan distintos índices de refracción en relación a la dirección del haz de luz; por el contrario, los materiales isótropos presentan un índice de refracción constante. Cuando un rayo de luz incide sobre la superficie de un material anisótropo transparente se presenta el fenómeno de la doble refracción o birrefringencia; esto quiere decir que se producen dos rayos refractados distintos que vibran en planos diferentes que se propagan con diferentes velocidades en el interior del material (56).

Este microscopio facilita la investigación de las propiedades ópticas de los especímenes y es ideal para observar y fotografiar aquellos elementos que son visibles gracias a la anisotropía, de allí su uso en cristalografía; sin embargo, también se emplea para estudiar el carácter birrefringente de muchas estructuras celulares anisótropas (56).

El contraste de la imagen se observa gracias a la interacción de la luz polarizada con los elementos birrefringentes del espécimen que producen las dos ondas refractadas, cada una de ellas polarizada en planos perpendiculares. Una vez que las ondas de luz salen del espécimen lo hacen de manera desfasada pero son recombinadas al pasar por otro filtro o filtro analizador. De esta manera, el microscopio de luz polarizada permite el estudio comparativo entre minerales tomando en cuenta la absorción del color e índices de refracción. Sin embargo, en biología su principal utilidad consiste en distinguir las sustancias isotrópicas de las anisotrópicas, revelando información detallada sobre la estructura y composición de los materiales con la finalidad de caracterizarlos para fines diagnósticos (56).

El ojo humano no capta las direcciones en las que vibra la luz y la luz polarizada puede ser detectada como un incremento en la intensidad luminosa o como un efecto de color. O en lo cotidiano, por ejemplo, con el uso de lentes de sol polarizados se logra reducir el resplandor de la luz ambiental. El 90% de las sustancias sólidas son anisotrópicas y como materiales isotrópicos se pueden enumerar una variedad de gases, líquidos y cristales (56).

## 4.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Es utilizada como una de las técnicas más versátiles en el estudio y análisis cualitativo de las características microestructurales de objetos sólidos, ya que permite observar muestras en tres dimensiones. Debido a la gran variedad de interacciones que sufre el haz de electrones en la muestra, pueden dar información sobre la composición del espécimen, topografía, cristalografía, potencial eléctrico, campo magnético local, etc. (57).

Estas interacciones pueden ser divididas en dos clases (Figura 4.2):

- **Fenómenos de dispersión elástica** que afectan las trayectorias del haz de electrones dentro del espécimen sin alterar la energía cinética de los electrones. La dispersión elástica es responsable del fenómeno de retrodispersión electrónica que es la responsable de la formación de algunas técnicas de observación en SEM (58).

- **Eventos de dispersión inelástica**, dan como origen a diferentes tipos de señales como resultado de la pérdida de energía o transferencia de energía a los átomos del espécimen que conducen a la generación de electrones secundarios, electrones Auger, rayos X característicos y bremsstrahlung (el continuo o fondo), pares electrón-agujero en semiconductores y aislantes, radiación electromagnética de longitud de onda larga en el visible, radiaciones ultravioleta e infrarroja del espectro, vibraciones de la red (fonones) y oscilaciones colectivas de los electrones en los metales (plasmones) (58).

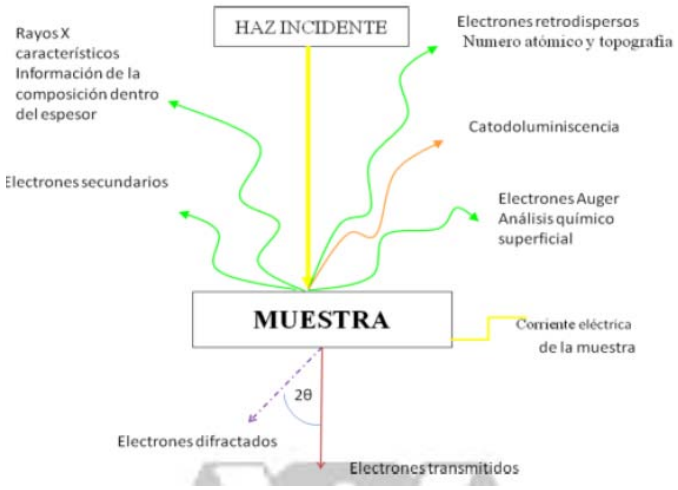



**Figura 4.2** Tipos de Electrones producidos por interacción del haz incidente con una muestra

El fundamento del SEM radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una columna en la que se ha hecho un vacío de alrededor de $10^{-7}$ Torr. En ella, el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas (condensadora, objetivo) (Figura 4.3) desde unos 25.000-50.000 nm hasta unos 10 nm; es decir, su diámetro va disminuyendo hasta hacerse casi puntual. Al mismo tiempo, la intensidad de corriente se disminuye lo que implica una menor cantidad de electrones primarios ya que la intensidad inicial de $10^{-14}$ A supone una emisión de $10^{-15}$ $e^-$/seg, mientras que en la definitiva, de $10^{-12}$ Á, es de 6.106 $e^-$

/seg. El haz electrónico con estas últimas características, es decir puntual, es desplazado sobre toda la superficie de la muestra a modo de un pincel que va barriendo la muestra con continuas idas y venidas (58).

En la interacción del haz electrónico con la superficie se producen e- secundarios que, tras ser captados por un detector, son hechos incidir sobre un centellador, donde cada $e^-$ dará origen a varios fotones. Dichos fotones son dirigidos hasta un fotomultiplicador a través de una guía óptica, lo que dará origen a un fotoelectrón que, a través de una serie de dinodos con diferencias de potencial crecientes produce, mediante un efecto en cascada, gran cantidad de e- secundarios. En definitiva, se logra una amplificación de la corriente debida a la e- secundarios originales o, el dicho de otro modo, una amplificación de la información sobre la muestra suministrada de dichos e-. Los e- secundarios, finalmente, previo paso por un video amplificador, son dirigidos hacia un tubo semejante a un osciloscopio de rayos catódicos (ORC) sobre cuya pantalla se producirá la imagen (58-59).

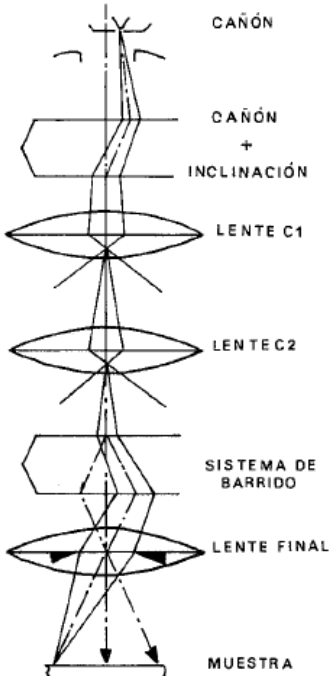



**Figura 4.3** Componentes de la óptica del microscopio de barrido

### 4.3.1 Microscopía electrónica de barrido con análisis de espectroscopía de dispersión de rayos X (SEM-EDX)

Como se había mencionado, una de los posibles fenómenos que pueden ocurrir al incidir una haz de electrones sobe una muestra, es que el electrón visitante intime con alguno de los electrones locales de los orbitales internos y acabe expulsándolo del átomo. Este electrón expulsado se denomina *electrón secundario* (el que lo ha expulsado es primario), y es fundamental en SEM. El electrón primario continúa su camino, pero algo desviado y debilitado por el esfuerzo. El estudio de estos electrones debilitados es la base de otra técnica de análisis cuyas siglas son *EELS* (Electron Energy Loss Spectrometry). Algunos picosegundos después de que el electrón secundario ha dejado una vacante en el átomo (lo ha ionizado), otro de los electrones locales de algún orbital mas externo se lanza a ocupar el lugar del expulsado, mas cerquita del núcleo. Ahora bien, esta reestructuración de plantilla deja al átomo con un excedente de energía, que puede solucionar de dos formas distintas:

a) Para volver al equilibrio, el átomo expulsa un electrón de la capa externa, que es conocido como *electrón Auger*. Estos son utilizados en otra técnica de microanálisis cuyas siglas son *AES* (Auger Electron Spectrometry).

b) Para volver al equilibrio, el átomo emite un fotón de rayos X. Esta, finalmente, es la base de la espectrometría por dispersión de energía de rayos X que por supuesto también tiene sus siglas: XEDS (X-Ray Energy Dispersive Spectrometry). No obstante, puede encontrarse en diversos textos como EDS, EDXRS, EDX o XDS (60).

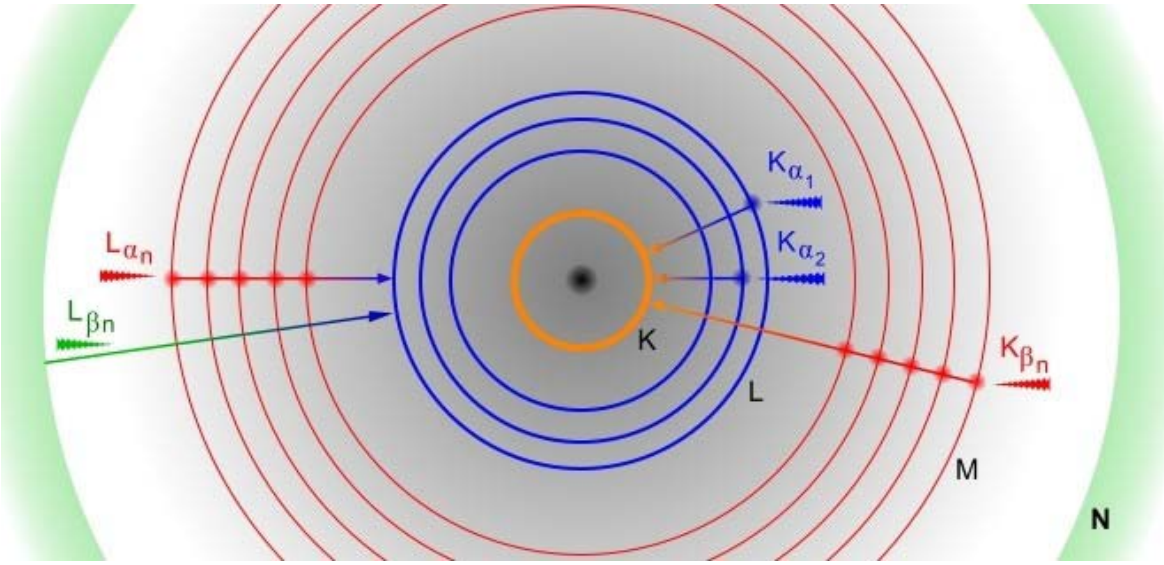
Es así como ésta técnica hace parte de los métodos de análisis de rayos X emitidos por la muestra, siendo su mecanismo de acción, ya que la energía de los fotones emitidos está directamente relacionada con el peso atómico del elemento emisor, esto es porque la diferencia de energía entre orbitales aumenta según lo hace el peso atómico, debido principalmente al aumento del número de protones en el núcleo. De este modo podemos asociar cada valor de energía emitida con un elemento de la tabla periódica, así que midiendo con un detector apropiado los fotones expulsados por la muestra se puede averiguar:

a) por la energía de cada fotón, cual es el elemento que lo está produciendo (análisis cualitativo).

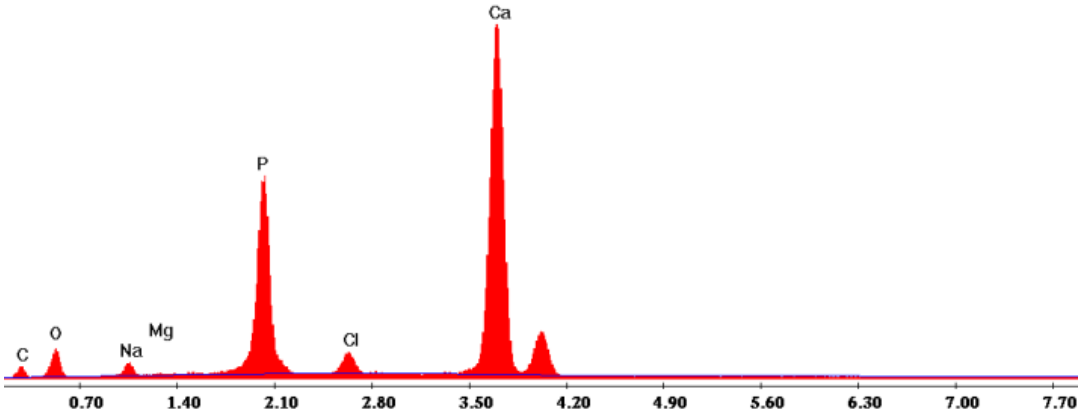
b) por el número de fotones emitido de cada energía, la cantidad relativa de cada elemento (análisis cuantitativo) (61).

- **Rayos-X caracteristicos.**

Para generar un fotón de rayos-X se necesita expulsar un electrón de alguno de los orbitales internos del átomo y que este hueco sea ocupado por alguno de los electrones de un orbital mas externo. Ahora bien, aunque se mencionó que existe una energía característica para cada elemento atómico, la realidad es que se trata de *un conjunto* de energías características para cada elemento. Si el electrón expulsado pertenecía al orbital K del átomo se obtiene un rayo-X tipo “K”, pero si pertenecía al orbital L entonces será del tipo “L”, y así mismo los “M” corresponden con el orbital M. Dentro de estos tipos generales existen subtipos. Si un electrón expulsado del orbital K es ocupado por un electrón del orbital L, se produce un rayo-X tipo Kα, pero si es ocupado por un electrón del orbital M, entonces será un rayo-X tipo Kβ. Si un electrón expulsado del orbital L es ocupado por otro del orbital M, corresponde a un rayo-X tipo Lα. A partir de aquí, también se debe considerar no solo desde que suborbital procede el electrón sino también que suborbital es el que “rellena”, ya que excepto en el orbital K, el resto se dividen en subniveles (3 para el L, 5 para el M, 7 para el N...). Así que, si un electrón expulsado del orbital K es ocupado por otro del orbital L3, se obtiene un rayo-X tipo Kα1 , si es del orbital L2 seria del tipo Kα2, etc. (60).




**Gráfica 4.1**. Formación de rayos X. (Tomada de Martínez, 2010)




**Gráfica 4.2** Resultado del análisis cualitativo (espectro) por medio de SEM-EDX. Correspondiente a esmalte dental de un espécimen dental sano (Bernett, 2014).

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| kV:29.98 | Tilt: 1.90 | Take-off:39. | Tc:35.0 | | | |
| Detector Typ | Resolution : | Lsec :114 | | | | |
| | | | | | | |
| EDAX ZAF Qu | Standardles | | | | | |
| Element Normalized | | | | | | |
| SEC Table : Default | | | | | | |
| | | | | | | |
| Element | Wt % | At % | K-Ratio | Z | A | F |
| | | | | | | |
| C K | 16.10 | 30.35 | 0.0287 | 10.515 | 0.1695 | 10.005 |
| O K | 22.50 | 31.84 | 0.0242 | 10.366 | 0.1037 | 10.002 |
| NaK | 1.79 | 1.77 | 0.0043 | 0.9736 | 0.2470 | 10.028 |
| MgK | 0.30 | 0.28 | 0.0011 | 0.9992 | 0.3456 | 10.056 |
| P K | 18.24 | 13.33 | 0.1323 | 0.9678 | 0.7397 | 10.133 |
| ClK | 1.81 | 1.16 | 0.0129 | 0.9519 | 0.7256 | 10.309 |
| CdL | 0.62 | 0.13 | 0.0054 | 0.7866 | 10.505 | 10.418 |
| CaK | 36.74 | 20.75 | 0.3240 | 0.9740 | 0.9054 | 10.000 |
| I L | 1.20 | 0.21 | 0.0106 | 0.7783 | 11.272 | 10.000 |
| BrK | 0.27 | 0.08 | 0.0022 | 0.8192 | 10.009 | 10.026 |
| SrK | 0.41 | 0.11 | 0.0033 | 0.7986 | 10.041 | 10.000 |
| Total | 100.000 | 100.000 | | | | |

**IMAGEN 4.3.** Resultado del análisis cuantitativo por medio de SEM-EDX. Correspondiente a esmalte dental de un espécimen dental sano (Bernett, 2014).

- Principios: El resultado del análisis es un espectro de “cuentas” vs. Energía.
  Las partes principales del espectrómetro son:
  - El detector (cristal semiconductor ultrapuro enfriado)
  - El procesador electrónico

- El analizador multicanal

El ordenador controla:

- Si el detector está encendido o apagado: Sólo se procesa un rayo X cada vez, así que el detector se apaga cuando se detecta una señal de rayo X.
- El procesador electrónico: establece el tiempo necesario para analizar cada rayo X y asignarle su correspondiente canal en el analizador multicanal.
- El calibrado de la lectura del espectro en el analizador multicanal y el espectro mostrado en la pantalla (59).

Mecanismo de acción (Figura 4.4):

1- El detector genera un pulso de carga proporcional a la energía del rayo X.

2- Este pulso de carga se convierte en un pulso de voltaje.

3- La señal se amplifica a través de un transistor (FET), se aísla de otros pulsos, se vuelve a amplificar y se identifica electrónicamente como proveniente de un rayo X con una energía específica.

4- La señal digitalizada se almacena en un canal asignado a esa energía en el analizador multicanal (59).

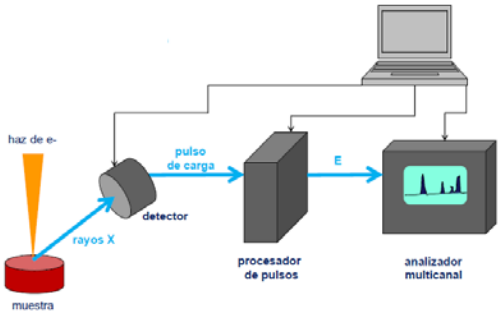



**Figura 4.4** Mecanismo de acción de EDX (59).

El espectrómetro realiza dos funciones:

- Detecta los rayos X
- Los separa (dispersa) en un espectro según su energía (58).

# 5. Objetivos

## 5.1 Objetivo general

Estudiar in vitro la difusión de algunas especies químicas en el esmalte dental humano.

## 5.2 Objetivos específicos

- Evaluar e implementar un método de desmineralización en esmalte dental humano.
- Determinar por medio de SEM-EDX la concentración de especies químicas en función de su profundidad en ES y EDI.
- Evaluar la difusión de especies químicas según su polaridad en ES y EDI.
- Evaluar la difusión de especies químicas según su carga neta dentro ES y EDI.
- Evaluar la difusión de especies químicas según su tamaño no solvatado en ES y EDI
- Evaluar la difusión de especies químicas según su radio hidrodinámico efectivo en ES y EDI.

# 6. Hipótesis

Se realizarán pruebas de hipótesis para evaluar la influencia de algunos factores en la difusión en esmalte dental tratado.

H0(1): La difusión media es independiente de la concentración.
H0(2): la difusión media es la misma según el tiempo.
H0(3): La difusión es independiente del estado del esmalte
H0(4): No existe efecto medio en la difusión cuando se tiene simultáneamente el efecto del tiempo y la concentración.

# 7. Metodología

## 7.1 Tipo de investigación

Investigación experimental exploratoria.

## 7.2 Población

### 7.2.1 Unidades experimentales

Terceros molares superiores e inferiores humanos con previo consentimiento informado de los donantes, aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia No CIE-0202-12 (Anexo A).

### 7.2.2 Criterios de inclusión

Terceros molares superiores e inferiores sanos erupcionados e incluidos, con extracción indicada.

### 7.2.3 Criterios de exclusión

- Extracción con diagnóstico asociado de enfermedad periodontal, caries, fractura dental.
- Defectos en el esmalte pre-eruptivos moderados y severos.
- Patologías pulpares.
- Tratamientos de restauraciones en amalgama, con sistemas adhesivos, de rehabilitación, o de blanqueamiento interno o externo.
- Fracturas del esmalte.

### 7.2.4 Muestra

Se recolectaron 65 dientes que se dividieron de forma aleatoria en 3 grupos: grupo 1 (G1) (n=30) esmalte sano (ES), grupo 2 (G2) (n=30) esmalte con desmineralización inducida (EDI), y un grupo control (GC) (n=5) sin exposición a tratamiento.

## 7.3. Materiales y métodos

### 7.3.1 Obtención de la muestra

Previo consentimiento informado y entrega de cartilla informativa se diligenció la hoja de registro para cada uno de los especímenes recolectados (Anexo B, C, D).

Cada espécimen se depositó en recipientes de media onza de polietileno de alta densidad PEAD con selle hermético (tapa rosca No 24), en 10 ml de cloramina T al 0.5% (62), como medio de almacenamiento inicial mientras se llevaron al Banco de Dientes de la Universidad Nacional de Colombia (Laboratorio de Cerámicas del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional) para su preparación.

### 7.3.2 Almacenamiento de la muestra

Siguiendo el protocolo establecido en el Banco de Dientes de la Universidad Nacional de Colombia (62), las muestras se manejaron de la siguiente forma:

- Se lavaron los dientes con agua corriente para retirar restos de sangre.
- Se eliminó el tejido periodontal remanente de la superficie radicular con hoja de bisturí.
- Se lavaron los especímenes con agua corriente.
- Se secaron los dientes con papel absorbente.

- Se retiró la pulpa dental vía ápice con limas endodónticas calibre 6-8-10-15-20 dependiendo su posibilidad de acceso.
- La última instrumentación se realizó con una lima embebida de formaldehído al 30% para momificar posibles restos pulpares a nivel intrarradicular e intracameral, y se terminó sumergiendo dos minutos el ápice dental en formaldehído al 30% y se esperó su secado espontáneo.
- Se sellaron a nivel apical con acrílico de autocurado.
- Se almacenaron finalmente en cloramina T al 0.5% en selle hermético a 4°c.

## 7.3.3 Fase de preparación de la muestra

- **Método de Desmineralización subsuperficial en esmalte dental**

La difusión de las especies químicas se evaluó sobre esmalte sano (ES) y sobre esmalte con desmineralización inducida (EDI). Pero obtener una muestra representativa de especímenes con condiciones similares de desmineralización (grado y ubicación de la lesión), no es algo factible. Es así como se hizo necesario crear en laboratorio un método que reprodujera de manera controlada, sencilla y rápida, una desmineralización incipiente en esmalte dental humano. Para éste fin, se evaluó una solución con ácido láctico a dos pHs durante tres tiempos.

- Muestra:

Para establecer el método de desmineralización se utilizaron 12 terceros molares humanos sanos según los criterios de selección, y siguiendo los protocolos de obtención, limpieza, desinfección y almacenamiento antes descritos.

- Metodología:
  - *Método de aislamiento de superficie*

Con el fin de delimitar y ubicar una superficie dental específica a tratar con la solución ácida, se creó un método de aislamiento de superficie realizando ensayos preliminares con cuatro tipos de materiales adhesivos reversibles:

- Se seleccionaron cuatro premolares proporcionados por el Banco de dientes de la Universidad Nacional de Colombia.
- Los materiales escogidos para realizar las pruebas fueron: cinta adhesiva (Tesa®), papel autoadhesivo (Contact®), cinta aislante eléctrica de vinilo (Temflex ™- 3M) y cinta de PVC (Tesa ®).
- Se realizaron ventanas de 3mm x 4mm con los materiales antes mencionados y se adaptaron en la cara vestibular de los especímenes (Imagen 7.1.).

**Imagen 7.1** Materiales de aislamiento y creación de ventanas.

- Seguidamente se realizó una tinción con azul de metileno en toda la superficie dental enmarcada por las ventanas de los materiales, dejando en contacto dicho colorante por 12 horas con el fin de ubicar posibles filtraciones a través de los materiales. Posteriormente, se retiraron los

excesos de tinte dando pequeños toques con un fragmento de papel absorbente (Imagen 7.2).

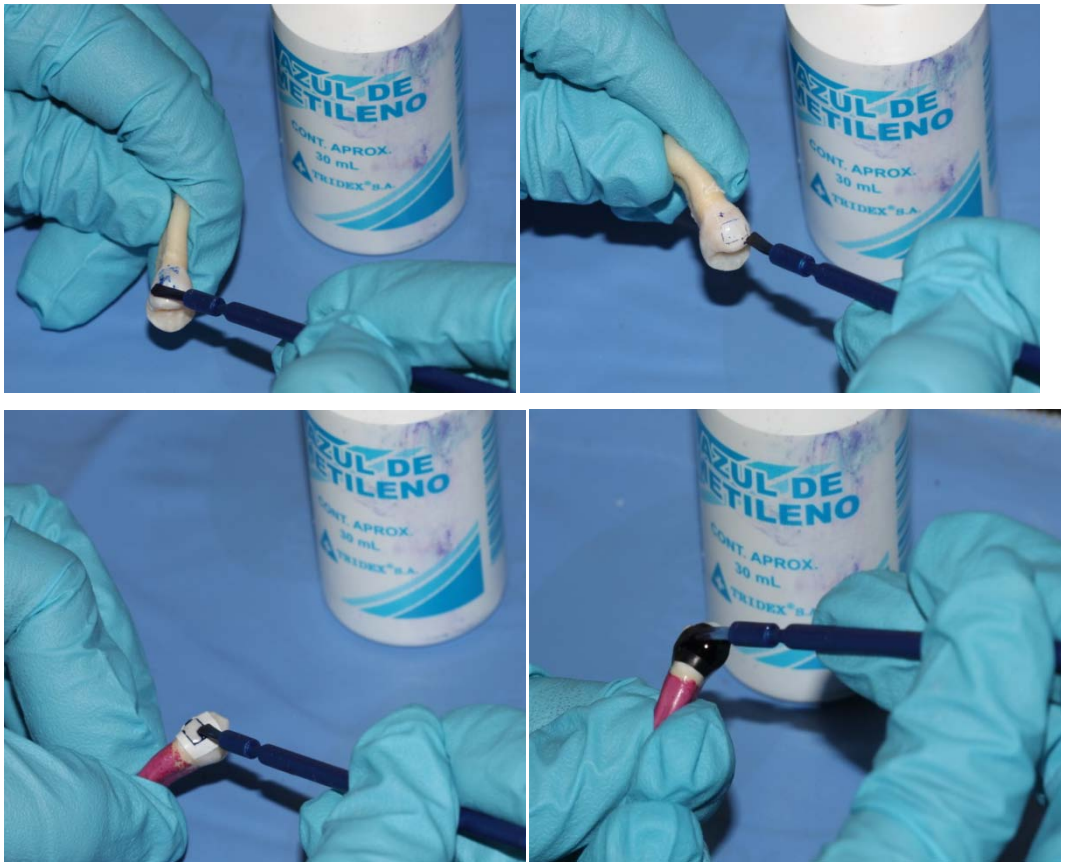
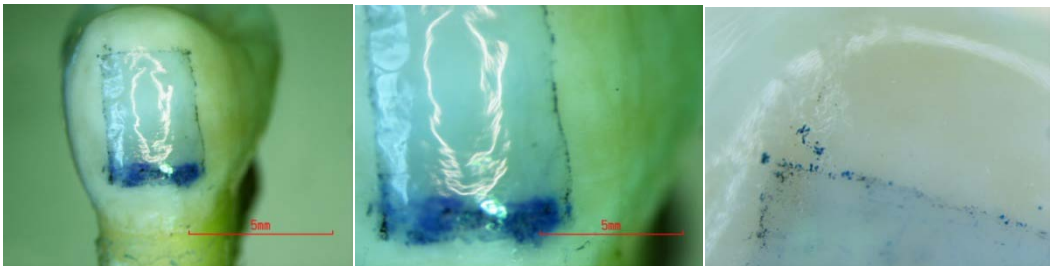



**Imagen 7.2**Tinción con azul de metileno en espécimen.

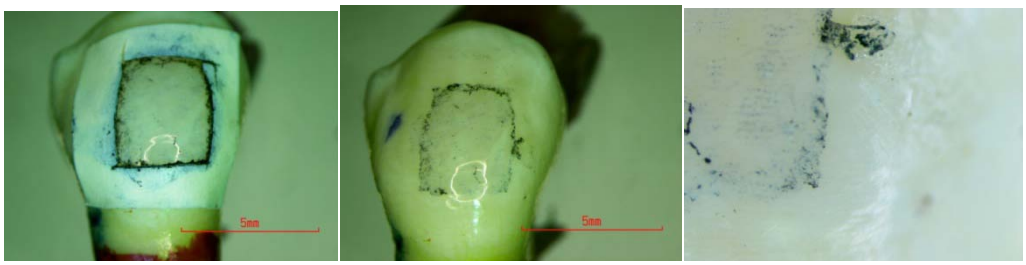
- En este paso se descartó la cinta adhesiva (Tesa®), debido a su difícil manipulación por el poco grosor, y a su baja capacidad adhesiva sobre esmalte dental.

▪ Al retirar los materiales aislantes, las muestras se observaron con estereomicroscopio, con objetivos de aumento de 20x y 30x(Imágenes 7.3, 7.4, 7.5):



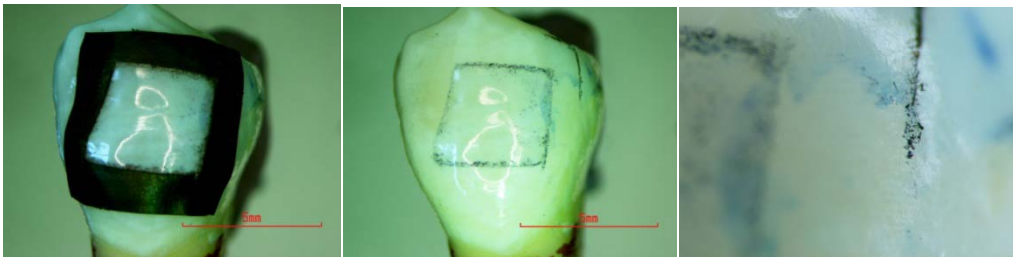
A B C

**Imagen 7.3** Estereomicroscopía papel Contact, A y B (20x) – C (30x)



A B C

**Imagen 7.4** Estereomicroscopía cinta eléctrica de vinilo (Temflex ™- 3M), a y b (20x) – c (30x)



A B C

**Imagen 7.5** Estereomicroscopía pvc negro (Tesa ®), a y b (20x) – c (30x)

- Se encontró una filtración mínima en el sellado con papel autoadhesivo (Contact®) y un sellado completo con la cinta aislante eléctrica de vinilo (Temflex ™- 3M) y la cinta de PVC (Tesa ®).
- Finalmente valorando distintos aspectos, se escogió la cinta de PVC (Tesa ®) ya que en comparación con los otros materiales contaba con ciertas ventajas: mayor capacidad adhesiva a la superficie dental, grosor adecuado del material que facilita su manipulación, adaptación a superficies irregulares del diente, mayor

capacidad de sellado de superficie, bajo desprendimiento del adhesivo de la cinta al retirarla.

- *Preparación de la solución desmineralizante*

Se prepararon dos soluciones de ácido láctico racémico 90% calidad USP (United State Pharmacopoeia) a dos pH:

pH= 2,387 (2.8298 g en 250ml de agua desmineralizada) basado en las proporciones reportadas por N. Sabel et. al. sin usar carboximetilcelulosa (30).

pH= 5,456 (10 ml de la solución anterior en 250 ml de agua destilada) basado en la literatura como pH crítico para iniciar una desmineralización inicial en esmalte dental (27).

- *Aislamiento, distribución y tratamiento de la muestra*

A las muestras se les aplicó barniz de uñas en toda la superficie radicular y coronal excepto en las superficies vestibulares, las cuales se aislaron por medio de ventanas de 6mm x 4mm con la cinta de PVC antes descrito, y por último se cubrió con una película de acetato de polivinilo, con el fin de dejar la superficie vestibular delimitada en contacto con el tratamiento (Imagen 7.6).

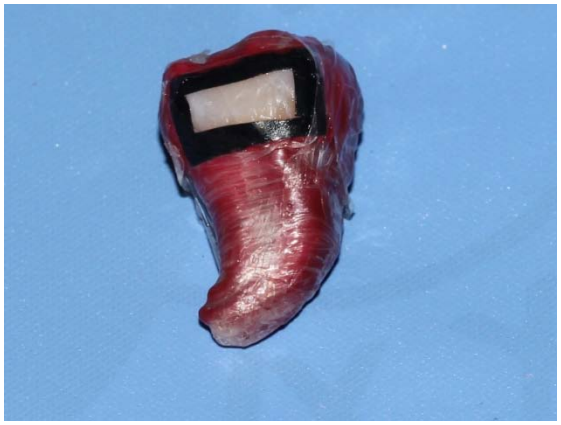


**Imagen 7.6**. Método de aislamiento

La muestra (n=12) se repartió aleatoriamente como se indica en la Tabla 7.1.

**Tabla 7.1. Distribución de la muestra de desmineralización**

| Tiempo (días) / pH ácido láctico | t1= 7 | t2=15 | t3=30 |
|---|---|---|---|
| pH1= 2,4 | Grupo 1 (G1) n= 2 | Grupo 3 (G3) n= 2 | Grupo 5 (G5) n= 2 |
| pH2= 5,4 | Grupo 2 (G2) n= 2 | Grupo 4 (G3) n= 2 | Grupo 6 (G6) n= 2 |

Los especímenes se sumergieron en 10 ml de la solución desmineralizante contenida en recipientes de PEAD con tapa hermética (Imagen 7.7), a una temperatura constante de 37 °C controlada por un termostato el cual también suministró una leve agitación de las muestras (Imagen 7.8). Posterior al tratamiento, los especímenes se almacenaron en saliva sintética isotónica a una temperatura de 4°C, en el Laboratorio de Cerámicas del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

**Imagen 7.7** Almacenamiento de muestras en solucion desmineralizante

**Imagen 7.8**. Tratamiento con solución desmineralizante

- Evaluación de desmineralización

Posterior a la desmineralización, a todos los especímenes se les analizaron cambios a nivel visual, radiográfico e histológico. Dichos análisis se realizaron por un mismo operador previamente calibrado intraexaminador.

- *Análisis visual*

Se tomaron imágenes de la superficie vestibular inicial y posterior al tratamiento con ácido láctico, con Estereomicroscopio Nikon SMZ800 a objetivos de 20x y 30x. Posterior al tratamiento, se categorizaron los cambios observados en las superficies dentales tomando como referencia los criterios de diagnóstico visual de ICDAS (Tabla 7.2):

**Tabla 7.2 Categorías respuesta visual**

| VALOR | OBSERVACIÓN |
|---|---|
| 1 | Opacidad en superficie seca |
| 2 | Opacidad en superficie húmeda |
| 3 | Opacidad con pérdida de integridad superficial |

- *Análisis radiográfico*

Se obtuvieron imágenes bidimensionales del esmalte antes y después del tratamiento, usando un equipo radiográfico periapical (GenDex Gx-770) (Área de imagenología; Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia).

- Condiciones de toma: Kilovoltaje de 70 kVp, corriente de 7 mA/s, tiempo de exposición de 5/60s y 10/60s por toma en cada muestra, y ubicando el eje mayor del espécimen perpendicular al haz de rayos X (Imagen 7.9).

**Imagen 7.9**.Condiciones de toma de radiografía periapical

El análisis se llevó a cabo de dos formas:

- Análisis radiográfico directo: se escogieron las mejores imágenes radiográficas obtenidas según el tiempo de exposición (5/60s y 10/60s), para así asignar valores de acuerdo al compromiso estructural de la desmineralización (Tabla 7.3):

**Tabla 7.3. Categorías respuesta radiográfica**

| VALOR | OBSERVACIÓN |
|---|---|
| 0 | Sin cambios |
| 1 | Esmalte sin compromiso amelodentinal |
| 2 | Esmalte hasta unión amelodentinal |
| 3 | Esmalte y dentina |

- Análisis con el software de análisis digital de imágenes: en todas las imágenes radiográficas se realizó la cuantificación de la escala de grises mediante el software digital de imágenes (Dental Imaging Software – Carestream dental; Kodak®), cuyo rango es de 0 a 255, siendo 0 el valor para la tonalidad negra y 255 para la tonalidad blanca. Dicha cuantificación se realizó en un segmento de la imagen entre la superficie externa adamantina y la proyección dentinal del cuerno pulpar de cada espécimen. Para facilitar la observación de cambios en la escala de grises entre ambas tomas se usó la herramienta de escala de color del software, finalizando con el cálculo de valor promedio (Figura 7.10)

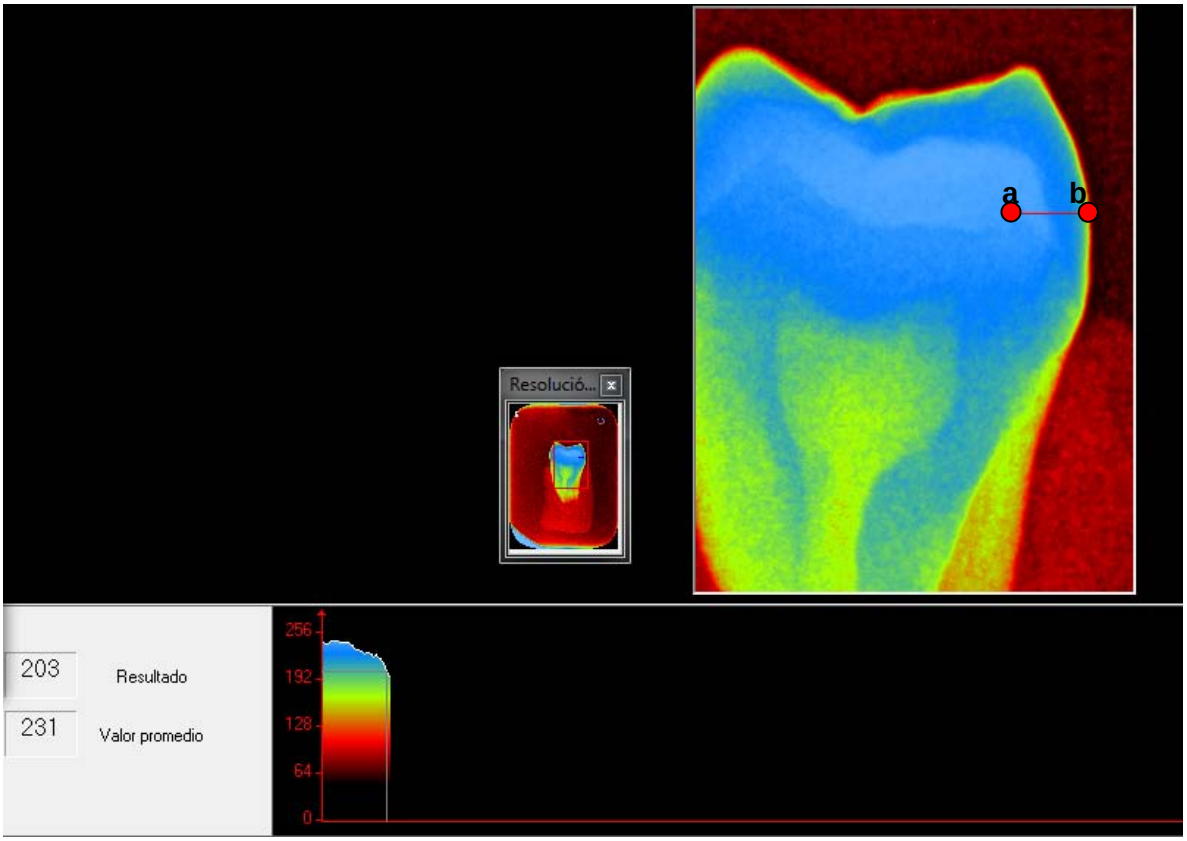



**Imagen 7.10** Representación de software para análisis digital de imágenes. Cuantificación de promedio de densidad de grises representada en escala de colores para efectos didácticos. Segmento trazado entre punto "a" (proyección dentinal del cuerno pulpar) y punto "b" (superficie externa adamantina) corresponde la zona a cuantificar. Parte inferior izquierda se observa el resultado del valor promedio medido.

- *Análisis histológico*

Preparación para microscopia óptica de luz polarizada:

- Obtención de secciones: se obtuvieron secciones de las muestras con un grosor promedio de 0.5 mm, al realizar cortes coronales en sentido vestibulo-lingual mediante una cortadora de precisión de baja velocidad (Isomet Low Speed Saw; Buehler) con disco diamantado de 4". Posteriormente, las secciones se adelgazaron con discos de carburo en micromotor eléctrico (Mighty M-3 Marathon; Saeyang Microtech) y con papel de lija (tamaño de grano 1200).

- Montaje de muestras: Las secciones se montaron en porta y cubreobjetos, y se fijaron con resina de uso histológico (Citoresin-60; BER Escorcia & CIA Ltda.) (Imagen 7.11).

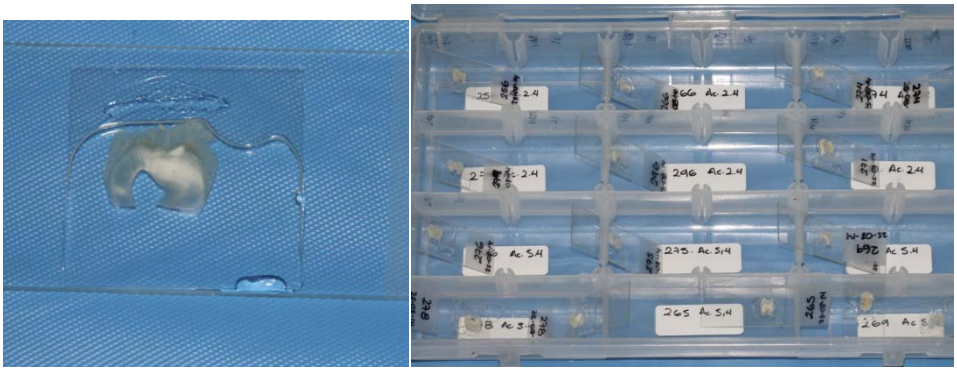


**Imagen 7.11** Montaje de secciones dentales

- Observación: El esmalte dental sano cuenta con la propiedad óptica de birrefrigencia lo que se evidencia bajo luz polarizada en microscopía óptica. Se utilizó el Microscopio de Polarización (Olympus BX51) bajo objetivo de 4x, 10x y 20x, con una angulación estándar del polarizador a 90°, y se obtuvieron imágenes por medio de la cámara microfotográfica (Olympus DP12 con detector CCD de 3.2 Megapixeles). Finalmente, se otorgaron valores según la ubicación de la desmineralización expresada como ausencia de birrefrigencia como se muestra en la Tabla 7.4:

**Tabla 7.4** Categorías respuesta histológica

| VALOR | BIRREFIRGENCIA | OBSERVCACION |
|---|---|---|
| 0 | Positiva | En todas las estructuras dentales |
| 1 | Negativa | En tercio superficial de esmalte |
| 2 | Negativa | Dos tercios de esmalte sin compromiso amelodentinal |
| 3 | Negativa | Esmalte hasta unión amelodentinal |
| 4 | Negativa | Esmalte y dentina |

- **Método de sellado mecánico reversible**

Al tener los especímenes preparados y distribuidos aleatoriamente en el grupo 1, grupo 2 y grupo control, se cortaron con disco de diamante montado en pieza de mano de baja velocidad (Dynaled Estándar Nsk) a nivel amelo-cementario para separar las raíces de las coronas. Las porciones radiculares se desecharon siguiendo los protocolos de disposición final de desechos anatomopatológicos.

Con el objetivo de analizar la difusión de las sustancias indicadoras con SEM-EDX a tres profundidades del esmalte y para evitar remover o cambiar la posición de las mismas, fue necesario previo al tratamiento realizar un corte en sentido sagital de las porciones coronales resultantes y someter a experimentación una de las secciones (mesial o distal).

Además, para la asegurar que la entrada de las especies químicas fuera por esmalte y no por la superficie expuesta al corte, se sellaron por medio de un método de sellado mecánico reversible previamente probado y validado en otro estudio (63). El cual consiste en colocar el fragmento dental entre dos losetas de vidrio precortado de 2 cm x 2 cm, cubiertas con cinta de teflón e inmovilizadas con bandas elásticas (técnica “sandwich”). Éste método otorga un sellado a azul de metileno en un 100 % y al confirmarse por medio de SEM-EDAX se encontró una filtración mínima asociada más a un patrón de difusión que a un defecto del método (p=0.05) (Imagen 7.12).

**Imagen 7.12** Método de sellado reversible

## 7.3.4 Tratamiento de la muestra

- **Distribución de tratamientos**

Se realizó como se muestra en la Tabla 7.5 Se recolectaron 60 dientes que se dividieron de forma aleatoria en 2 grupos: grupo 1 (G1) (n=30) esmalte sano (ES) y grupo 2 (G2) (n=30) esmalte con desmineralización inducida (EDI). La distribución del tratamiento se realizó así: cada grupo se dividió en 6 subgrupos (C1t1, C1t2, C1t3, C2t1, C2t2, C2t3), cada uno con 5 especímenes, con el fin de realizar tratamientos con la solución indicadora de iones Cd, Sr, Br, Cl, a dos concentraciones: baja (C1) y alta (C2), a tres tiempos diferentes (t1=4 días, t2=8 días, t3=16 días). Al finalizar el tratamiento los especímenes se retiraron de la solución y del sellado, y se almacenaron en recipientes con tapa en un medio seco.

**Tabla 7.5. Distribución de tratamientos de difusión**

| | t1 | | t2 | | t3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 |
| G1 | n=5 | n=5 | n=5 | n=5 | n=5 | n=5 |
| G2 | n=5 | n=5 | n=5 | n=5 | n=5 | n=5 |
| GC | n=5 | | | | | |

G1: Grupo con superficie de esmalte sana; G2: Grupo con superficie de esmalte desmineralizada; GC: Grupo control
C1: Sustancia indicadora a concentración baja; C2: Sustancia indicadora a concentración alta
t1: 4 días; t2: 8 días, t3:16 días
N= 65 dientes.

- **Preparación de solución indicadora**

Se escogieron iones que no hicieran parte de la composición normal del esmalte dental humano o que estuvieran en pequeñas proporciones, lo cual se comprobó por análisis con SEM-EDX del grupo control (n=10). Se prepararon dos soluciones indicadoras con

cloruro de cadmio y bromuro de estroncio a concentraciones diferentes:La solución C1, con cada sal a concentración 0.154N correspondiente a la concentración de cloruro de sodio presente en suero fisiológico, es decir, que la concentración total final de la solución fue dos veces mayor que la concentración del cloruro de sodio en suero. La solución C2, con cada sal a concentración 0.462N (3 veces la concentración de cloruro de sodio, es decir, que la concentración total final de la solución fue seis veces mayor que la concentración del cloruro de sodio en suero.

- **Aplicación de tratamientos y análisis de difusión**

Se realizó el montaje de la muestra en el método de sellado reversible antes descrito. Luego, los especímenes de cada grupo (G1: ES, n=30; G2: EDI, n=30) se sumergieron por subgrupos en la solución C1 a distintos tiempos cada uno: t1 (4 días) (n=5), t2 (8 días) (n=5) y t3 (16 días) (n=5), y de la misma forma se realizó para el tratamiento con la solución C2. Durante esta fase se mantuvo la temperatura a 36,5 °C, controlada por un termostato. Al finalizar el tratamiento, los especímenes se retiraron de las soluciones, se secaron con papel absorbente, se desmontaron del sellado y se almacenaron en recipientes con tapa en un medio seco.

Una vez terminado el tratamiento, se llevaron los especímenes al laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido (Universidad Nacional de Colombia) para obtener la concentración de los iones componentes de la solución indicadora en el esmalte dental tratado, por medio de SEM- EDX (FEI- Quanta200; EDAX-NewXL-30). El equipo se utilizó con calibración previa por patrón interno utilizando el método de cuantificación ZAF. De toda la información que el equipo proporcionó, se reporta el porcentaje atómico de los elementos indicadores. Además, ya que el haz de electrones puede leer áreas inferiores a las de un prisma del esmalte lo que, por la heterogeneidad de la estructura y composición dental, daría resultados poco consistentes, se escogió un área de lectura grande de 50μ x 50μ para obtener un promedio atómico areal (PAA) representativo, realizado a tres profundidades (Imagen 7.13).

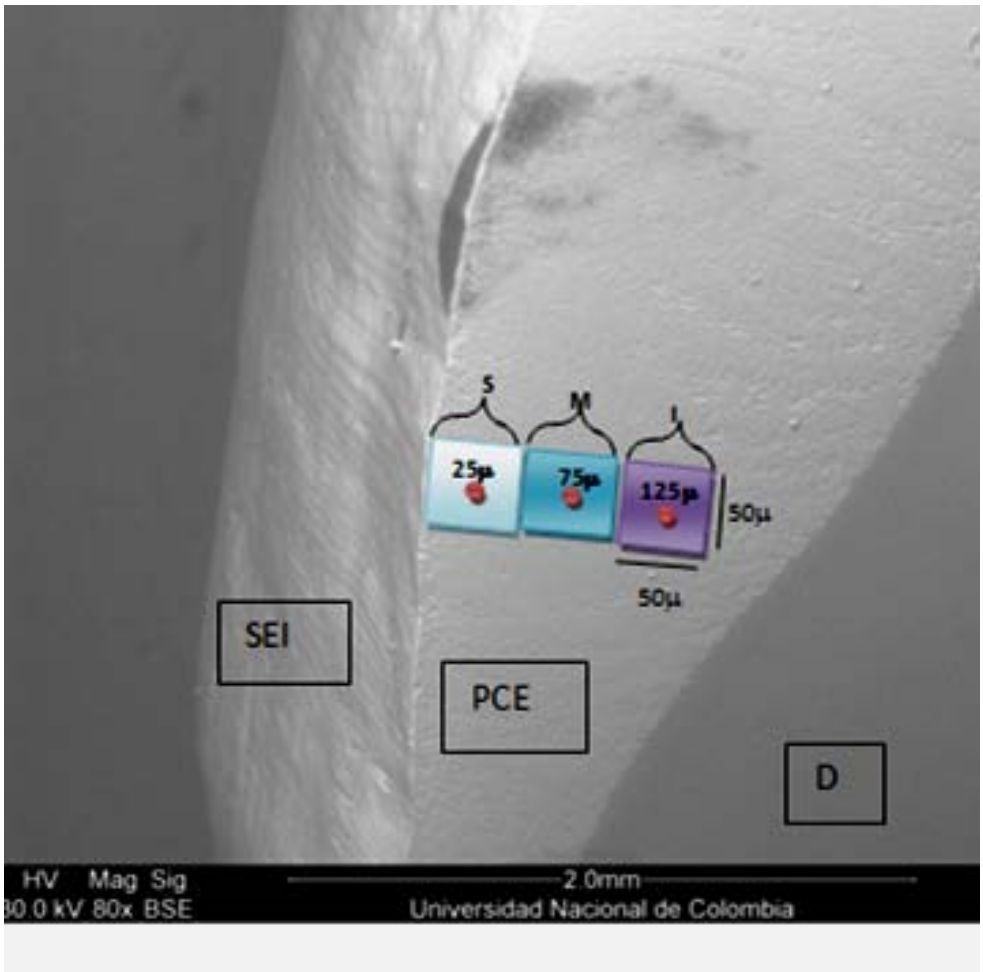



**Imagen 7.13** Análisis SEM-EDX. Se realizó a tres profundidades con un área de lectura de 50 micrómetros de lado para obtener un promedio areal representativo de la zona (**S**: a 50 micrómetros de la superficie externa adamantina; **M**: a 100 micrómetros de la superficie externa adamantina; **I:** a 150 micrómetros de la superficie externa adamantina), para lo que se ajustó el área de un cuadrado de 50 micrómetros con el centro del cuadrado superficial a 25 micrómetros de la superficie del esmalte. El cuadrado medio de lectura fue adyacente al superficial y el interno adyacente al medio. **SEI,** superficie de esmalte intacta; **PCE**, perfil de corte de esmalte; **D**. Dentina. Microfotografía original de SEM (Bernett, 2014).

## 7.4 Análisis estadístico de fase de tratamiento

Antes de la implementación del análisis estadístico se diseñaron tablas matrices, con columnas para la identificación de la muestra, el tiempo de tratamiento, el estado de mineralización del esmalte, la profundidad de medición (se renombró 1: superficial, 2: media y 3: interna) este cambio se realizó con el fin de mantener el orden de las profundidades, y la concentración de solución indicadora. De acuerdo a eso se consignaron los porcentajes obtenidos de cada elemento por muestra como lo muestra el ejemplo en la Tabla 7.6:

**Tabla 7.6** Ejemplo organización de datos para análisis estadístico

| Diente | Tiempo (días) | Estado | Profundidad | Concentración | K (%) | Cd (%) | Sr (%) | Br (%) | I (%) | Cl (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| D1 | 4 | Sano | 1 | 1 | 0,18 | 0,26 | 0 | 0,4 | 0,15 | 0,67 |
| D2 | 4 | Sano | 1 | 1 | 0,16 | 0,21 | 0,52 | 0,14 | 0,13 | 0,6 |
| D3 | 4 | Sano | 1 | 1 | 0,19 | 0,33 | 0,23 | 0,46 | 0,26 | 0,6 |
| D4 | 4 | Sano | 1 | 1 | 0,2 | 0,42 | 0 | 0,19 | 0,08 | 0,6 |

El análisis estadístico se realizó usando el software R (64) versión 3.0.2 bajo una plataforma linux.

El análisis se dividió en dos partes, la parte descriptiva se basó en el cálculo de tablas que identifican el perfil promedio de los especímenes según concentración y otras según el tiempo de tratamiento, identificando el estado del esmalte. De estas tablas se obtuvo la información necesaria que permitió realizar los gráficos de perfiles.

Un perfil se define como un comportamiento de los iones en una misma pieza dental a medida que aumenta la profundidad, de aquí el hecho que se considere un análisis de medidas repetidas, ya que se considera la medición de los mismos elementos en tres profundidades de la pieza dental.

La segunda parte, el análisis exploratorio, permite determinar si hay algún comportamiento promedio de los perfiles de la muestra, sin embargo no permite realizar ninguna prueba de hipótesis estadística de la forma:

$$\boldsymbol{H_0: b = 0}$$
$$\boldsymbol{Vs}$$
$$\boldsymbol{H_a: b \neq 0}$$

Que permite aceptar o rechazar hipótesis de efectos de tratamientos sobre la concentración promedio de elementos, es por esto que el modelo considerado es un modelo de curvas de crecimiento como los considerados por Verbeke G. & Molenberghs (65), en donde se desarrolló el siguiente modelo de regresión lineal de medidas repetidas:

$$\boldsymbol{Y = b_0 + b_1 C + b_2 T + b_3 M + b_4 P + b_5 P^2 + e}$$

Representando los coeficientes $\boldsymbol{b_i, i = 1, 2, 3}$ el efecto de la interacción, concentración, tiempo, la mineralización de la pieza dental sobre el porcentaje esperado de concentración del elemento sobre la muestra; $\boldsymbol{b_i, i = 4, 5}$ se refiere al efecto de un modelo cuadrático del efecto de la profundidad sobre el porcentaje esperado. El modelo cuadrático se considera debido a que la forma de la curva, de la concentración a medida que aumenta la profundidad, puede ser parabólica o lineal.

$\boldsymbol{b_0}$ Es el intercepto y se puede interpretar como la concentración promedio de un espécimen con concentración baja, en el tiempo 1 (4 días), perteneciente al grupo de mineralización sano y a profundidad promedio, este grupo no existe en la muestra y solo es un artificio que permite comparar el efecto de los tratamientos, ya que la prueba de hipótesis básicamente es la comparación de dos o más grupos.

Y $\boldsymbol{e}$ se refiere a un error aleatorio que está asociado tanto al error de medición como a la diferencia inherente entre las piezas dentales.

### 7.4.1 Variables

**Tabla 7.7.** Variables de difusión

| Variable | Unidad de medida | Tipo de variable | Códigos |
|---|---|---|---|
| **Tiempo** | Días | Cuantitativa, Discreta, independiente | t1: 4 días<br>t2: 8 días<br>t3:16 días |
| **Concentración** | Porcentaje | Cuantitativa, Razón continua, independiente | C1: concentración baja<br>C2: concentración alta |

# 8. Resultados y discusión

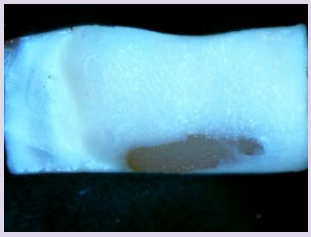
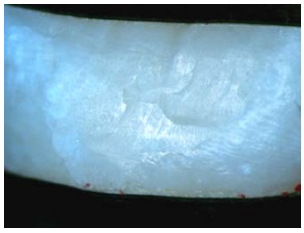
## 8.1 Preparación de muestras

### 8.1.1 Método de desmineralización en esmalte dental humano.

- **Resultados visuales**

El tratamiento con ácido láctico a pH 2,4 causó opacidad detectable con pérdida de integridad superficial representada por la presencia de una capa blanda de esmalte, resultados encontrados en los tres tiempos de tratamiento, como lo reportan Ionta et. al en la simulación de lesiones erosivas en esmalte dental con una solución de ácido cítrico a pH 2,4 (66), y Nakata et. al, con ácido láctico a pH 5,0 pero por períodos más prolongados de hasta 7 semanas (67). Con respecto al grupo tratado con ácido láctico a pH 5,4 se observó un cambio de opacidad y pérdida de brillo en la superficie del esmalte sin comprometer la integridad superficial del mismo, detectada desde el tiempo 1 de tratamiento correspondiente a 7 días, al igual que lo observado por distintos al usar métodos químicos de desmineralización con soluciones de ácido láctico y acético a pH 4,8 (68,69,70) (Tabla 8.1).

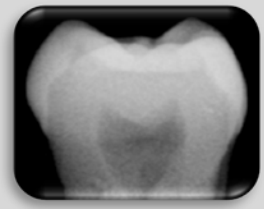
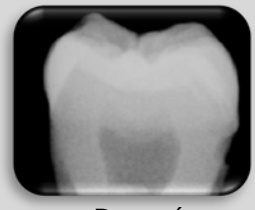
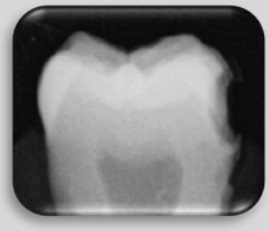
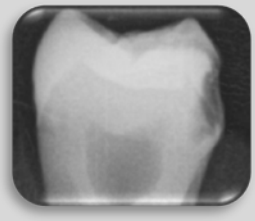
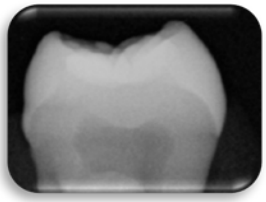
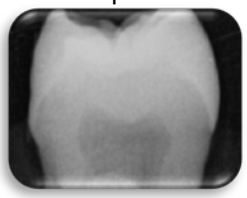
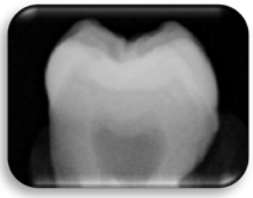
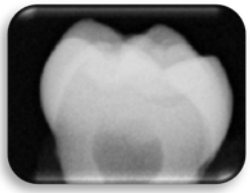
**Tabla 8.1. Cambios visuales pH 2.4 y pH 5.4. Estereomicroscopía 30x.**

| | 7 días | 15 días | 30 días |
|---|---|---|---|
| **pH 2,4** | |  | |
| **pH 5,4** | | |  |

- **Resultados radiográficos**

A nivel radiográfico en los especímenes tratados con solución a pH 2,4 se observan zonas radiolúcidas localizadas en los tres tercios del esmalte dental para el tratamiento a tiempos 1 y 2 (7 días y 15 días, respectivamente), y hasta el primer tercio dentinal en el grupo desmineralizado durante 30 días. Mientras que la desmineralización con solución ácida a pH 5,4 no fue detectable por evaluación directa de radiografía digital como se evidencia en la Tabla 8.2.

**Tabla 8.2.**Comparación radiográfica en tratamientos con ácido pH 2,4 y 5,4

| | 7 días | 15 días | 30 días |
|---|---|---|---|
| **pH 2,4** | Antes  Después | Antes  Después  | Antes Después  |
| **pH 5,4** | Antes  Después  | Antes  Después | Antes  Después |

Adicionalmente, con los datos obtenidos por el software de imágenes (Tabla 8.3) se realizó una comparación de la densidad de grises en la superficie de esmalte pretratamiento y postratamiento, mostrando una disminución de valores promedio correspondiente a la pérdida de mineralización de la zona tal como se muestra en la Tabla 8.3. En la literatura se encuentran reportes de la utilidad de tomas radiográficas en la identificación de zonas desmineralizadas en esmalte dental (71). Sin embargo usando la herramienta de densidad de grises que se propone en este estudio, se pueden

identificar lesiones más incipientes equiparable con lo que se consigue con métodos más complejos y costosos como la Tomografía de coherencia óptica (OCT) (72, 69), la microradiografía de barrido (TMR) (70) y la fluorescencia cuantitativa inducida por la luz (QLF) (69).

**Tabla 8.3** Análisis con software de imágenes. Ejemplo de resultados de tratamiento con ácido láctico pH 5,4 a tiempo 1.

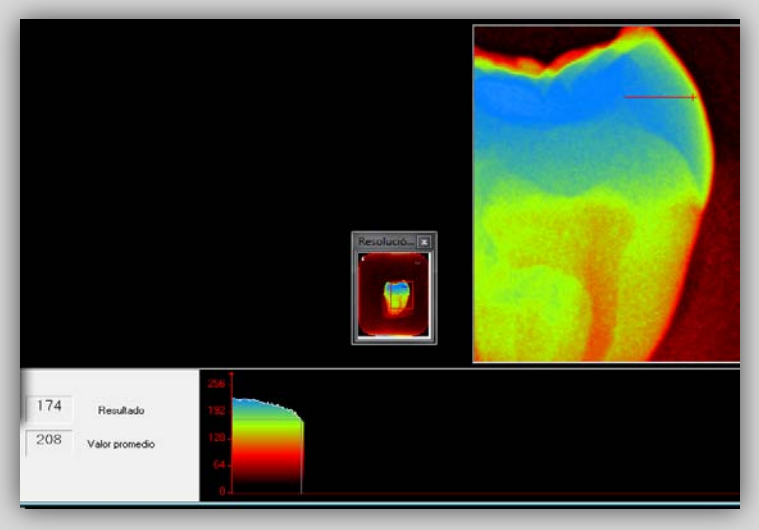
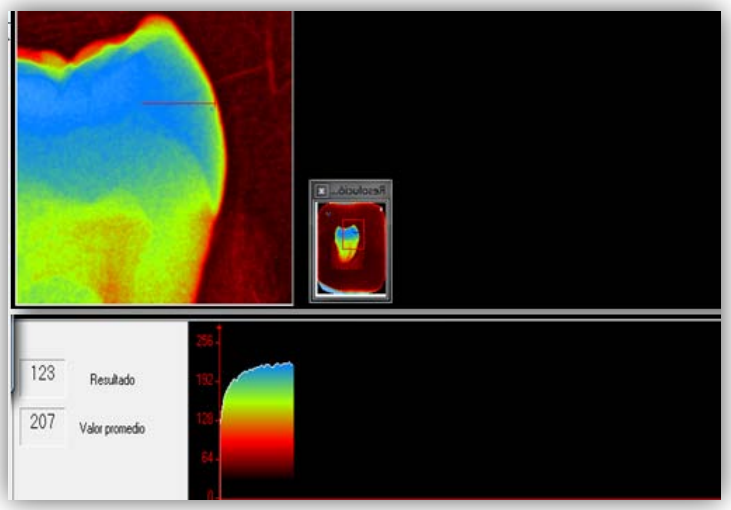
| | 7 días |
|---|---|
| **Pretratamiento** |   |
| **Postratamiento** |   |

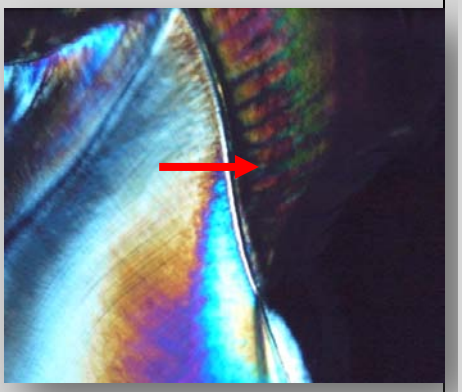
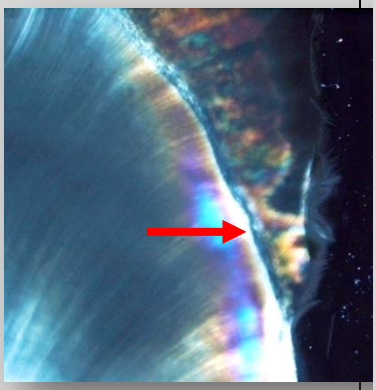
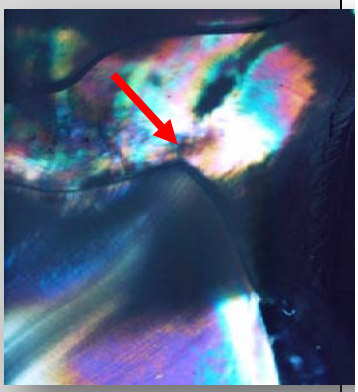
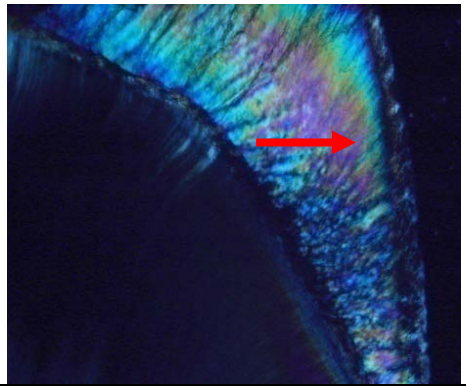
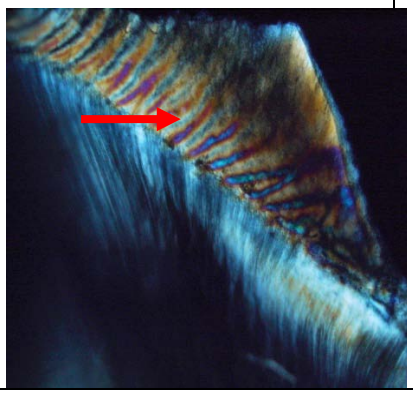
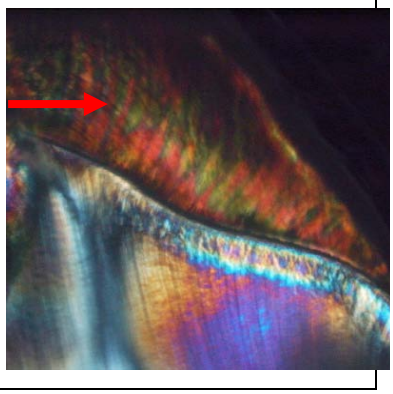
**Tabla 8.4**. Resultados cuantificación densidad de grises. D(n): diente; pH1: 2,4 – pH2: 5,4; T1: 7 días- T2: 15 días; T3: 30 días

| DENSIDAD DE GRISES | | | |
|---|---|---|---|
| | **INICIAL** | **FINAL** | **DIF. DENSIDAD DE GRISES** |
| **D1pH1T1** | 205 | 100 | 105 |
| **D2pH1T1** | 225 | 83 | 142 |
| **D3pH1T2** | 193 | 64 | 129 |
| **D4pH1T2** | 206 | 98 | 108 |
| **D5pH1T3** | 210 | 80 | 130 |
| **D6pH1T3** | 203 | 95 | 108 |
| **D7pH2T1** | 192 | 143 | 49 |
| **D8pH2T1** | 176 | 123 | 53 |
| **D9pH2T2** | 214 | 137 | 77 |
| **D10pH2T2** | 188 | 108 | 80 |
| **D11pH2T3** | 198 | 153 | 45 |
| **D12pH2T3** | 180 | 125 | 55 |

## ▪ Resultados histológicos

Por medio de las observaciones con microscopía óptica de polarización se comprobó el cambio estructural del esmalte dental resultante de la desmineralización, al igual que Miresmaeili et. al (73), aunque también por cambios en fluorescencia se pueden determinar pérdida de minerales por QLF (74). Los efectos de la solución con pH 2,4 se presentan con un amplio compromiso mineral con pérdida de estructura lo cual no es compatible con lesiones iniciales, contrario a lo encontrado en los especímenes desmineralizados con ácido a pH 5,4 puesto que muestran una alteración estructural a nivel subsuperficial desde los 7 días de exposición al tratamiento (Tabla 8.5).

**Tabla 8.5** Resultados con Microscopía óptica con luz polarizada. Tratamiento ácido láctico pH 2,4 y 5,4 (4x). Las flechas indican zonas de desmineralización.

| | 7 días | 15 días | 30 días |
|---|---|---|---|
| |  |  |  |
| |  |  |  |

## ▪ Manejo estadístico y análisis

Una de las variables respuesta del estudio fue la diferencia de la densidad de grises que se determinó a partir de la resta del valor inicial al valor final, es decir que se parte de dos muestras dependientes en el sentido que se midió la misma unidad experimental antes de haber aplicado el tratamiento y después de hacerlo. Estableciendo la hipótesis nula: tratamiento no presenta ningún efecto, frente a la hipótesis alternativa: si hay diferencias en las lecturas.

Realizando las pruebas de normalidad e igualdad de varianza (Shapiro Wilk y Prueba F respectivamente), se encuentra que las muestras provienen de una distribución normal

pero se rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas con una confianza del 95%. Con estos condicionamientos se realiza el test de igualdad de medias en que la hipótesis nula será que no se presentan diferencias entre las muestras en los diferentes periodos de tiempo frente a la hipótesis alternativa que plantea que la media de los dientes sin el tratamiento es mayor que la media después de haber aplicado el tratamiento. Con un estadístico t=8.9856 y 11 grados de libertad, se encuentra que la media de los dientes sin tratamiento es mayor que la media de los dientes tratados.

Las medias de la densidad de grises al inicio y al final son respectivamente 199.2 y 109.1, del test realizado se concluye con un nivel de confianza del 95%, que la media de la densidad de grises disminuyó después de haber aplicado el tratamiento.

- Índice de incidencia

Por otra parte, al existir una medición cuantitativa (medición de escala de grises) y el resto de las respuestas ordinales, se construyó un índice, esto con el fin de reunir en una sola variable de manera simultánea la incidencia de las cuatro respuestas (visual, radiográfico, cambio de grises, histológicos) en el resultado final del tratamiento. Para la construcción del índice de incidencia se utilizaron métodos estadísticos multivariados, específicamente el análisis factorial múltiple (AFM) que permite integrar variables cuantitativas y cualitativas. El método consiste en realizar una cuantificación óptima de las variables ordinales asignándoles valores numéricos a las categorías de tal forma que se respeten las restricciones de orden (Tabla 8.6).

**Tabla 8.6**. Resultados de categorización de resultados ordinales.

| | VISUAL | RADIOGRAFICO | HISTOLOGICO | DIF. DENSIDAD DE GRISES |
|---|---|---|---|---|
| **D1pH1T1** | 3 | 1 | 3 | 105 |
| **D2pH1T1** | 3 | 2 | 3 | 142 |
| **D3pH1T2** | 3 | 1 | 3 | 129 |
| **D4pH1T2** | 3 | 2 | 3 | 108 |
| **D5pH1T3** | 3 | 3 | 4 | 130 |
| **D6pH1T3** | 3 | 3 | 4 | 108 |
| **D7pH2T1** | 2 | 0 | 1 | 49 |
| **D8pH2T1** | 1 | 0 | 1 | 53 |
| **D9pH2T2** | 1 | 0 | 1 | 77 |
| **D10pH2T2** | 2 | 0 | 2 | 80 |
| **D11pH2T3** | 2 | 0 | 2 | 45 |
| **D12pH2T3** | 1 | 0 | 2 | 55 |

Finalmente se obtiene el índice ilustrado en la Tabla 8.7 para cada uno de los tratamientos aplicados:

**Tabla 8.7 Resultados de í**ndice de incidencia

| **Índice** | 1.32 | 1.12 | 1.1 | 0.8 | 0.76 | 0.75 | -0.69 | -0.69 | -1.05 | -1.06 | -1.14 | -1.23 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **pH** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| **Tiempo** | 3 | 1 | 2 | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 2 | 2 |
| **%A** | 100% | 93% | 92% | 82% | 80% | 80% | 29% | 29% | 16% | 16% | 13% | 10% |

Se tomó a la muestra con tratamiento a pH1 por un tiempo 3, como el estado con 100% de afectación por el tratamiento (%A) para así asignar un grado de afectación diferente para cada uno de los especímenes, construido a partir del índice.

Al obtener una única variable respuesta (índice de incidencia), se realizó el análisis de varianza. Previamente se verificaron algunos supuestos para darle la validez a las conclusiones del estudio. Se realizaron varios test para la validación del supuesto de normalidad, (Shapiro-Wilk, Anderson-Darling, Cramer-von Mises, Pearson chi-square), en ninguno de ellos se rechaza la hipótesis nula que plantea que los errores provienen de una población normalmente distribuida.

Finalmente se ejecutó el análisis de varianzas ilustrado en la Tabla 8.8

**Tabla 8.8** Análisis de varianza de desmineralización

| | **Grados de libertad** | **Suma de Cuadrados** | **Media** | **Estadístico F** | **Valor p** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Ph** | 1 | 11.449 | 11.449 | 197.323 | 6.40E-07 |
| **Tiempo** | 2 | 0.086 | 0.043 | 0.744 | 0.505 |
| **Residuales** | 8 | 0.464 | 0.058 | | |

De acuerdo con el análisis visual, radiográfico e histológico y teniendo en cuenta los resultados del análisis estadístico se concluyó que el método con ácido láctico a pH 5,4 con un tiempo de tratamiento de 7 días basado en la poca influencia de éste factor en la respuesta, es eficaz para crear una desmineralización superficial en esmalte dental, equivalente a lesiones desmineralizantes tempranas de esmalte dental al igual que las

reportadas por métodos más complejos en metodología, costos y tiempo como los de tipo biológico (75,76,77,78).

Por otro lado se obtuvieron lesiones de tipo erosivo con el pH 2,4. Lo cual también es valioso para apoyar y contribuir con el desarrollo de investigaciones en esa temática específica.

## 8.2 Tratamiento

En los procesos de difusión simple que ocurren entre medios homogéneos (agua, alcohol, gel, sólidos puros) (Figura 8.1), en donde una sustancia se transporta entre zonas según gradiente de concentración (Figura 8.2), se observan perfiles como muestra la Figura8.3:

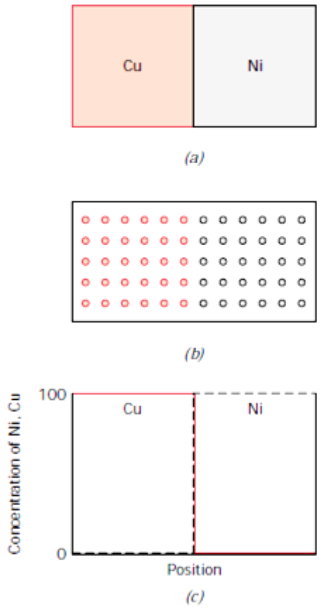



**Figura 8.1**.Difusión en sólidos (inicial). a. Estado inicial de dos placas de sólidos (Cu: cobre; Ni: níquel); b. representación de ubicación de átomos, respectivamente; c. representación de concentración de Cu y Ni según la localización uno al lado del otro (49).

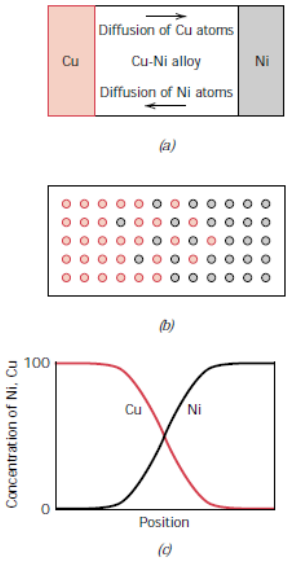



**Figura 8.2.** Difusión en sólidos (Final). a - b- c, representación de transporte de masa entre las dos placas de Cu y Ni después de aumento de temperatura (49).

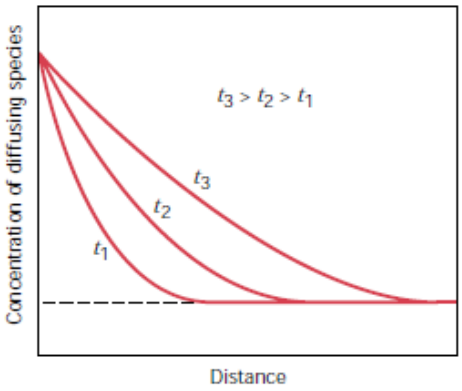
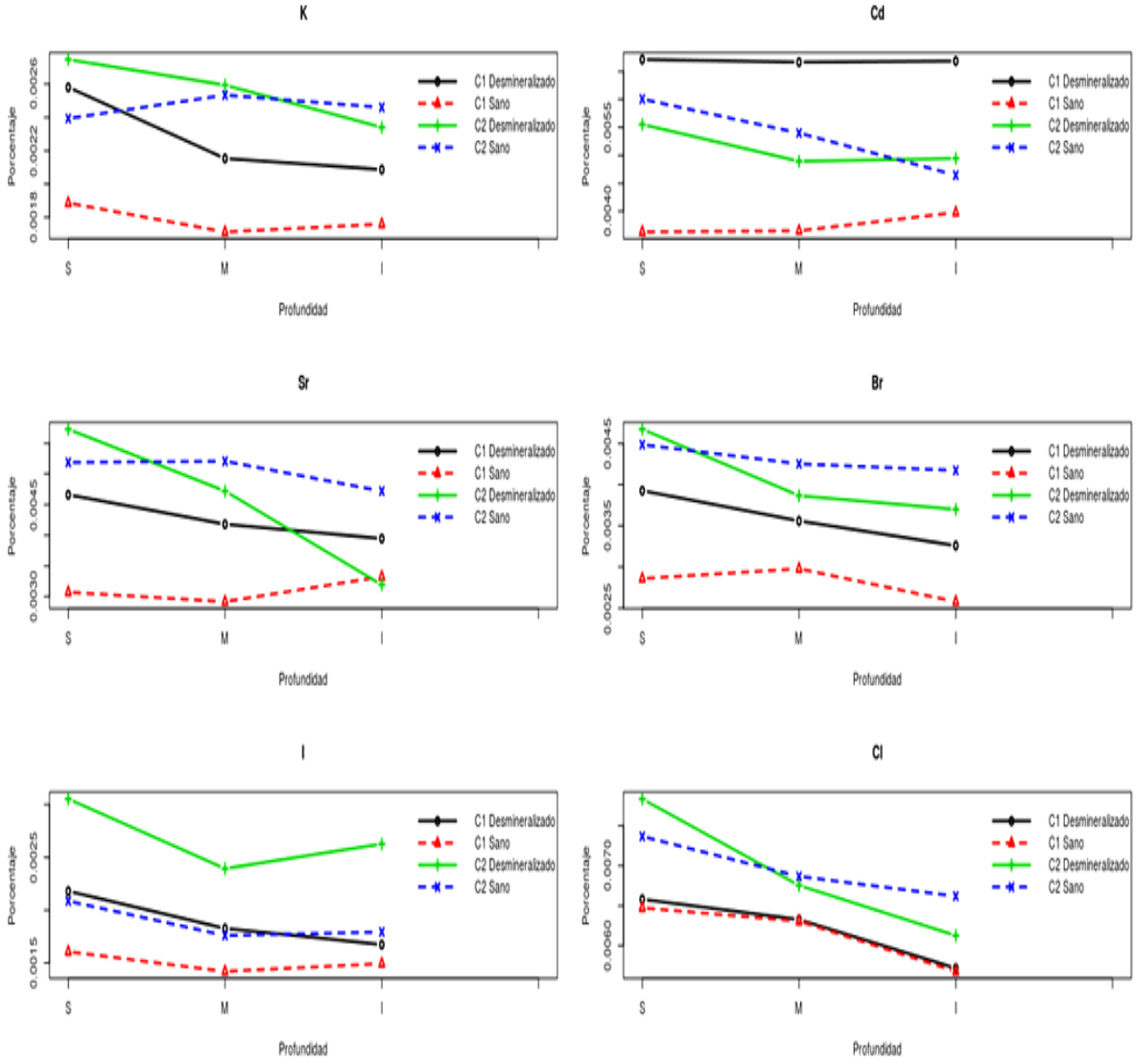



**Figura 8.3**. Ejemplo de perfiles de difusión simple (49).

Cuando existe difusión pura se obtienen pendientes negativas representativas de la concentración de la sustancia transportada, influenciada por las propiedades de la misma, a medida que transcurre el tiempo.

El análisis descriptivo de los resultados de la concentración de los iones en el esmalte dental, representado como porcentaje atómico promedio a los tres niveles de profundidad analizados, dio como resultado tres grupos gráficos de perfiles de difusión de los

elementos. Un grupo corresponde a los perfiles con promedio de los tres tiempos y los otros dos grupos de perfiles a la difusión, especificando el resultado según el tiempo, a concentración 1 y a concentración 2. Como se mencionará más adelante, el efecto del tiempo parece no tener influencia estadísticamente significativa sobre la respuesta difusiva de los elementos estudiados, por tal razón a continuación se analiza el primer grupo de perfiles (Gráfico 8.1) y los otros dos grupos se reportan en anexos (Anexo E y Anexo F).




**Gráfica 8.1** Perfiles de promedio de porcentaje atómico por elemento según concentración de solución indicadora y estado de mineralización del esmalte, con promedio de los tres tiempos.

En general se observa que los perfiles resultantes no se ajustan a los de una difusión pura, ya que se presentan distintos patrones. Esto puede deberse a distintas razones:

- El transporte de los iones puede ocurrir por difusión pero a través de diferentes vías (poros, espacio interprismático, defectos del esmalte, estructuras secundarias) (79) y en distintos medios (agua dentro de poro, gel del material inorgánico interprismático), lo que provoca una diversidad en la tendencia del perfil.
- En elementos como el Cl, K, y Sr, que presentan un perfil inicial en la estructura dental sin tratar, el perfil final de difusión encontrado se representa de la siguiente forma:

  $$PFD = pid + tto$$

  En donde el perfil final de difusión (PFD) es el resultado del perfil inicial de difusión (*pid*) y del tratamiento (*tto).* Es así como los perfiles finales podrían estar replicando los perfiles iniciales, si el tratamiento y las propiedades específicas del elemento no son suficientes para cambiar el estado inicial.
- Los perfiles pueden ser el reflejo de la intervención de otro tipo de procesos de transporte de masa (percolación, absorción capilar), estando influenciada también por la heterogeneidad de la estructura del esmalte entre individuos, entre especímenes y entre distintas zonas del esmalte en una misma pieza dental (superficie, medio, interno, cervical, oclusal, vestibular, etc.).

Sin embargo se pueden identificar ciertas respuestas, por un lado que existe una influencia del estado de mineralización del esmalte y la concentración de la solución indicadora sobre el porcentaje promedio atómico, aumentando el transporte de los iones en estado desmineralizado y a una concentración alta.

## 8.2.1 Pruebas de hipótesis

Para conocer si las diferencias entre los perfiles de difusión eran significativas y por lo tanto realizar las pruebas de nuestras hipótesis, se ajustó un modelo de regresión beta por el paquete betareg de R con nivel de significación ($\alpha$) de 0.05 (Tabla 8.9):

**Tabla 8.9** Prueba de hipótesis de difusión

| VARIABLE | K (p-valor) | Cd (p-valor) | Sr (p-valor) | Br(p-valor) | I (p-valor) | Cl (p-valor) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Intercepto** | 0.00177 (0) | 0.004472 (0 ) | 0.002651 (0) | 0.001561 ( 0 ) | 0.001689 (0) | 0.005027 (0) |
| **Profundidad** | -0.000253 (0.957 ) | -0.000676 (0.497 ) | -0.000322 (0.577 ) | -0.000449 (0.937 ) | -0.001024 (0.216 ) | -0.00046 ( 0.687 ) |
| **Desmineralizado** | 0.000292 (0.028 ) | 0.001357 (0 ) | 0.000332 (0.255 ) | 0.000276 (0.303) | 0.000599 (0.008 ) | 4e-06 (0.686) |
| **Tiempo** | -0,000002 (0.745 ) | 9.2e-05 (0.498 ) | 5.7e-05 (0.115 ) | 0.000128 (0.162 ) | 1.9e-05 (0.171 ) | 0.000149 (0.011 ) |
| **Concentración** | -0.000412 (0.157 ) | 0.000318 (0.833 ) | 0.001413 (0.093 ) | 0.001723 ( 0 ) | 0.001698 (0.006 ) | 0.00148 ( 0 ) |
| **Interacción** | 0.000007 (0.64 ) | -3.2e-05 (0.833 ) | -3.3e-05 (0.055 ) | -7.8e-05 ( 0.201 ) | -0.000119 (0.031 ) | -7.9e-05 (0.029 ) |

**Intercepto**: Estado de esmalte sano, promedio de tiempos, promedio de concentración, promedio de profundidades. **Profundidad**: superficial, medio, interno. **Tiempo**: tiempo de exposición (días). **Concentración**: C2. **Interacción**: Tiempo vs concentración.

- **H0(1): La difusión media es independiente de la concentración**

**H0** $\boldsymbol{\beta c = 0}$ **vs HA**$\boldsymbol{\beta c \neq 0}$

**βc**= Concentración

Para los iones Br- (p=0), I (p=0.006), Cl- (p=0) se rechaza la hipótesis nula, esto indica que la concentración de la solución indicadora influye en el promedio del porcentaje atómico, por lo que al tener una concentración alta de la solución, el porcentaje de difusión de los iones en el esmalte aumentó. Para iones como K+, se observa una relación inversamente proporcional con respecto a la concentración, sin embargo no es una respuesta estadísticamente significativa. Esto obedece a la primera ley de Fick, ya que indica que existe un flujo de masa en relación al gradiente de concentración de un soluto (48-50).

- **H0(2): La difusión media es la misma según el tiempo.**

**H0** $\boldsymbol{\beta T = 0}$ **vs HA**$\boldsymbol{\beta T \neq 0}$

**βT=** Tiempo

Estadísticamente parece que el tiempo no es un factor influyente en el promedio de porcentaje atómico de los iones (p= 0.05), con excepción del cloro en el que a medida que aumenta el tiempo aumenta el porcentaje de este elemento en el esmalte (p=0.001). Esto puede asociarse a que los tiempos de tratamiento escogidos fueron suficientes para la difusión de los iones, donde probablemente se consiguió un estado de equilibrio de concentración entre la solución indicadora externa y la estructura del esmalte dental.

- **H0(3): La difusión es independiente del estado del esmalte**

**H0** $\boldsymbol{\beta E = 0}$ **vs HA**$\boldsymbol{\beta E \neq 0}$

**βE=** Estado del esmalte

Al comparar el promedio de porcentaje atómico de los iones en esmalte sano y en esmalte desmineralizado, se encontró que en este último fue mayor para todos los iones y siendo estadísticamente significativa para los iones yodo (p=0.028), cadmio (p=0) y potasio (p=0.008). Esto se podría entender teniendo en cuenta que la porosidad del esmalte dental oscila entre 10 a 300 angstroms de diámetro (80), la cual aumenta considerablemente en una estructura con desmineralización, creando vías de acceso más abiertas para el intercambio con el medio.

- **H0(4): No existe efecto medio en la difusión cuando se tiene simultáneamente el efecto del tiempo y la concentración.**

**H0** $\boldsymbol{\beta CT = 0}$ **vs HA**$\boldsymbol{\beta CT \neq 0}$

**βCT=** Interacción de concentración y tiempo

No se encuentra evidencia que permita establecer efecto de la interacción del tiempo y la concentración en la difusión de los iones K, Cd, Br. Contrario a lo encontrado en los iones Sr (p=0.05), I (p=0.031), Cl (p= 0.029) en donde al aumentar el tiempo de tratamiento y la concentración de la solución indicadora disminuye la entrada de estos a la estructura adamantina.

## 8.2.2. Análisis de difusión

- **Difusión según carga neta de iones en esmalte sano (ES) y en esmalte con desmineralización inducida (EDI).**

Para determinar la difusión según la carga neta de los iones se compararon los iones monovalentes con los bivalentes de la solución indicadora:

**K+ vsSr++**

**K+vs Cd++**

**Tabla 8.10** Promedio de porcentaje atómico de K+ vs Cd++ en ES

| Sano | Solución indicadora a Concentración 1 | Solución indicadora a Concentración 2 |
|---|---|---|
| **K+** | 0.178 | 0.246 |
| **Cd++** | 0.375 | 0.535 |

**TABLA 8.11** Promedio de porcentaje atómico de K+ vs Sr++ en ES

| Sano | Solución indicadora a Concentración 1 | Solución indicadora a Concentración 2 |
|---|---|---|
| **K+** | 0.178 | 0.246 |
| **Sr++** | 0.310 | 0.504 |

En las tablas 8.10 y 8.11, se observa que los iones monovalentes presentan en promedio menor porcentaje de entrada en un esmalte sano en comparación con iones bivalentes como el Cd++ y Sr++.

**Tabla 8.12** Promedio de porcentaje atómico de K+ vs Cd++ en EDI

| Sano | Solución indicadora a Concentración 1 | Solución indicadora a Concentración 2 |
|---|---|---|
| **K+** | 0.227 | 0.256 |
| **Cd++** | 0.669 | 0.513 |

**Tabla 8.13** Promedio de porcentaje atómico de K+ vs Sr++ en EDI

| Sano | Solución indicadora a Concentración 1 | Solución indicadora a Concentración 2 |
|---|---|---|
| **K+** | 0.227 | 0.256 |
| **Sr++** | 0.426 | 0.454 |

En esmalte desmineralizado (Tablas 8.12 y 8.13), el promedio del porcentaje atómico de todos los iones es mayor manteniéndose el comportamiento de mayor cantidad de iones bivalentes en contraste con el monovalente.

- **Difusión según tamaño no solvatado y polaridad de iones en ES y EDI**

El tamaño no solvatado de un ion hace referencia al radio iónico. Partiendo de esto, se encontró que los promedios de porcentaje atómico de los aniones en esmalte sano (Tabla 8.14) y desmineralizado (Tabla 8.15), siguen un orden según el radio iónico. En la medida que el radio iónico es mayor la difusión es menor para dicho elemento:

**I- < Br- < Cl-**

**Tabla 8.14** Promedio de porcentaje atómico de aniones en ES

| | Radio iónico (A) | Solución indicadora a Concentración 1 | Solución indicadora a Concentración 2 |
|---|---|---|---|
| **I-** | 2.20 | 0.150 | 0.188 |
| **Br-** | 1.96 | 0.280 | 0.430 |
| **Cl-** | 1.81 | 0.615 | 0.695 |

**Tabla 8.15** Promedio de porcentaje atómico de aniones en EDI

| | Radio iónico (A) | Solución indicadora a Concentración 1 | Solución indicadora a Concentración 2 |
|---|---|---|---|
| **I-** | 2.20 | 0.189 | 0.269 |
| **Br-** | 1.96 | 0.358 | 0.408 |
| **Cl-** | 1.81 | 0.621 | 0.690 |

A demás si se comparan los resultados de la columna de concentración 1 (baja) y con los resultados de la columna de concentración 2 (alta), el promedio de porcentaje atómico es mayor en la medida que la concentración aumenta tanto en esmalte sano como en desmineralizado, manteniéndose la dependencia del tamaño de los radios iónicos.

Si se evalúa el comportamiento de los cationes en esmalte sano y desmineralizado, el porcentaje atómico promedio de difusión se mantiene directamente relacionado con los radios iónicos, siendo mayor la entrada de los iones con radio atómico menor, como se muestra en las tablas 8.16 y 8.17, esto se da por la capacidad de fácil acceso al sistema de poros en el esmalte, que oscila de 10 a 300 angstroms de diámetro (81,82):

**K+ < Sr++< Cd++**

**Tabla 8.16** Promedio de porcentaje atómico de cationes en ES

| | **Radio iónico (A)** | **Solución indicadora a Concentración 1** | **Solución indicadora a Concentración 2** |
|---|---|---|---|
| **K+** | 1.33 | 0.178 | 0.246 |
| **Sr++** | 1.12 | 0.310 | 0.504 |
| **Cd++** | 0.97 | 0.375 | 0.535 |

**Tabla 8.17** Promedio de porcentaje atómico de cationes EDI

| | **Radio iónico (A)** | **Solución indicadora a Concentración 1** | **Solución indicadora a Concentración 2** |
|---|---|---|---|
| **K+** | 1.33 | 0.227 | 0.256 |
| **Sr++** | 1.12 | 0.426 | 0.455 |
| **Cd++** | 0.97 | 0.669 | 0.513 |

Entonces, el promedio de porcentaje atómico sigue un orden de acuerdo al radio iónico dentro de cada grupo de iones (cationes, aniones).

Pero al observar las tablas 8.18 y 8.19 que muestra la distribución de los iones según la polaridad y el radio atómico en ES y EDI respectivamente, y teniendo en cuenta que los aniones presentan un radio atómico mayor al de los cationes debido a la pérdida de electrones que sufren estos últimos, si comparamos la cantidad atómica encontrada en

promedio de los aniones en contraste con los cationes no siguen un orden. Esto podría relacionarse en que además del radio atómico puede estar influyendo la capacidad de hidratación de cada uno de los iones, que con llevaría a cambios en su tamaño final y por ende en su movilidad.

**Tabla 8.18** Promedio de porcentaje atómico de los iones distribuidos según su polaridad y radio atómico en ES

| | Radio iónico (A) | Solución indicadora a Concentración 1 | Solución indicadora a Concentración 2 |
|---|---|---|---|
| **I-** | 2.20 | 0.150 | 0.188 |
| **Br-** | 1.96 | 0.280 | 0.430 |
| **Cl-** | 1.81 | 0.615 | 0.695 |
| **K+** | 1.33 | 0.178 | 0.246 |
| **Sr++** | 1.12 | 0.310 | 0.504 |
| **Cd++** | 0.97 | 0.375 | 0.535 |

**Tabla 8.19** Promedio de porcentaje atómico de los iones distribuidos según su polaridad y radio atómico en EDI

| | Radio iónico (A) | Solución indicadora a Concentración 1 | Solución indicadora a Concentración 2 |
|---|---|---|---|
| **I-** | 2.20 | 0.189 | 0.269 |
| **Br-** | 1.96 | 0.358 | 0.408 |
| **Cl-** | 1.81 | 0.621 | 0.690 |
| **K+** | 1.33 | 0.227 | 0.256 |
| **Sr++** | 1.12 | 0.426 | 0.455 |
| **Cd++** | 0.97 | 0.669 | 0.513 |

- **Difusión según radios hidrodinámicos efectivos**

Al realizar la búsqueda en literatura de los radios hidrodinámicos efectivos de los iones, se encontraron distintas limitaciones en la información, ya que la información que se reporta no es completa de todos los iones, y al comparar las distintas fuentes los valores son distintos, lo cual se puede explicar por la dependencia de las condiciones de medida (pH, agitación, temperatura, concentración y medio en que están los iones) (83).

Es por esto que se decidió calcular el radio hidrodinámico de cada ion, por medio de las ecuaciones de Stokes – Einstein, Nerst- Einstein, entre otras (83), sin embargo para resolver dichas ecuaciones la literatura tampoco reporta información completa, dando

para algunos elementos datos de sus movilidades iónicas, coeficientes de difusión, para otros sus números de transporte, radios hidratados, o conductividad electrolítica, lo cual imparte una alta variabilidad ya que las condiciones entre los estudios, que informan dichos valores, no fueron las mismas ni se desarrollaron bajo la misma metodología. Es así como se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 8.20):

**Tabla 8.20** Radios hidrodinámicos efectivos e iónicos de los elementos de la solución indicadora.

| Iones | Radio hidrodinámico efectivo (A) | Radios iónicos (A) |
|---|---|---|
| **Br-** | 1.05 | 1.96 |
| **I-** | 1.09 | 2.20 |
| **Cl-** | 1.20 | 1.81 |
| **Sr++** | 2.75 | 1.12 |
| **Cd++** | 3.04 | 0.97 |
| **K+** | 3.31 | 1.33 |

Lo que se esperaba es que los radios hidrodinámicos en principio sean mayores que los radios iónicos, lo que se puede observar en los cationes. Pero lo obtenido en los aniones es totalmente contradictorio, pues los cálculos dieron contrario a lo que debería ser por definición. Ésta situación no se debe a un error de fórmula, más bien es algo que llama la atención y por lo que tal vez en literatura no se encuentran datos al respecto reportados de aniones.

Las condiciones del presente estudio (alta concentración de iones en solución acuosa, transporte en esmalte dental de estructura heterogénea, solución compuesta con distintas sales), imposibilita la comparación y discusión adecuada con los datos que se reportan en literatura los cuales provienen de condiciones totalmente distintas (dilución infinita, transporte en agua, soluciones puras de iones), sumado con lo contradictorio de los datos calculados.

# 9. Conclusiones

Los procesos de transporte de iones en el esmalte dental siguen mecanismos complejos, por la propia heterogeneidad estructural y composicional (material orgánico, inorgánico, agua).

A pesar de esto, se puede concluir que:

- En esmalte dental desmineralizado los mecanismos de transporte de masa tienden a ser más de tipo difusivo.
- La difusión en el esmalte dental sano y desmineralizado siguen más de cerca las distribuciones de patrones de difusión según gradiente de concentración.
- Disminución de la mineralización y por consiguiente aumento en la porosidad del esmalte dental influyen en el porcentaje atómico difundido hacia este.
- Se podrían conseguir niveles apreciables de los iones en el esmalte dental a tiempos más cortos que los evaluados en este estudio.
- El radio atómico de un ion influye en su capacidad para difundir en el esmalte dental, siendo el porcentaje atómico encontrado dentro de la estructura inversamente proporcional a su radio atómico.
- La comparación con los radios hidrodinámicos efectivos no se pudo explorar debido a la falta de información reportada y manejada en condiciones similares a la presente investigación.

# 10. Recomendaciones

Para futuros estudios:

- Es necesario realizar mediante un método de análisis no destructivo la identificación de defectos y topografía del esmalte dental macro y microscópicos de los especímenes para tenerlos en cuenta a la hora de realizar discusión de resultados.
- Aumentar el número de zonas de profundidad de esmalte dental a analizar.
- Realizar tratamiento con solución indicadora a tiempos más cortos para comprobar independencia de este factor en la difusión de iones en esmalte dental.
- Aumentar el número de muestras con las que se pueda tener resultados con mayor índice de confianza debido a la alta variabilidad innata de la estructura dental.
- Realizar análisis de estructura de hidroxiapatita posterior a tratamiento con solución indicadora para determinar posible interacción y cambio estructural de ésta debido a la entrada de los iones.
- Calcular los radios hidrodinámicos en condiciones reales a las usadas en los tratamientos (temperatura, concentración, en esmalte dental, en conjunto con los iones usados).

# 11. Aplicaciones clínicas

Al conocer factores que influyen en el intercambio iónico del esmalte dental con su medio, tales como el nivel de mineralización del sustrato, la polaridad, el tamaño de radio iónico e hidratado de los elementos utilizados, se crean bases experimentales valiosas que permitirán cambiar distintas propiedades del esmalte dental, aplicables para la eficacia y efectividad de los tratamientos no invasivos de alteraciones tempranas de la composición inorgánica adamantina (erosiones, caries incipientes, sensibilidad dental).

# Anexo A: Consentimiento informado

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA USO DE DIENTES DONADOS COMO ESPECÍMENES DE INVESTIGACIÓN**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

HOJA DE REGISTRO: _____

FECHA: ____, _____, _____.

Yo: _____ con CC _____

En pleno uso de mis facultades mentales dono voluntariamente a la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA el(los) diente(s) que me extrajeron por indicación odontológica, para que sea(n) utilizado(s) en la investigación de tipo experimental in vitro: "**Estudio in vitro de la difusión de algunas especies químicas en esmalte dental humano",** realizada por la estudiante de Maestría en odontología **Gelen Patricia Bernett Zurita** y bajo la dirección del profesor Edgar Delgado Mejía y la co-dirección de la profesora Carolina Torres Rodríguez. El equipo de investigación se compromete a mantener bajo estricta confidencialidad la información suministrada por el donante. Se establece y aclara que la recolección es Sin ánimo de lucro.

Estos dientes son propiedad de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.

Si el donante no es quien firma este consentimiento. El motivo por el cual no lo hace es:

Ser menor de edad _____ Presentar discapacidades mentales _____ Otras _____

Descripción _____

Relación del firmante con el donante: _____

He leído claramente el documento, me han explicado el proceso al que serán sometidos los dientes donados. Confirmo mi donación voluntaria.

_____

CC.

Este consentimiento puede ser revocado libremente por el paciente, en caso de que lo considere necesario.

Se da cumplimiento al decreto 2493 de 2004 acerca de la donación de órganos del ministerio de Protección social de la Republica de Colombia. Se realiza con la guía de la Organización Mundial de la salud (OMS).

# ANEXO B: Cartilla informativa

**ESTUDIO IN VITRO DE LA DIFUSIÓN DE ALGUNAS ESPECIES QUÍMICAS EN ESMALTE DENTAL HUMANO**

CARTILLA INFORMATIVA: USO DE DIENTES PARA INVESTIGACIÓN

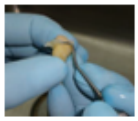
Señor (a) donante, _____

el (los) diente (s) que acaba de donar, serán utilizados en un estudio de investigación y serán sometidos a los siguientes tratamientos una vez extraídos.

Esta investigación tiene lugar en la universidad nacional de Colombia, si tiene alguna duda puede comunicarse con el grupo de investigación GRAMO: 3202534407; gpbernettz@unal.edu.co

**1. FASE DE DESINFECCION Y CONSERVACION :**

Se obtienen los dientes



Se procede a limpiar

se almacena en cloramina T para su conservación

**2. FASE DE EXPERIMENTACIÓN**

Se cortaran a la mitad los dientes para su análisis al microscopio, después de aplicarle dos tipos de sustancias.

# Anexo c: Hoja de registro de actividades

**HOJA DE VIDA DE DIENTES DONADOS COMO ESPECÍMENES DE INVESTIGACIÓN.**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

REGISTRO: _____

| FECHA | PROCEDIMIENTO | OBSERVACIONES |
|---|---|---|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

# ANEXO D: Registro clínico de dientes donados

**REGISTRO CLÍNICO DE DIENTES DONADOS**
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Nº DE REGISTRO_____ ESTUDIO REALIZADO POR _____**

Fecha (dia, mes , año) _____,_____,_____
Clínica_____ Semestre_____
Odontólogo o estudiante tratante_____

**INFORMACION DEL DONANTE (Obtenida del donante o de su Historia Clinica)**

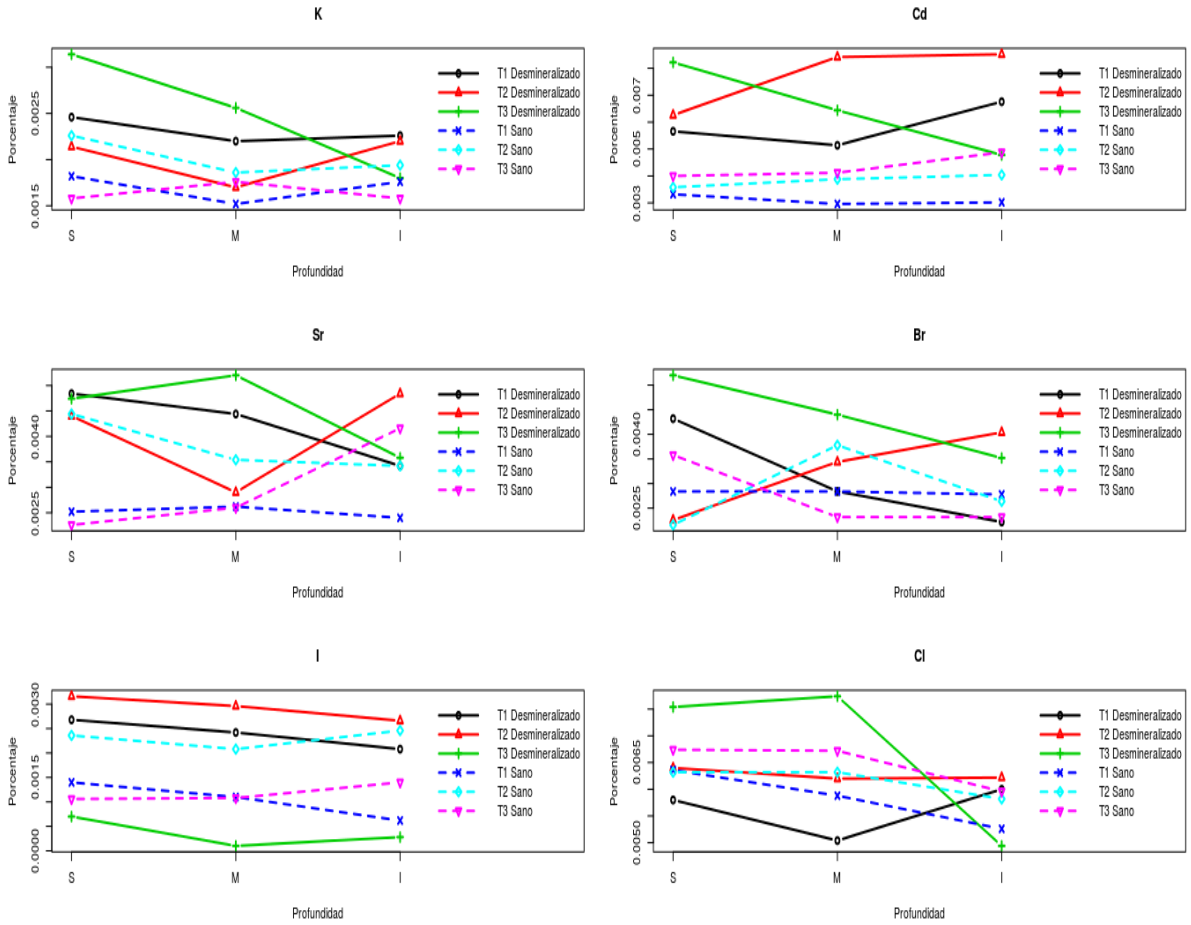
Nombre_____ _Id:_____
Edad (años)_____ Raza_____ _____ Género (M masculino, F femenino)_____
Dirección de donante_____
Teléfono _____ Celular_____
Lugar de Nacimiento_____ Fecha de Nacimiento ____,_____,_____
Lugar donde ha vivido los ultimos 5 años _____ Estrato socioeconómico _____
Existencia de trastornos- habitos-alimentarios (Incluido consumo, gaseosas, tinto, vino, cigarrillo, cítricos_____
Uso de crema, enjuagues _____
Consumo de té (verde-Rojo) Si_____ No ____ Consumidor Frecuente Si_____ No_____
Uso de bebidas carbonatadas (Redbull) Si ___ No___Consumidor Frecuente Si ____ No ____
Antecedentes Médicos _____
Antecedentes Odontológicos _____
Motivo de la Exodoncia_____ Diente (Nùmero) _____

**DESCRIPCION DE HALLAZGOS DEL ESPECIMEN**

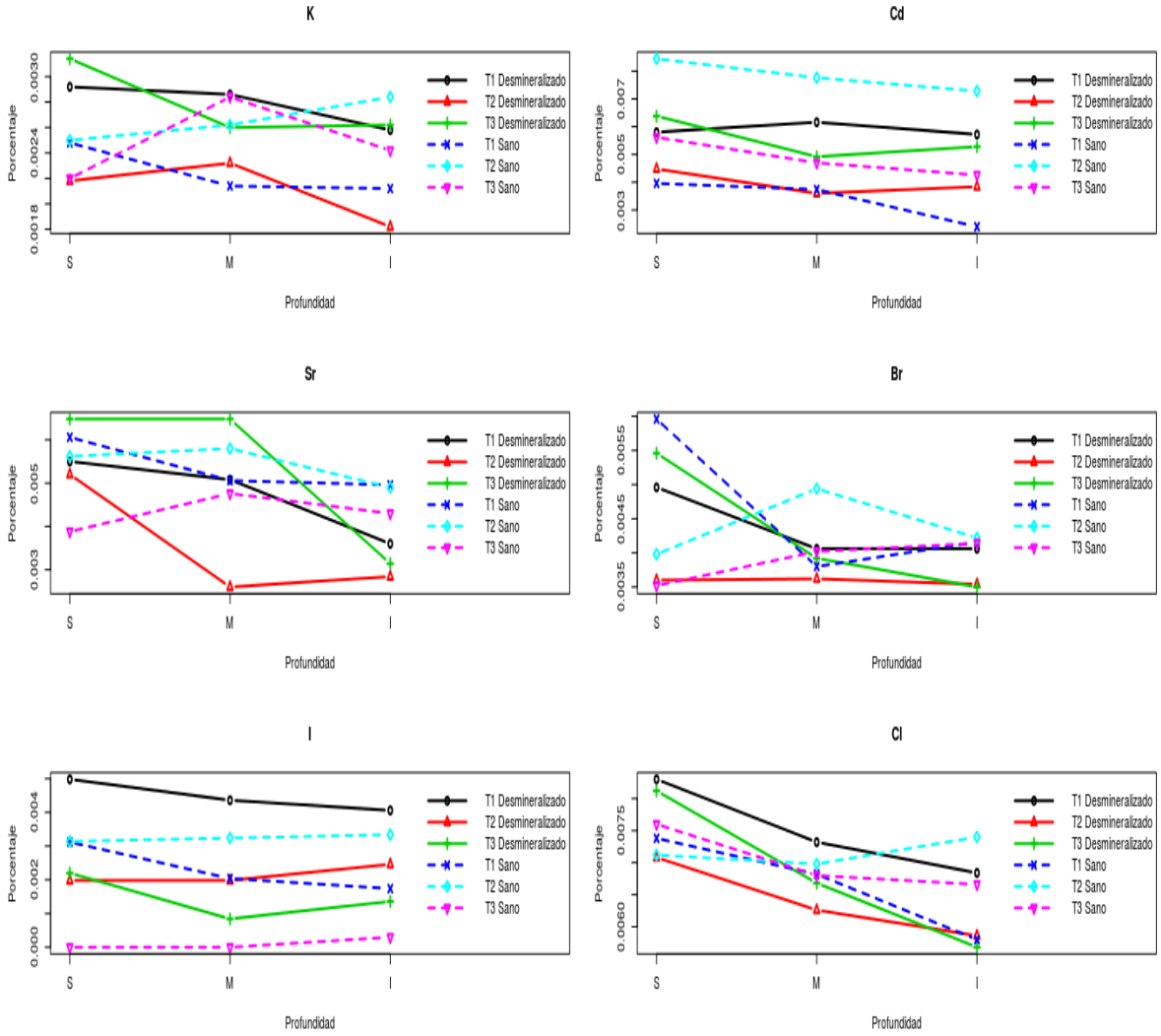
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

El paciente y el odontològo tratante autorizan revisar la historia clìnica para obtener estos datos.

# Anexo E: Perfiles de promedio de porcentaje atómico por elemento según tiempo de tratamiento y estado del esmalte. Concentración 1.



# Anexo F: Perfiles de promedio de porcentaje atómico por elemento según tiempo de tratamiento y estado del esmalte. Concentración 2



# Referencias bibliográficas

1. Reyes G. Estudio del esmalte dental humano por microscopía electrónica y técnicas afines. Rev. LatinAm. Metal. Mat. 2001; 21(2).

2. Tormo J, Bolaños R, Miranda Z. Ultraestructura superficial del esmalte dental humano observado al microscopio electrónico de rastreo. Rev. Cost. Cienc. Méd. 1986; 7(1):23-28.

3. Casanova-Rosado AJ, et al. Impacto de la posición socioeconómica sobre los defectos de desarrollo del esmalte en dentición primaria. Rev. CES Odont. 2012; 25(1):22-31.

4. Heredia C. Sellantes de fosas y fisuras: Revisión de las técnicas de aplicación clínica. Rev Estomatol Herediana. 1998; 7-8(1-2):36-39.

5. Flamee S, et al. Effect of a chlorhexidine/thymol and a fluoride varnish on caries development in erupting permanent molars: a comparative study. Eur Arch Paediatr Dent. Jun 2015; 10.

6. Villena R, Tenuta L, Cury JA. Effect of APF Gel Application Time on Enamel Demineralization and Fluoride Uptake In Situ. Braz. Dent. J. 2009; 20(1):37-41.

7. ADA Council on Scientific Affairs. Professionally applied topical fluoride: evidence-based clinical recommendations. JADA 2006; 137(8):1151-9.

8. Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Fluoride gels for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Database Syst Rev. 2002; 2.

9. Simeone S. Usos y efectos del fosfato de calcio amorfo (FCA) en la odontología restauradora y preventiva. Acta Odontol Venez. 2010; 48(3).

10. Cedillo J. Uso de los derivados de la caseína en los procedimientos de remineralización. Rev ADM. 2012; 69(4):191-199.

11. Malacarne J, et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. Dent Mater. 2006; 22:973-980.

12. Hardwick J L, Fremlin J H. Isotope Studies on the Permeability of the Dental Enamel to Small Particles and Ions. Proc R Soc Med. Sept 1959; 52(9):752–758.

13. Castellanos JE, Marín LM, Úsuga MV, Castiblanco GA, Martignon S. La remineralización del esmalte bajo el entendimiento actual de la caries dental. Univ Odontol. Jul-Dic 2013; 32(69): 49-59.

14. Shellis RP, Dibdin GH. Enamel microporosity and its functional implications; in Teaford MF, Smith MM, Ferguson MWJ (EDS): Development, Function and Evolution of Teeth. New York, Cambridge University Press, 2000; 242–25.

15. Mihu CM, Dudea D, Melincovici C, Bocsa B. Tooth enamel, the result of the relationship between matrix proteins and hydroxyapatite crystals. Appl. Med. Inform. 2008; 23(3-4):68-72.

16. Simmer JP, Fincham AG. Molecular Mechanisms of Dental Enamel Formation. Crit Rev Oral Biol Med. 1995; 6(2):84-108.

17. Rauth RJ, Potter KS, Ngan AY, Saad DM, Mehr R, Luong VQ, et. Al. Dental enamel: genes define biomechanics. J Calif Dent Assoc. 2009; 37(12):863-8.

18. Infante Contreras, C. Fundamentos para la evaluación del crecimiento, desarrollo y función craneofacial. 2009. [Fecha de consulta: 24 de mayo 2015]. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Capítulo 9. Disponible en: http://www.bdigital.unal.edu.co/634/#sthash.Fwvhktem.dpuf.

19. Sorkin B, Wang M, Dobeck J, Albergo K, Skobe Z. The Cadherin–Catenin Complex Is Expressed Alternately with the Adenomatous Polyposis Coli Protein During Rat Incisor Amelogenesis. J Histochem Cytochem. 2000; 48:397-406.

20. Dorozhkin SV. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. J Mater Sci. 2007; 42:1061–1095

21. Valencia R, Espinosa R, Ceja I, Marín A. Structural characteristics of human enamel crystals: Mechanisms of Remineralization. RODYB. 2013; 2 (3).

22. García-Garduño MV, Reyes - Gasga J. La hidroxiapatita. Aplicación e importancia. TIP Rev. Esp .Cienc. Quím. Biol. 2006; 9(2):90-95.

23. Oliveira M, Sander H. Synthetic Tooth Enamel: SEM Characterization of a Fluoride Hydroxyapatite Coating for Dentistry Applications. Mat. Res. 2007; 10 (2):115-118.

24. He L, Swain M. Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics. J Mech Behav Biomed Mater. 2008:18–29.

25. Cui F, Ge J. New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale. J Tissue Eng Regen Med. 2007; 1:185-191.

26. Bingbing A, et. al. The role of property gradients on the mechanical behavior of human enamel. J Mech Behav Biomed Mater. 2012; 9:63-72.

27.Thylstrup A, Fejerskov O. Clinical and pathological features of caries dental. Text book of cariology. 2 ed. Copenhagen: Editorial Munksgaard; 1994.

28. Duque, J, Pérez J, Hidalgo-Gatol. Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. Rev Cubana Estomatol. 2006; 43(1).

29. Dibdin G. The Internal Surface and Pore Structure of Enamel.J Dent Res.1969; 48:771

30. Sabel N, Robertson A, Nietzsche S. Demineralization of Enamel in Primary Second Molars Related to Properties of the Enamel. The Scientific World Journal 2012: 8.

31. Domínguez-Medina N, González-López S, Menéndez-Núñez M. Estudio de las vías de difusión de la lesión de mancha blanca del esmalte. RCOE 2002; 7(5):469-476.
32. Amerise C, et al. Análisis Cualitativo y Cuantitativo de las Laminillas del Esmalte Dentario Humano. Rev dent Chile. 2005; 96(3):26-29.

33. Monge JM, Tillieret AM, Mann AE. Perikymata number and spacing on early modern human teeth: evidence from Qafzeh cave, Israel. Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris, n.s., t. 2006; 18(1-2):25-33.

34. Reyes-Gasga J. Observación del esmalte dental humano con microscopia electrónica. Rev Tame. 2013; 1(3):90-96.

35. Monterde MA, et. al. Desmineralización-remineralización del esmalte dental. Revista ADM 2002; 59(6):220-222.

36. Carrillo C. Desmineralización y remineralización El proceso en balance y la caries dental. Rev ADM. 2010; 67(1):30-2.

37. Cedillo J. Infiltrant Resins: A new option for the treatment of non-cavitated carious lesions in enamel. Rev ADM. 2012; 1:38-45.

38. Robinson C, Shore R, Brookes S, Strafford S, Wood S,Kirkham J. The Chemistry of Enamel Caries. CROBM. 2000; 11:481.

40. Garrigó A M, Sardinas A S, Gispert A E y cols. Guías Prácticas de Caries Dental. 2002

41.Tenuta LMA, Fernández CE, Brandão ACS, Cury JA. Titratable acidity of beverages influences salivary pH recovery. Braz Oral Res [online]. 2015;29(1):1-6

42. Gomes MA. Sistemas adhesivos auto grabadores en esmalte: ventajas e inconvenientes. Av.Odonto estomatol. 2004; 20-4:193-198.

43. Flores-Yáñez C, et al. Análisis del Grabado Dental Utilizando el Microscopio. Información Tecnológica. 2009; 20(2).

44. Pinto CF, Oliveira R, Cavalli V, Giannini M. Peroxide bleaching agent effects on enamel surface microhardness, roughness and morphology. Braz Oral Res. 2004;18:306-311.

45. Perdigão J, Francci C, Swift EJ Jr, Ambrose WW, Lopes M. Ultra-morphological study of the interaction of dental adhesives with carbamide peroxide-bleached enamel. Am J Dent. 1998; 11:291-301.

46. Turkun M, Sevgican F, Pehlivan Y, Aktener BO. Effects of 10% carbamide peroxide on the enamel surface morphology: a scanning electron microscopy study. J Esthet Restor Dent. 2002; 14:238-244.

47. Cengel Y, Boles M. Termodinámica. 7ma Ed. McGraw-Hill. Cap. 14: 773-810

48. Tinoco I, Sauer K, Wang J. Physical Chemistry: Principles And Applications In Biological Sciences. 3ra Ed. Prentice- Hall,1995.Cap. 6: 268-282.

49. Callister W. Fundamentals of Materials Science and Engineering. 5ª ed. Wiley. 2000.

50. Bronshtein I, Semendiaev K. Curso Química Física, Tomo I. 2 Ed. Moscu. Mir, 1977.

51. Gómez C, Viruela R. Conductividad De Las Disoluciones Electrolíticas. Laboratorio Química Física I Curso 2009-2010.

52. De Oliveira H. Conducción Iónica Y Electrólitos Sólidos. Universidad Estadual de Campinas, instituto de química. 2001.

53. Raisman JS, González AM. Introducción: Principios de Microscopía.2006. [fecha de consulta: 30 de marzo 2015]. Disponible en: http:// www.biología.edu.ar.

54. Nothnagle PE, Chambers W, Davidson MW. Introduction to Stereomicroscopy. 2012. [Fecha de consulta 29 de marzo 2015]. Disponible en: http://www.microscopyu.com/articles/stereomicroscopy/stereointro.html

55 Raith M, Raase P, Reinhardt J. Guía Para La Microscopía De Minerales En Lámina Delgada. 2da Ed. Cap 1. 2012.

56 Raith Mm, Raase P, Reinhardt J. Guía Para La Microscopía De Minerales En Lámina Delgada. 2da Ed. Cap 4. 2012

57. Ojeda J. Métodos De Microscopía Electrónica De Barrido En Biología. Universidad De Cantabria, 1997.Cap 2: 43-52.

58. Ojeda J. Métodos De Microscopia Electrónica De Barrido En Biología. Universidad De Cantabria. 1997. Cap 1: 21-38.

59. Vasquez G, Echevarría O. Introducción A La Microscopia Electrónica Aplicada A Las Ciencias Biológicas Noguez. 1ra Ed. México, 2002.

60. Martinez A. Microanalisis Por Dispersión De Energías De Rayos-X (XEDS) Conceptos Básicos. Servicio de Microscopía Electrónica, SCAI. Universidad De Malaga. 2010. http://www.uma.es/sme/

61. Mannheimer W. Microscopia Dos Materiais: Uma Introdução. E-Papers Servicos Editorials, 2002: Cap. 10.

62. González LC, Úsuga MV, Torres C, et al. Biobanco de dientes humanos para investigación en odontología. Acta Odontológica Colombiana [en línea] 2014, [fecha de consulta: 15 de julio 2014]; 4(1): 9-21. Disponible en: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actaodontocol

63. Santiago AM, Torres-Rodríguez C, Delgado E. Tesis: Diseño de un método de selle reversible de una superficie dental para estudios de difusión in-vitro. 2015.

64. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013. Disponible en: http://www.R-project.org/

65. Verbeke, G., &Molenberghs G. Linear mixed models for longitudinal data. Springer Science & Business Media. 2009.

66. Ionta FQ, et al. In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization. J Dent. 2014; 4(2):175-179.

67. Nakata K, et al. Relationship between fluorescence loss of QLF and depth of demineralization in an enamel erosion model. Dent Mater J. 2009; 28(5):523-529.

68. Yumiko H, et al. Effect of SI-R20401 to remineralize artificial incipient enamel lesions in primary teeth. J Oral Sci. 2013; 55(4):301-310.

69. Kang H, Darling C, Fried D. Nondestructive monitoring of the repair of enamel artificial lesions by an acidic remineralization model using polarization –sensitive optical coherence tomography. Dent Mater. May 2012; 28(5):488-494.

70. Nakashima S, et al. Effect of a test dentifrice containing nano-sized calcium carbonate on remineralization of enamel lesions in vitro. J Oral Sci. 2009; 51(1,6):77.

71. Ferreira R, et. al. In Vitro Induction Of Enamel Subsurface Demineralization For Evaluation Of Diagnostic Imaging Methods. J Appl Oral Sci. 2007; 15(5):392-8.

72. Lino M, et. al. Optical coherence tomography examination of the effect of S-PRG filler extraction solution on the demineralization of bovine enamel. Dent Mater J. 2014; 33(1): 48–53.

73. Miresmaeili A, et. al. Effect of Argon Laser on Enamel Demineralization around Orthodontic Brackets: An In Vitro Study. J Dent. July 2014; 11(4): 411–417.

74. Alhawij H, Lippert F, Martinez-Mier E. Relative fluoride response of caries lesions created in fluorotic and sound teeth studied under remineralizing conditions. J Appl Oral Sci. 2007; 15(5):392-8.

75. Arnold W, S. Forer, J. Heesen, K. Yudovich, D. Steinberg, P. Gaengler. The In Vitro Effect Of Fluoridated Milk In A Bacterial Biofilm – Enamel Model. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2006; 150(1):63–69.

76. Rodrigo AA et al. Enamel Carious Lesion Development in Response to Sucrose and Fluoride Concentrations and to Time of Biofilm Formation: An Artificial-Mouth Study. J Oral Dis. 2014:8.

77. Cahuana RA, Cury JA. Mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. Braz Oral Res. Apr-Jun 2010; 24(2):135-41.

78. F Hayati et al. An artificial biofilm induced secondary caries model for in vitro studies Aust Dent J. 2011; 56:40-47.

79. Domínguez-Medina N, González-López S, Menéndez-Núñez M. Estudio de las vías de difusión de la lesión de mancha blanca del esmalte. RCOE. 2002; 7(5):469-476.

80. Moreno EC. The Pore Structure of Human Dental Enamel. Archs Oral Bid. 1973; 8:1063-1068.

81. Nguyen T. Characterization of the porosity of human dental enamel and shear bond strength in vitro after variable etch times: initial findings using the BET Method. Angle Orthod. 2011; 81:707-715.

82. Zahradnik RT, Moreno EC. Structural features of human dental enamel as revealed by isothermal water vapour sorption. Arch Oral Biol. May–June 1975; 20(5–6):317-325.

83. Pau P,Berg T, McMillan W. Application of Stokes' Law to Ions in Aqueous Solution. J. Phys. Chem. 1990; 94: 2671-2679.