



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Odontología

Tesis de Doctorado

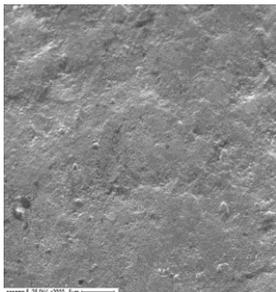
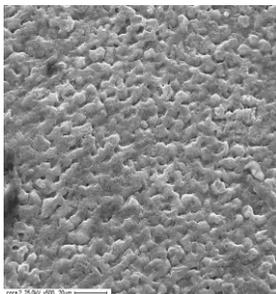
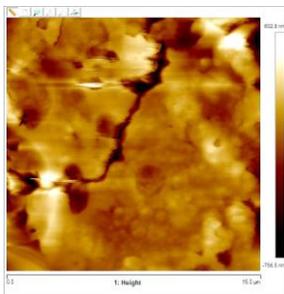
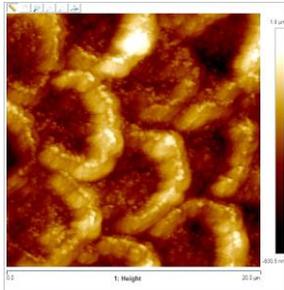
EFFECTO DE BIOELEMENTOS (CALCIO, FÓSFORO Y NITRÓGENO) DE UNA FUENTE VEGETAL SOBRE LA MICROESTRUCTURA DE LESIONES SUPERFICIALES DEL ESMALTE DENTAL.

Análisis mecánico, químico y morfológico de lesiones de erosión expuestas a una solución de semillas de sésamo. Estudio in vitro

Mg Andrea Matilde Tanevitch

Directora: Doctora en Odontología Graciela S. Durso

Codirector: Doctor en Química Jorge E. Sambeth



2018

Tanevitch, Andrea

Efecto de bioelementos (calcio, fósforo y nitrógeno) de una fuente vegetal sobre la microestructura de lesiones superficiales del esmalte dental : análisis mecánico, químico y morfológico de lesiones de erosión expuestas a una solución de semillas de sésamo : estudio in vitro / Andrea Tanevitch ; coordinación general de Jorge Sambeth ; dirigido por Graciela Durso. - 1a ed. - Berisso : Andrea Tanevitch, 2018.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-987-42-9286-5

1. Odontología Preventiva. 2. Histología. 3. Semillas. I. Sambeth, Jorge, coord. II. Durso, Graciela, dir. III. Título.

CDD 617.6

Efecto de bioelementos (calcio, fósforo y nitrógeno) de una fuente vegetal sobre la microestructura de lesiones superficiales del esmalte dental. Análisis mecánico, químico y morfológico de lesiones de erosión expuestas a una solución de semillas de sésamo. Estudio in vitro.

RESUMEN

Nuestro propósito fue indagar sobre los efectos producidos por una solución obtenida de semillas de sésamo germinado sobre la microestructura de lesiones de erosión del esmalte dental. Se aplicaron dos regímenes de exposición: cíclico (alternando con saliva artificial) y en condiciones estáticas (sésamo solo). Se determinaron las variaciones en los aspectos mecánicos, morfológicos, topográficos y químicos de la microestructura del esmalte. Además se identificó la composición química de la semilla mediante EDS y de la solución obtenida con ICP-MS. Se utilizaron dientes permanentes obtenidos con el consentimiento informado del paciente. Se prepararon muestras de esmalte adecuadas para cada instrumento, tal que se obtuviera información de la superficie y subsuperficie. Se realizaron ensayos de microdureza, observación al AFM, MEB, análisis químico elemental mediante EDS y XPS, descripción de la estructura cristalina mediante DRX y de grupos químicos con FTIR, ensayo de adsorción de N₂ y análisis de superficie específica. Se creó una lesión de erosión sumergiendo el esmalte 90 min en una bebida gaseosa. En la semilla, la concentración resultante fue Ca: 7,49 y P: 9,83 (mg/g de muestra) y la relación Ca/P fue mayor en la cubierta que en el interior. El pH de la solución fue 6 en escala colorimétrica. En el esmalte tratado con la solución de sésamo ciclado en saliva artificial, se registró una menor pérdida de dureza Vickers (22,75%) en relación al tratado con agua (25,58%) y con saliva artificial (25,13%). La rugosidad Rq (nm) disminuyó de 316,75 en el esmalte erosionado a 97,95 en el tratado con sésamo. Al MEB se observó un material irregular y taponamiento de poros. La determinación atómica con XPS mostró un aumento del C y N. El esmalte tratado con sésamo 24 h presentó un incremento en las propiedades mecánicas del 14% en “Er” y un 38% en “H”. Al MEB también se detectó una capa heterogénea cubriendo los poros. La rugosidad disminuyó con respecto al esmalte erosionado. La diferencia en la relación Ca/P del esmalte tratado con sésamo y saliva artificial fue significativa (p<0,05). Mediante DRX se identificó la estructura cristalina de la hidroxiapatita y la capa amorfa superficial. El FTIR mostró la sustitución de grupos químicos. La superficie específica aumentó en el esmalte tratado con sésamo pero disminuyó el volumen y tamaño de poro con relación a la erosión. Concluimos que la solución de sésamo germinado produce modificaciones mecánicas, morfológicas, topográficas y químicas en la microestructura del esmalte erosionado. Los componentes inorgánicos y orgánicos de la semilla están involucrados en estos fenómenos.

Palabras clave: esmalte dental- erosión- sésamo- saliva artificial

Effect of vegetable source bioelements (calcium, phosphorus and nitrogen) on microstructure of enamel superficial lesions. Mechanical, chemical and morphological analysis of erosion lesions exposed to a sesame seed solution. In vitro study.

ABSTRACT

Our aim was to investigate the effects of a solution obtained from seeds of germinated sesame on the microstructure of the erosion lesions of the dental enamel. Two regimes were applied: cyclic (alternating with artificial saliva) and in static conditions (sesame only). The variations in the mechanical, morphological, topographic and chemical aspects of the enamel microstructure were determined. In addition, the chemical composition of the seed was analysed by EDS and the solution obtained by ICP-MS. Permanent teeth obtained with the patient's informed consent were used. Suitable enamel samples for each instrument were prepared to obtain surface and subsurface information. Microhardness tests, MEB and AFM observation, elemental chemical analysis by EDS and XPS, description of the crystalline structure by XRD and chemical groups with FTIR, N₂ adsorption test and specific surface analysis were performed. An erosion injury was created by immersing the enamel 90 min in a soft beverage. In the seed, resulted concentration was Ca: 7.49 and P: 9.83 (mg/g of sample) and the Ca/P ratio was higher in the cover than in the inner. The pH of the solution was six on a colorimetric scale. In the enamel treated with sesame solution cycled with artificial saliva, a lower loss of Vickers hardness (22.75%) was recorded in relation to the treated with water (25.58%) and with artificial saliva (25.13%). At AFM, Rq (nm) decreased from 316.75 in the eroded enamel to 97.95 in the sesame treated. An irregular material and pore plugging was observed at the MEB. The atomic determination with XPS showed an increase of C and N. An irregular surface with pore plugging was observed at the MEB. The enamel treated with sesame 24h presented an increase in the mechanical properties of 14% in "Er" and 38% in "H". The MEB also detected a heterogeneous layer covering the pores. The roughness decreased with respect to eroded enamel. The difference in the Ca / P ratio of the enamel treated with sesame and artificial saliva was significant (p<0.05). Through XRD the crystal structure of the hydroxyapatite and the surface amorphous layer were identified. The FTIR showed the substitution of chemical groups. The specific surface increased in the enamel treated with sesame but decreased the volume and pore size in relation to erosion. We conclude that the germinated sesame solution produces mechanical, morphological, topographical and chemical modifications in the eroded enamel microstructure. The inorganic and organic components of the seed are involved in these phenomena.

Keywords: dental enamel- erosion- sesame- artificial saliva

DEDICATORIA

A mi familia...

A mi compañero de la vida en gratitud a su colaboración, paciencia y apoyo.

A mis hijas como muestra que el camino de la superación es posible.

A mi madre por su sostén incondicional y en memoria de mi padre

A mis maestros...

*A la Profesora Doctora Graciela Susana Durso por alentarme y guiarme en esta
etapa de formación académica*

*Al Profesor Doctor Jorge Enrique Sambeth por su compromiso, el tiempo y los
conocimientos compartidos.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Ser Supremo, por permitirme alcanzar este objetivo brindándome la fortaleza, la perseverancia y la paciencia para superar los obstáculos y haber puesto en mi camino a aquellas personas que han iluminado mi conocimiento para avanzar en este estudio

A la Institución Facultad de Odontología Universidad Nacional de La Plata

A esta Unidad Académica y sus Autoridades por brindarme la posibilidad de
continuar mi formación.

Especialmente a las profesoras Graciela Durso y Nélica Coscarelli por su
paciencia y disposición.

Al personal técnico

Al Dr. Marcos Pedemonte del CIG-UNLP; al Dr. Guillermo Benítez y al Dr. Eduardo Prieto del INIFTA-UNLP; al Ing. Bernardo Daga del INTEMA- UNMdP; a la Biol. Mariela Theiller, al Lic. Pablo Fetsis, a la Sra. Graciela Valle y al Dr. Jorge Sambeth del CINDECA-UNLP; al Ing. Carlos Llorente y a mi Supervisora de la pasantía Ing. Adriana Lemos Barboza del LIMF-UNLP. A cada uno de ellos, por su capacidad profesional, el apoyo técnico y el asesoramiento permanente.

A los profesores consultados

Dr. Eduardo Charreau del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-UBA), Dr. Juan R de Xammar Oro de la Facultad de Ciencias Exactas UNLP, Dra. Cristina Añon (CIDCA-UNLP), Dr. Daniel Orzi (CIOp-UNLP) y Dr. Ricardo Macchi. A ellos, por guiarme en el recorrido y brindarme sus consejos.

Y a todos aquellos que me alentaron, contuvieron y acompañaron en este camino
de la investigación...

¡Mi infinito agradecimiento!

“Permíteme un breve consejo de alguien que ya tiene mucha vida recorrida.... nunca dejes de luchar y ser una honesta, buena persona, así vas a ser digna de ti misma y te aseguro que va a ser tu mayor tesoro”

Juan R de Xammar Oro

ÍNDICE GENERAL

LISTADO DE ABREVIATURAS	<i>i</i>
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	3
I. MICROESTRUCTURA DEL ESMALTE DENTAL	4
1. Estructura histológica del esmalte dental	4
2. Aspectos biomecánicos del esmalte dental	8
3. Composición química del esmalte	9
II. LESIONES DEL ESMALTE DENTAL	12
1. Procesos dinámicos de desmineralización y remineralización	12
2. Lesiones de erosión y caries.	17
3. Bebidas de consumo y erosión	20
III. REMINERALIZACIÓN DEL ESMALTE	23
1. Efecto de la saliva sobre el esmalte desmineralizado	23
2. Efecto de compuestos sintéticos sobre el esmalte desmineralizado	25
3. Efecto de derivados vegetales sobre el esmalte desmineralizado	26
4. Propiedades de la semilla de sésamo	27
IV. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES SÓLIDAS	30
1. Microanálisis por sonda de electrones (EDS)	30
2. Microscopio de fuerza atómica (AFM)	36
3. Dureza superficial	39
4. Difracción de rayos- X (DRX)	42
5. Espectroscopia infrarroja (FT-IR)	44
6. Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)	47
7. Espectroscopia foto electrónica de rayos - X (XPS)	49
8. Superficie específica	50
V. ANÁLISIS PRELIMINAR DEL ESMALTE TRATADO CON SÉSAMO	53
CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	56
OBJETIVO GENERAL	57
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
HIPÓTESIS	59
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODO	60
I. VARIABLES	61
Unidad de análisis	61
Definición conceptual y operacional de las variables	62
II. POBLACIÓN Y MUESTRA	65
III. DISEÑO EXPERIMENTAL	66

IV. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS _____	68
V. PROCEDIMIENTO _____	71
VI. ASPECTOS METODOLÓGICOS DEL RÉGIMEN CICLÍCO _____	75
VII. ASPECTOS METODOLÓGICOS DEL RÉGIMEN EN CONDICIONES ESTÁTICAS _____	77
CAPÍTULO IV. RESULTADOS _____	82
I. ANÁLISIS DE LA SEMILLA DE SÉSAMO _____	83
II. PRODUCCIÓN DE LESIONES DE EROSIÓN DEL ESMALTE DENTAL _____	87
III. RÉGIMEN CÍCLICO: SÉSAMO CICLADO EN SALIVA ARTIFICIAL _____	91
IV. RÉGIMEN EN CONDICIONES ESTÁTICAS: SÉSAMO 24 HORAS _____	107
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES _____	141
DISCUSIÓN _____	142
CONCLUSIONES _____	155
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	158
ANEXO _____	173
I. MICRODUREZA DE LA EROSIÓN DEL ESMALTE _____	174
II. MICRODUREZA PARA EL RÉGIMEN CÍCLICO _____	175
III. ESPECTROMETRÍA DE ENERGÍA DISPERSIVA _____	176
IV. MUESTRAS _____	178
V. MICROGRAFÍAS MEB-EDS _____	179
VI. IMÁGENES DE LAS MUESTRAS ENSAYADAS EN EL TRIBOINDENTER _____	183
VII. MICRODUREZA DEL RÉGIMEN ESTÁTICO 24H. TRIBOINDENTER _____	184

LISTADO DE ABREVIATURAS

µm: unidad de medida micrómetros

AFM: Atomic Force Microscopy (Microscopio de Fuerza Atómica)

BHS: Bandas de Hunter-Schreger

C: símbolo químico del carbono

Ca: símbolo químico del Calcio

Ca/P: Relación calcio fósforo

CIG: del Centro de Investigaciones Geológicas CONICET-UNLP

CINDECA: Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas CONICET- UNLP

DRX: Difracción de rayos X

EDS: Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (Espectrometría de energía dispersiva de rayos X)

EPMA: Electron probe micro-analyzer (Microanalizador de sonda de electrones)

Er: módulo reducido

FTIR-IR: Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier)

g: gramos

GPa: unidad de presión Giga Pascal

h: hora/s

H: Dureza superficial

HV: dureza Vickers

ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente

INIFTA: Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas CONICET-UNLP

INTEMA: Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales Facultad de Ingeniería Universidad Nacional de Mar del Plata

LIMF: Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física. Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata

MEB: Microscopía Electrónica de Barrido. También SEM de Scannig Electron Microscopy

mg/l: miligramos por litro

Mmol/L: milimol por litro

mN: unidad de fuerza milinewton

μN: unidad de fuerza micronewton

N: símbolo químico del nitrógeno

N₂: gas nitrógeno

Nm/ nm: unidad de medida nanómetro

NaOH: hidróxido de sodio

P: símbolo químico del fósforo

pH: potencial hidrógeno. Índice de acidez

pKa: constante de disociación ácida

PO₄: grupo fosfato

Rq nm: Medida de Rugosidad en nanómetros

Ra nm: Media aritmética de rugosidad en nanómetros

Rmax nm: La diferencia máxima de altura al AFM

UNLP: Universidad Nacional de La Plata

UNMdP: Universidad Nacional Mar del Plata

Wt%: peso atómico porcentual

XPS: X-ray Photoelectron Spectroscopy (Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X)

INTRODUCCIÓN

Los individuos, con frecuencia, ingieren alimentos y bebidas que producen descenso del pH de la saliva y la placa dental. En algunos, las piezas dentarias resultan vulnerables al daño ácido y a la progresión del deterioro. La consecuencia desfavorable de la pérdida de minerales del esmalte es la aparición de lesiones incipientes de caries o erosión. Por ello, la odontología preventiva concentra esfuerzos en el estudio de mecanismos y productos que puedan evitar o revertir el daño.

Se han investigado y aplicado, distintos agentes químicos que pueden depositarse sobre la superficie adamantina para evitar la disolución y/o promover la remineralización. Entre ellos, se encuentran el flúor (1), los compuestos a base de calcio (2), hidroxiapatita sintética (3), componentes salivales (4), derivados vegetales (5). El flúor tiene la capacidad de inhibir la pérdida mineral en la superficie cristalina y modular los procesos de des- y remineralización (6).

Los compuestos cálcicos mostraron ser eficaces para el tratamiento de lesiones superficiales de esmalte. Uno de ellos es el obtenido por combinación de la caseína-fosfato con el fosfato amorfo de calcio (CPP-ACP) pudiendo ser de uso profesional o incorporado en alimentos, pastas dentales o goma de mascar (7, 8).

Además, se conocen algunos productos naturales que ejercen efecto sobre el balance de desmineralización y re-mineralización, como alimentos, bebidas, flores o hierbas tradicionales (9). Los agentes que contienen fósforo (en la forma de fosfatos) como son los fitatos contenidos en la cáscara de semillas de arroz y avena también tienen efecto cariostático (10-12). Estudios realizados utilizando un extracto de semilla de uva sobre caries artificiales de esmalte, han demostrado el efecto remineralizante de algunos compuestos orgánicos contenidos en la semilla (13).

Los productos naturales han sido utilizados con fines medicinales durante años y actualmente son considerados promisorios agentes terapéuticos especialmente en

enfermedades de los tejidos dentarios y orales. Constituyen una rica fuente de diversas sustancias químicas, con una amplia gama de actividad biológica (14), lo que podría ser útil para el desarrollo de terapias alternativas o complementarias para la prevención o el tratamiento del esmalte dental dañado.

Con todo, el verdadero valor de los derivados naturales y/o su mecanismo de acción sobre el esmalte dental desmineralizado no es completamente conocido y sigue siendo motivo de sucesivas investigaciones.

La semilla de sésamo es muy valorada por sus propiedades nutritivas (15, 16) y su contenido de minerales. Su uso no tiene efectos adversos sobre la salud, ni posibilidad de alergias como los derivados de la caseína de la leche. Constituye un nutriente rico en minerales muy utilizado en poblaciones que no ingieren calcio de origen animal (17, 18)

Sin embargo, no hay suficiente evidencia del efecto de los distintos bioelementos contenidos en la semilla sobre la estructura adamantina dañada por lesiones superficiales de erosión.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

I. MICROESTRUCTURA DEL ESMALTE DENTAL

El esmalte dental es un tejido mineralizado con un alto grado de complejidad en su organización que ha sido producto de numerosas investigaciones y extensas descripciones (19, 20) en el área de odontología y aun así existen muchos cuestionamientos y dudas acerca de su naturaleza y comportamiento funcional.

Su composición mineral le confiere propiedades físicas tales como dureza, rigidez, escasa permeabilidad, radio-opacidad, birrefringencia (11, 21), conductividad a altas temperaturas (22) y propiedades biomecánicas como resistencia a la fractura y al desgaste (23). No obstante, presenta solubilidad en medios ácidos que puede comprometer su integridad estructural.

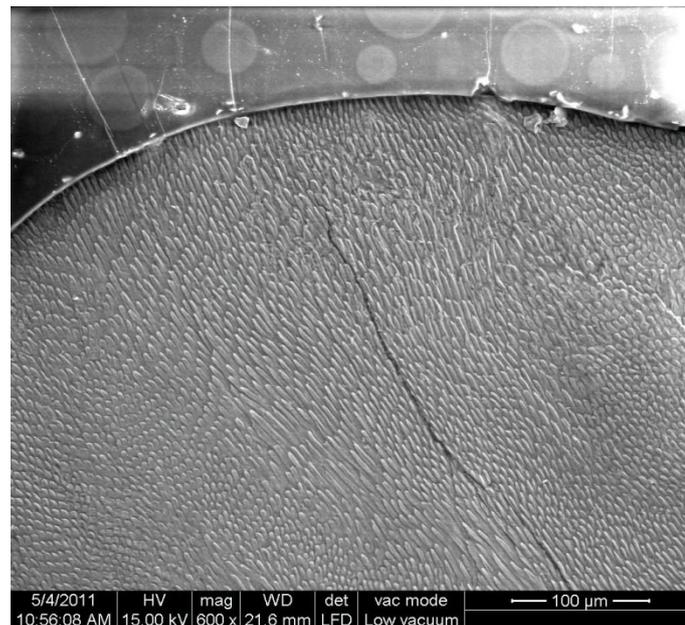
1. Estructura histológica del esmalte dental

La unidad estructural básica del esmalte es el prisma, constituido por haces de cristales de hidroxiapatita (HA) ordenados y densamente empaquetados con una delicada red de material orgánico de naturaleza proteica (21).

Si bien se utiliza con frecuencia el término prisma, la unidad básica no posee forma geométrica regular y no se asemeja a un prisma (24). Ten Cate (24) considera los prismas o varillas de forma cilíndrica, rodeados por vainas y separados por sustancia interprismática, empleando también los términos varillas y región intervarillar. Los cristales de las varillas se encuentran en ángulos agudos con los de la región intervarillar. Las vainas se forman en la interfase entre cristales con diferente angulación y contienen más proteínas del esmalte que otras regiones. Otros autores (21) describen los prismas como varillas que en sección transversal presentan forma de ojo de cerradura de llave antigua con cuerpo (o cabeza) y cola. Los cristales se disponen casi paralelos al eje longitudinal de la varilla en el cuerpo y se desvían unos 65° al alejarse de éste abriéndose en abanico al llegar a las colas. Las varillas se disponen en hileras circunferenciales alrededor del eje mayor del diente, de manera que los cuerpos están más cerca de la superficie oclusal e incisal, mientras que las colas se encuentran hacia cervical.

El conjunto de prismas forma el esmalte prismático representando el mayor volumen de este tejido dentario (Figura 1 *A* y *B*). En la periferia de la corona y en la proximidad a la conexión amelodentinaria, existe el denominado esmalte aprismático pues la sustancia adamantina mineralizada no constituye ni configura prismas (Figura 2).

A



B

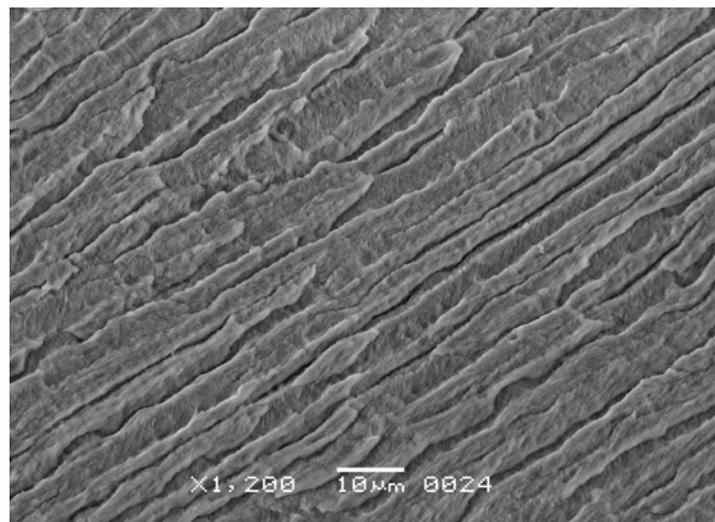


Figura 1. Micrografía electrónica del esmalte prismático. *A* Esmalte radial. MEB x 600. *B* Varillas del esmalte (prismas) en sección longitudinal. MEB x 1200.

Fuente propia.

En el esmalte aprismático los cristales de hidroxiapatita se encuentran densamente agrupados, dispuestos en forma perpendicular a la superficie y paralelos unos a otros. También presenta características particulares frente a la acción de ácidos resultando más resistente a la disolución (21). Es más frecuente encontrarlo en dientes temporarios.

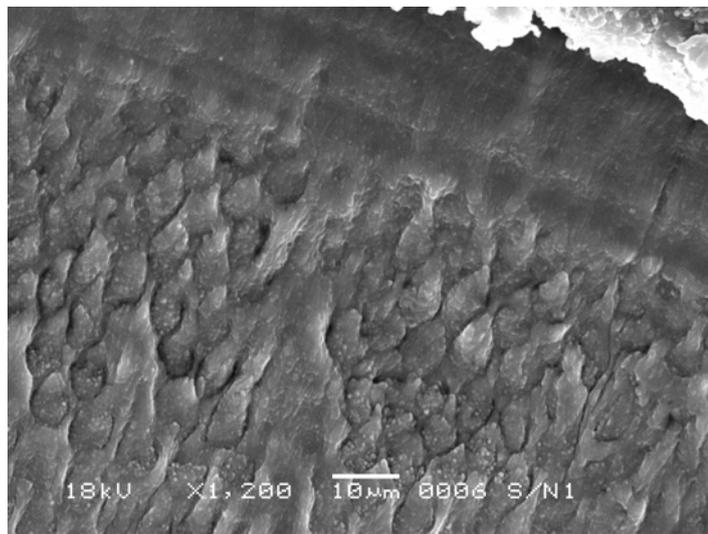


Figura 2. Micrografía del esmalte aprismático. Se observa esmalte sin prismas en la zona superior y prismas en sección transversal por debajo. MEB x 1200.

Fuente propia.

El esmalte prismático se organiza en capas, dentro de cada capa los prismas tienen morfología, orientaciones y empaquetamientos similares y constituyen los tipos de esmalte. Pueden presentarse volúmenes de esmalte donde los prismas son paralelos unos con otros (esmalte radial y esmalte tangencial), o se entrecruzan entre sí de manera ordenada (esmalte con bandas de Hunter-Schreger) o desordenada (esmalte irregular). A su vez, en el esmalte irregular el entrecruzamiento de prismas puede ser en haces (esmalte 3D) o en prismas individuales (25).

Estudios realizados en dientes humanos (26) considerando la clasificación jerárquica de la microestructura del esmalte mamífero desarrollada por Koeningswald (25) en el nivel tipos de esmalte, demostraron que el esmalte radial puede ocupar todo el espesor del esmalte o combinarse con esmalte con bandas o esmalte irregular (Figura 3). En esta clasificación, el esmalte aprismático no

constituye un tipo de esmalte pues se encuentra en una escala inferior (nivel prismas).

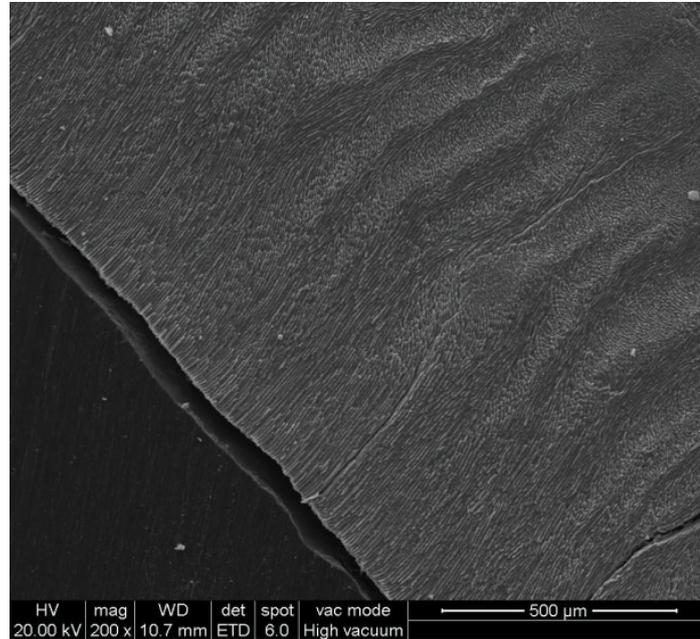


Figura 3. Micrografía del esmalte radial ocupando el espesor externo y esmalte con bandas de Hunter Schreger .MEB x 200. Fuente propia

El esmalte con bandas de Hunter Schreger (BHS) se localiza en el tercio interno del espesor del esmalte, mientras que el radial se encuentra en la zona próxima a la superficie. En la porción interna correspondiente a las cúspides en molares y premolares, se encuentra frecuentemente el esmalte irregular (nudoso).

El concepto tipos de esmalte hace referencia, no a meras formas estructurales sino, a diseños específicos capaces de cumplir con funciones específicas (27). En estudios realizados, evaluamos en piezas dentarias humanas, la capacidad de los tipos de esmalte, para resistir el desgaste superficial, mediante el registro de la microdureza. Comprobamos que el esmalte BHS presentó menor dureza Vickers que el radial, tanto en dientes deciduos como en permanentes. Los valores medios obtenidos en dientes temporarios fueron en el esmalte BHS: $276,5 \pm 34,7$ HV y en el radial: $360,9 \pm 53$ HV, mientras que en permanentes resultó en el esmalte BHS: $301,4 \pm 28,2$ HV y en el radial: $344,2 \pm 37,5$ HV (28, 29).

El esmalte dental es el tejido más expuesto a fuerzas oclusales altas, por el extenso procesamiento de la comida en la cavidad bucal y la relación de contacto entre las piezas antagonistas, por lo que debe resistir desgastes y fracturas. Por tanto, se necesita de la combinación de los distintos tipos de esmalte para cubrir los requerimientos biomecánicos. El entrecruzamiento de prismas (esmalte BHS) provee un mecanismo de detención de fracturas y potencia la resistencia a las fuerzas tensionales, mientras que la disposición paralela de prismas le confiere al tejido resistencia a la abrasión (23).

2. Aspectos biomecánicos del esmalte dental

El contenido mineral del esmalte puede ser evaluado cuantitativamente por distintos métodos que comprenden medidas directas de ganancia/ pérdida de minerales (por ejemplo micro- radiografía) hasta medidas indirectas (como la permeabilidad al yodo, la porosidad, la dispersión de la luz y la microdureza superficial) (30).

La microdureza constituye un método simple, rápido y menos destructivo, disponible para evaluar variaciones de las propiedades mecánicas de los tejidos (30-32). El mayor contenido de mineral de un tejido determina valores de microdureza más elevados. Este método, también se utiliza para determinar el efecto de la desmineralización y re-mineralización sobre los tejidos dentarios. Arends (33) comparó distintas técnicas para evaluar desmineralización y re-mineralización del esmalte y la dentina y concluyó que los test de microdureza constituyen una técnica indirecta práctica para determinar cuantitativamente la pérdida o ganancia de mineral.

En el esmalte sano la microdureza decrece desde la superficie externa hacia el límite amelodentinario (21). Braly *et al.* (34) demostraron que la dureza y el módulo de Young del esmalte de molares humanos registrados con nanoindentación, disminuyen más del 50% desde la superficie oclusal hacia la unión amelo-dentinaria en muestras de sección transversal. Consideran que posibles fuentes de estas variaciones son cambios en la composición química local, la microestructura y la

orientación de los prismas. Sin embargo, señalaron que el impacto de la orientación del prisma en las propiedades mecánicas, medidas en escala de nanoindentación, parece ser mínimo (34).

Estudios de dureza con nanoindentación realizados por Habeliz *et al.* (35) revelaron que los valores del módulo de Young y la dureza varían según la dirección paralela o perpendicular de las varillas del esmalte respecto al plano de medición. Los valores encontrados para el módulo de Young fueron 87,5 GPa y 72,2 GPa y para la dureza, 3,9 GPa y 3,3 GPa en la dirección paralela y perpendicular respectivamente. La anisotropía observada en el esmalte tiene implicancia en el comportamiento biomecánico (23) y está relacionada con el alineamiento de los cristales de apatita dentro de una varilla (prisma). En la zona de la cabeza del prisma, los cristales se ordenan en forma fibrilar, mientras que en la cola y en la sustancia intervarillar cambian de orientación produciendo una disminución de los valores en el módulo de Young y la dureza (35).

3. Composición química del esmalte

En estado maduro, el contenido mineral del esmalte (expresado en porcentaje de peso líquido) comprende el 95- 96%, mientras que el 1,5- 4% corresponde a la matriz orgánica (proteína no colágena) y el 1- 2,5 % al agua (adsorbida en la superficie del cristal) (21, 36).

El contenido mineral le confiere propiedades mecánicas para concentrar y resistir fuerzas de stress, pero también lo hace vulnerable a los procesos de desmineralización cuando desciende el pH del medio bucal, fundamentalmente de la saliva y la placa (21, 37, 38).

La matriz inorgánica del esmalte está constituida por sales de calcio, de las cuales la más abundante es el fosfato deca-cálcico hidratado, semejante a las apatitas naturales denominado hidroxapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ (39). Existen también otras sales de calcio como carbonatos y sulfatos y oligoelementos (sodio, magnesio, hierro, cinc, flúor, potasio, cobre, cloro, etc.) (38). Según Kunin *et al.* (40) la parte inorgánica del

esmalte consiste en 75% de hidroxiapatita, 19% de apatita carbonatada, 4,4% de clorapatita, 0,66% de fluorapatita y 2% de formas no-apatita. La composición ideal de hidroxiapatita corresponde una relación Ca/P 1,67. Sin embargo, el Ca puede estar sustituido por otros elementos tales como Ba, Cr, Mg, reduciendo la relación Ca/P a 1,33. En estas condiciones, las propiedades de la apatita varían y la resistencia del esmalte a un entorno adverso también (40).

Mariel Cárdenas *et al.* (41) realizaron estudios al microscopio electrónico de barrido (MEB) con analizador de energía dispersiva espectral de rayos X que permitieron identificar cuali y cuantitativamente la distribución de elementos químicos en la superficie analizada. El oxígeno se identificó en mayor proporción (39,96%) con distribución homogénea desde la superficie hasta la unión amelodentinaria, le siguen el calcio (26,16%) y el carbono (19,27%) en la zona superficial, luego el fósforo (12,38%) localizado en la zona intermedia y en menor proporción aparecen el sodio, tungsteno y magnesio en la unión amelodentinaria y el cloro en la superficie externa (41).

De Menezes *et al.* (42) compararon la microestructura y la composición mineral del esmalte de dientes deciduos y permanentes, mostrando que el valor medio del espesor del esmalte fue de 1,14 mm para deciduos y 2,58 mm para permanentes; el diámetro medio de la cabeza del prisma de los dientes temporarios fue estadísticamente similar al de los dientes permanentes; la densidad numérica de prismas de esmalte fue mayor en los dientes de leche, principalmente cerca de la unión amelodentinaria. El porcentaje de calcio (Ca) y fósforo (P) fue mayor en el esmalte de los dientes permanentes.

La matriz orgánica del esmalte está formada por un conjunto de proteínas de naturaleza no colágena. Entre ellas se mencionan amelogeninas, enamelinas, ameloblastinas, tuftelina, proteínas séricas, enzimas sulfatos de coindroitina y lípidos (21). Las enamelinas son proteínas de tipo estructural presentes en mayor proporción en el esmalte maduro (1,5%). El agua se encuentra unida al cristal de hidroxiapatita y si bien es muy abundante al inicio del desarrollo va disminuyendo con la edad.

Baldassarri *et al.* (43), sostienen que el esmalte comprende principalmente apatita carbonatada con menos del 1% de materia orgánica y 4-5% en peso de agua y que cuando se remueve la matriz orgánica, la microdureza se incrementa un 26% y disminuye un 46% la tenacidad. En cambio, cuando el agua es removida, el efecto sobre estas propiedades es significativamente menor.

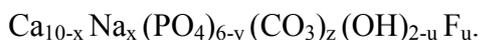
La composición química del esmalte está relacionada con la solubilidad del componente mineral. Besic *et al.* (44) encontraron que las concentraciones de carbono, hidrógeno, oxígeno y boro fueron mayores en las muestras de esmalte más susceptibles a la disolución por ácidos. En cambio, el calcio, fósforo, vanadio y zinc tuvieron mayor concentración en las muestras ácido resistente.

II. LESIONES DEL ESMALTE DENTAL

1. Procesos dinámicos de desmineralización y remineralización

Los prismas del esmalte son, en definitiva, un denso y ordenado empaquetamiento de cristales, rodeados de una red de material proteico.

El cristal de hidroxiapatita es, principalmente, *hidroxiapatita sustituida* descrita como hidroxiapatita carbonatada deficiente en calcio, cuya fórmula es (45):



La deficiencia de calcio está indicada en la fórmula por “10-x” en el Ca. Algunos iones calcio son reemplazados por otros iones metálicos como sodio, magnesio y potasio. Los iones oxhidrilo pueden ser sustituidos por iones flúor. Sin embargo, la mayor sustitución es del carbonato reemplazando algunos grupos fosfato, pero no en una relación de estequiometría. Por eso se ha designado con “6-y” al fosfato y “z” al carbonato (45). Estos iones producen disturbios en la estructura cristalina de la hidroxiapatita modificando su estabilidad química. Mayormente el cristal se torna más soluble (46). Los cristales de hidroxiapatita, resultan vulnerables a las variaciones de pH del fluido que lo rodea.

El cristal del esmalte dental presenta una estructura hexagonal aplanada de 40 nm de ancho, 25 nm de espesor y 160 nm de longitud (47). Sin embargo, otros autores sostienen que su tamaño es mayor, alcanzando una longitud de 0,05 a 1 μm (21). En corte transversal tienen un espesor de 30 nm y un ancho promedio de 90 nm (38). Si bien el prisma del esmalte consiste en un empaquetamiento de cristales, cada cristal está separado de su vecino por un delgado espacio intercrystalino ocupado por agua y material orgánico (proteínas y lípidos). Estos finos espacios forman una vía de difusión que frecuentemente se denomina micro poros o poros del esmalte (48). Estos poros, extremadamente pequeños, ocupados por agua, representan el 0,5% del volumen total (Figura 4). La porosidad es levemente mayor en la región intervarillar debido al abrupto cambio en la orientación de los cristales (49).

La presencia de este material orgánico modifica el proceso de difusión hacia y desde el esmalte a la vez que modifica la reacción de la fase mineral. Por lo tanto, el esmalte dental es considerado un compuesto sólido microporoso con apretado empaquetamiento de cristales (48).

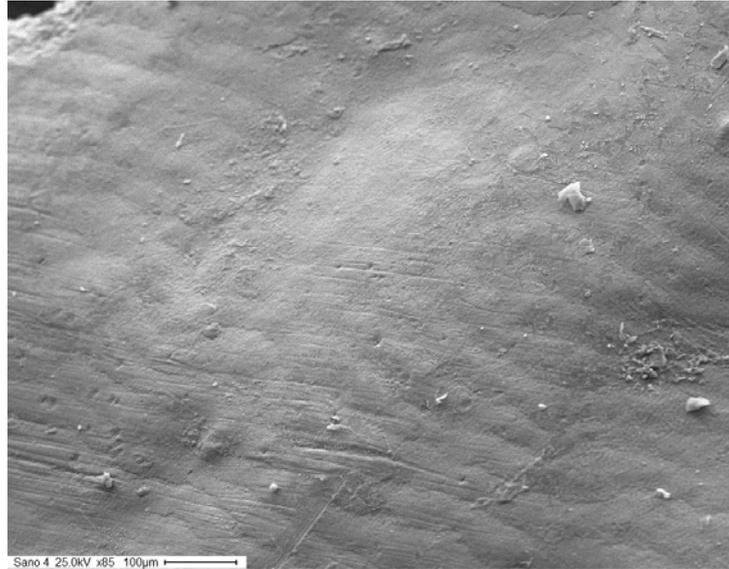


Figura 4. Micrografía del esmalte sano. Se observan periquematis y pequeños poros aislados. MEB x 85. Fuente propia

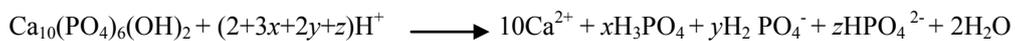
Es un fenómeno natural que el diente se desmineralice debido a la pérdida de iones calcio y fosfato. La saliva se encarga de mantener el balance mineral y el pH oral previniendo la destrucción del esmalte. Sin embargo, la capacidad protectora de la saliva puede agotarse y ocurrir un desbalance en favor de la desmineralización. Los fenómenos de desmineralización del esmalte por la acción de ácidos producen un deterioro del tejido que se expresa como lesiones de erosión o de caries. La erosión dental es exclusivamente un fenómeno de superficie, mientras que las caries son lesiones que implican modificaciones superficiales y subsuperficiales (50).

Los ácidos provenientes de la dieta o producidos por el metabolismo bacteriano de la placa dental, pueden difundir hacia el esmalte disolviendo su fase cristalina. En condiciones normales del medio bucal, el pH de la saliva se encuentra entre 6,2 y 6,8 (51). Cuando el pH de la placa dental (biofilm) y de la saliva desciende a valores críticos (pH 5,5-5,2), comienza la disolución del cristal. La pérdida de iones hacia el

medio bucal se denomina desmineralización. Si se revierte el proceso y los iones vuelven al diente reestructurando los cristales dañados ocurre un fenómeno de remineralización. Estos procesos son dinámicos, pues la capacidad buffer o de tampón de las sales salivales actúan estabilizando los cristales de hidroxiapatita (51).

Cuando el ácido difunde al interior del tejido por los poros entre los cristales, se produce una pérdida parcial de mineral a la vez que aumenta la porosidad y disminuyen las propiedades mecánicas de la capa superficial del esmalte. Se origina una capa de “esmalte ablandado” (46). No obstante, el tamaño de los poros es muy pequeño por lo que los cambios involucran unos pocos micrones de espesor.

El esmalte en presencia de ácido se degrada según la siguiente ecuación (27, 45):



$$(x+y+z = 6)$$

La hidroxiapatita se compone de fosfatos terciarios que tienen una gran afinidad por el calcio (52). En condiciones de neutralidad (pH 7) las formas iónicas principales son los fosfatos primarios (H_2PO_4^-) y secundarios (HPO_4^{2-}) y muy escasamente el terciario (PO_4^{3-}). Sin embargo, en condiciones acidez, casi todos los fosfatos se encuentran en la forma de ácido fosfórico debido a la alta concentración de protones (52). La concentración de H^+ regula el tenor de fosfato en la interface esmalte- saliva pues el fosfato actúa aceptando H^+ y su concentración será más baja cuanto menor sea el pH (37). Como la concentración de PO_4^{3-} en la solución es casi nula, la solución se vuelve insaturada y la hidroxiapatita se disuelve.

Si el pH bajo se acentúa y se mantiene en el tiempo (2 horas o más), se agota la capacidad amortiguadora de la saliva y los fenómenos de desmineralización prevalecen, iniciando una lesión superficial en el esmalte (47). La progresión de esta lesión produce alteraciones microestructurales hasta la aparición de la manifestación clínica. Si este fenómeno es producido por la acción de agentes químicos y no involucra la presencia de bacterias, se denomina erosión dental (53).

La pérdida de mineral por ataque ácido afecta el centro del prisma produciendo un patrón en forma de “panal de abeja” (Figura 5).

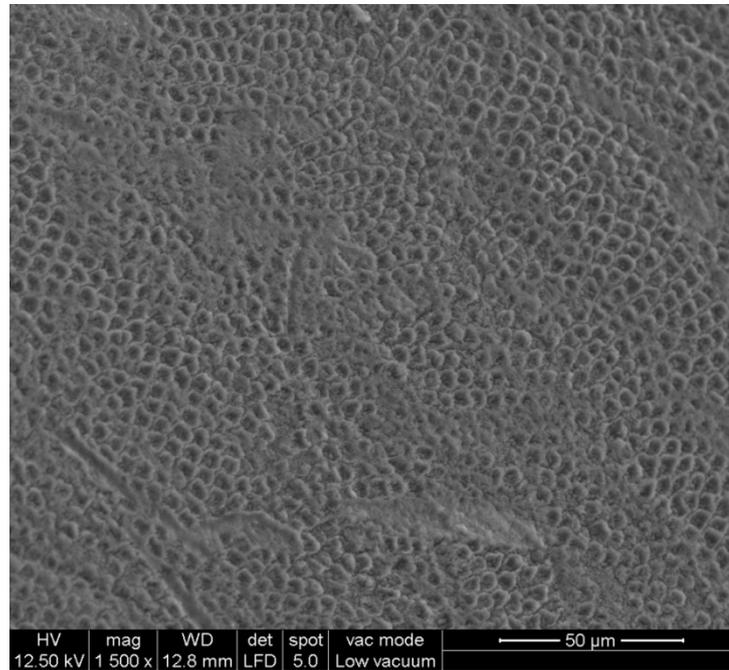


Figura 5. Micrografía del esmalte desmineralizado. Se observan poros amplios. MEB x 1500. Fuente propia.

Tyler (54) estudió los patrones de desmineralización producidos por la exposición del esmalte a la acción de ácidos orgánicos (fórmico, acético, láctico) durante 10 minutos, con y sin agitación, comprobando que en condiciones estáticas se observaba un patrón en forma de “panal de abejas”, con mayor profundidad de disolución en el centro del prisma, mientras que la agitación vigorosa del ácido provocaba la disolución preferencial de las regiones periféricas del prisma (aquellas asociadas a la “cabeza”) dejando el núcleo menos afectado.

La forma de “panal de abejas” coincide con el patrón tipo I de grabado ácido del esmalte utilizado en técnicas de adhesión de materiales odontológicos. En cambio, en si el ácido desmineraliza los cristales de HA del cuello o cola del prisma y aparece erosionada la periferia de la varilla permaneciendo insoluble el centro, el patrón de grabado corresponde al tipo II (11, 21).

El ataque ácido también puede afectar el prisma sin evidenciar un patrón definido (denominado patrón tipo III) (Figura 6), afectando tanto la periferia, como el centro o

no estar relacionado con la morfología del prisma (55). Estas variaciones en la estructura pueden aparecer en distintas áreas de la superficie de un mismo diente.

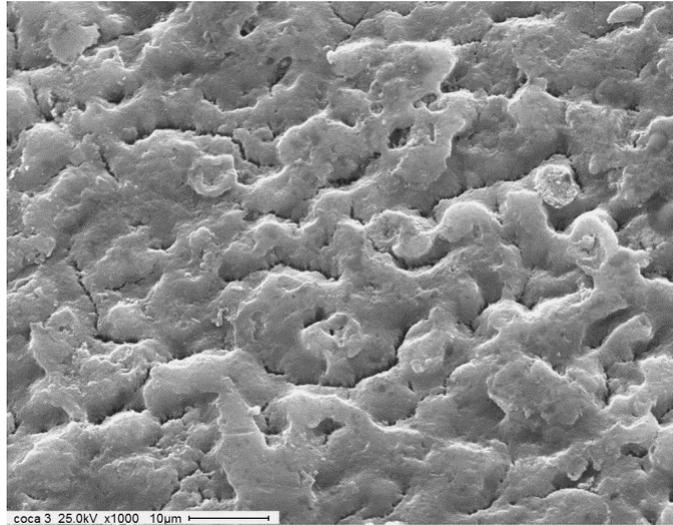


Figura 6. Micrografía del esmalte desmineralizado. Patrón irregular de desmineralización. MEB x 1000. Fuente propia.

El ácido fosfórico es un ácido inorgánico de aplicación odontológica utilizado en la técnica de adhesión de materiales de restauración estética a los tejidos duros dentarios. La concentración usual es del 35 al 38% y el tiempo de contacto recomendado es de 15-30 segundos. Zafar *et al.* (56) describieron las variaciones de las propiedades mecánicas (rugosidad, dureza y módulo de elasticidad) de los tejidos dentarios con diferentes tiempos de acción (15-30-60-90-120 segundos) del ácido fosfórico al 37%. Establecieron que la rugosidad superficial (distancia entre picos y depresiones) se incrementa con el aumento del tiempo de exposición, mientras que la dureza y el módulo de elasticidad disminuyen con la pérdida superficial de mineral. Arnold *et al.* (57) reportaron que la rugosidad superficial del esmalte tratado repetidas veces con ácido clorhídrico al 15% no presentó diferencia con el esmalte no tratado.

Según Lynch *et al.* (58) los tipos de esmalte tienen implicancia en los mecanismos de disolución ante la acción de ácidos tal como el fosfórico (H_3PO_4) que actúa disolviendo el prisma selectivamente y creando oquedades de distinta profundidad (pits). El grado en que los prismas son disueltos depende del ángulo en que es interceptado en la superficie que se está tratando. El esmalte con bandas de Hunter-Schreger contiene muchos prismas que cambian rápidamente de dirección

comparándolo con las zonas de esmalte radial donde los prismas son relativamente paralelos por lo que se creará una superficie grabada con numerosas orificios de diferente profundidad y orientación (58).

2. Lesiones de erosión y caries.

La lesión de desmineralización del esmalte puede ser la manifestación de dos fenómenos: erosión o caries.

La caries es el resultado de procesos de desmineralización crónicos, prolongados, por la acción de ácidos orgánicos producidos por bacterias acidógenas de la placa dental durante la fermentación de carbohidratos provenientes de la dieta. Fejerskov (48) define la caries como una enfermedad que resulta en la pérdida de mineral de la estructura dentaria desde el nivel ultra estructural o nano escala hasta la completa destrucción del tejido debido a fluctuaciones en los valores de pH en la interface cristales y fluido circundante, provocados por el metabolismo del biofilm.

La erosión dental consiste en la pérdida superficial de los tejidos duros del diente por acción de agentes químicos desmineralizantes (ácidos o quelantes) que no involucra la presencia de bacterias (53). Para que se produzca, la acción química debe ser prolongada y reiterada en el tiempo.

Las lesiones de erosión y caries presentan características diferenciales que se expresan en el Cuadro 1 (59).

Cuadro 1. Diferencias estructurales entre lesiones de erosión y caries

Erosión	Caries
<p>La pérdida de esmalte ocurre capa por capa La desmineralización de la superficie externa es completa. Por debajo del esmalte desmineralizado no se observa pérdida subsuperficial de minerales.</p>	<p>En la lesión inicial no cavitada se presenta una zona intacta de esmalte afectado (20-50 μm) localizado por encima de la lesión subsuperficial.</p>

Es importante distinguir la erosión dental de la caries dental. Aunque el resultado final es similar, Moss (60) sostiene que estas dos patologías rara vez se producen simultáneamente en el mismo sitio. Además, en los casos de verdadera erosión, el esmalte de los dientes se desmineraliza por el contacto directo con ácidos, mientras que la caries es una enfermedad causada por la acción de los ácidos producidos por los microorganismos del biofilm de placa. Moss destaca que la erosión es principalmente un fenómeno de superficie, mientras que la caries generalmente comienza como una desmineralización sub-superficial de la estructura de esmalte que finalmente conduce a un foso en la superficie del diente (60).

Lussi (45) define la erosión como la disolución del diente en ausencia de placa, por la acción de ácidos o quelantes extrínsecos o intrínsecos producida cuando la fase acuosa circundante es subsaturada con respecto a la fase mineral del diente. La erosión resulta en un cambio de las propiedades físicas de la superficie remanente tal como la reducción de la microdureza. La erosión produce desgaste de la superficie dentaria y aún es motivo de debate si es una enfermedad oral o una condición fisiológica (45). Uno de los problemas clínicos es el diagnóstico diferencial del desgaste dental producido por la erosión dental (disolución química del mineral del diente) y el producido por otros factores como la atrición (por el contacto con el diente antagonista), la abrasión (por efecto mecánico) y la abfracción/adfracción (por fuerzas compresivas de flexión). Ganss (61) describe las superficies dentarias erosionadas en su estadio inicial con aspecto brillante o vidrioso y a medida que la pérdida mineral aumenta, desaparece el contorno general de la superficie, aparecen concavidades en forma de copa en las caras oclusales y las restauraciones se ven sobresalidas por el nivel del diente adyacente.

Entre los factores etiológicos relacionados con la erosión del esmalte, se mencionan ácidos exógenos de procedencia ocupacional (exposición al ácido sulfúrico o clorhídrico), nadadores por la cloración del agua de las piletas, medicamentos (vitamina C, ácido acetilsalicílico, etc.), factores dietéticos como el consumo de bebidas erosivas. Imfeld (62) menciona la importancia del poder erosivo de las bebidas gaseosas debido a un pH ácido por la concentración de ácidos que contienen.

Shellis (49) considera dos factores estructurales de los tejidos importantes para el desarrollo de la erosión, uno es la presencia de poros y otro el tamaño y forma de los cristales minerales. La porosidad del tejido dental determina el contenido de agua en su interior y por lo tanto, influencia la capacidad de difusión de las sustancias solubles. La morfología del cristal involucra la superficie de ataque del ácido, que será mayor cuanto menor sea el tamaño del cristal.

Los ácidos actúan sobre el cristal de hidroxiapatita produciendo su disolución y liberando iones calcio y fosfato. Si en la hidroxiapatita se sustituyen iones fósforo por carbono se forman carbonatos de calcio que son más susceptibles a la disolución. Sabel *et al.*(63) demostraron que la profundidad de la lesión de desmineralización del esmalte está relacionada con la composición química (el contenido de carbono en el esmalte sano fue mayor donde se desarrollaron lesiones más profundas), además la lesión era más profunda cuando el grado de porosidad del esmalte era mayor. Eisenburger (64) determinó que la erosión del esmalte por acción del ácido cítrico al 0,3% durante 2 h, causaba una pérdida de sustancia de 16 μm y generaba una capa adicional reblandecida de 2,4 μm cuyo contenido de calcio y fósforo fue del 62% y 64% respectivamente en comparación con el contenido mineral original.

Otras formas de pérdida de sustancia del diente son la atrición y la abrasión. En la atrición el desgaste dental es producido por el contacto con el antagonista, mientras que en la abrasión ocurre por la acción de elementos extraños o sustancia abrasivas (cepillado, pastas dentales) (65). Estas formas de desgaste progresan más rápido en presencia de erosión. Bartlett *et al.* (66) informaron una asociación estadísticamente significativa entre el desgaste dental y las comidas y bebidas ácidas consumidas por adultos entre 18 y 30 años. El proceso de desgaste dental por erosión presenta dos estadios. El primero es la erosión, donde los ácidos desmineralizan y ablandan la superficie del diente. En el segundo estadio, el tejido debilitado se desgasta por la acción de fuerzas de fricción intraorales (46).

3. Bebidas de consumo y erosión

Algunos estudios demuestran una asociación entre la acidez de las bebidas consumidas (por ejemplo jugos de fruta, gaseosas, bebidas deportivas) y la erosión dental (67-69).

Según diversos estudios, el consumo de bebidas sin alcohol contribuye a la aparición de lesiones superficiales de desmineralización del esmalte dental. Wang *et al.* (70) demostraron que la mayoría de los refrescos (bebidas sin alcohol) tienen una naturaleza ácida, siendo el valor de pH por debajo del pH crítico de la HA, sobre todo en aquellas con agregado de ácido cítrico y ácido ascórbico. Algunas bebidas contienen ácido fosfórico y otras ácido cítrico con un pH por debajo del pH crítico de la hidroxiapatita (71). Las gaseosas y jugos de consumo popular tienen un pH menor a 4 y producen desmineralización del esmalte (72).

Existe evidencia que los productos alimenticios y las bebidas juegan un rol importante en el desarrollo de la erosión. Sin embargo, Lussi (73) considera que el pH de la dieta solo no es suficiente para predecir su potencial para causar erosión, habiendo otros factores que modifican el proceso. Esos factores, citados por Lussi *et al.* (73) y Zero y Lussi (74) son químicos (valores de pKa, propiedades adhesivas y quelantes, contenido de calcio, fosfato y flúor), conductuales (hábitos en las comidas y bebidas, estilo de vida, excesiva ingesta de ácidos) y biológicos (cantidad de flujo salival, capacidad buffer, composición, formación de la película, composición del diente y la anatomía de los tejidos blandos).

Elhen *et al.* (75) midieron la acidez de distintas bebidas de consumo en Estados Unidos (jugo de manzana, gaseosa cola regular y dietética bebida deportivas y energéticas) y concluyeron que el pH más bajo correspondía la gaseosa regular Coke® pH 2,65 y el más alto al jugo de manzana (pH 3,46). Además, en ese estudio, se determinó que la exposición, durante 25 horas, a la bebida deportiva producía una lesión de erosión en el esmalte de mayor profundidad (131 μm) seguida por la energética (100 μm), la gaseosa regular (Coke ® 92 μm), la dietética (Diet Coke® 61 μm) y por último el jugo de manzana (57 μm) (75).

Murrell *et al.* (76) compararon en distintas bebidas, entre ellas la Coca Cola (Coke®), comercializadas en los Estados Unidos (USA) y en el Reino Unido (UK), la acidez y el grado de lesión que ocasionaban en el esmalte, encontrando, en esa bebida cola, similar pH y profundidad en la lesión de erosión producida.

Paes Torres *et al.* (77) evaluaron la influencia de una bebida cola y un jugo de soja en las lesiones superficiales y sub-superficiales de erosión del esmalte en función del tiempo, demostrando que existe una progresiva destrucción de la ultraestructura del esmalte con el incremento del tiempo de exposición en la bebida cola, a la vez que la microdureza disminuyó con ambas bebidas hasta una profundidad de 30 μm , habiendo un incremento gradual hacia una distancia de 150 μm desde la superficie expuesta.

Otras bebidas sin alcohol (Sprite®, Cappy®, Ayrán®) incluyendo la Coca Cola®, fueron estudiadas por Sener *et al.* (78) en relación a su potencial erosivo, pH y composición química, determinando en la Coca Cola® un valor de pH 2,4 y una concentración de fósforo de 592 ppm y de sodio de 280 ppm, no encontrándose calcio en su composición. Además registraron una profundidad de erosión con esta bebida de 2,8 μm a los 15 minutos de exposición y de 24,6 μm después de 180 minutos, siendo la mayor profundidad de erosión producida en comparación a las otras bebidas (78). Chuenarrom *et al.* (79) comprobaron que la erosión producida por la bebida Coke® en 180 minutos de exposición fue de 8,29 μm mientras que con el jugo de naranja fue de 1,1 μm para el mismo tiempo.

Attin *et al.* (80) obtienen datos de dureza Vickers correlacionados con la pérdida de esmalte debido a la erosión y al cepillado posterior. Devlin *et al.* (81) concluyeron que la aplicación de bebidas aciduladas reduce la dureza superficial del esmalte en relación al valor inicial a medida que aumenta el tiempo de exposición a la bebida.

Matos Gonçalves *et al.* (82) utilizaron microdureza Knoop y rugosidad superficial para evaluar el potencial erosivo de jugos de uva comerciales y concluyeron que todos producían pérdida mineral del esmalte y aumento en la rugosidad. Cochrane *et*

al. (83) midieron el potencial erosivo de diferentes bebidas mediante las variaciones de la dureza Knoop y concluyeron que la mayoría de las bebidas producía una disminución de la dureza de aproximadamente un 30% al 50% después de 30 minutos de exposición.

Lussi *et al.* (84) demostraron que los dientes primarios no son más susceptibles a la erosión que los permanentes.

Larsen y Nyvad (85) examinaron varias bebidas y jugos disponibles en supermercados daneses, en relación al efecto buffer, al contenido de calcio, fosfato y flúor y lo comparó con su habilidad para disolver el esmalte dental. Sus resultados indican que la disolución del esmalte aumenta logarítmicamente inversamente con el pH de la bebida y en paralelo con la solubilidad de la apatita. Zimmer *et al.* (86), mediante una balanza de precisión, midieron la masa inicial y final del esmalte y la dentina expuestos a diferentes bebidas sin alcohol, resultando las bebidas dietéticas, menos erosivas.

La cantidad y tipo de ácido de las bebidas de consumo, el pH y la concentración de fosfato, calcio y fluoruros actúan modificando el desarrollo de las lesiones de erosión. Se realizó un estudio (87) para determinar la concentración de fosfatos, fluoruros, el pH, la capacidad buffer de distintas bebidas comerciales disponibles en Brasil (Coca Cola® regular y light, Sprite® light, Pepsi Twist® y Guaraná Kwat®) y se determinó que Coca Cola® presentaba la mayor concentración de fosfato (16,781 mmol/L), la menor capacidad buffer (0,100 ml NaOH) y el pH más bajo (pH 2,9) mientras que Sprite® y Guaraná Kwat® las menores concentraciones de fosfatos (0,225 y 0,086 mmol/L respectivamente); la concentración de fluoruros fue mayor en Sprite® (0,561 mg/L).

III. REMINERALIZACIÓN DEL ESMALTE

Para compensar la pérdida de iones producida por erosión (o caries), el proceso de remineralización permite la precipitación de calcio, fósforo y otros elementos tendientes a recuperar la superficie dañada (88). Las lesiones iniciales de la superficie del esmalte sin cavitación pueden remineralizarse (sanar) a partir de las sales de la saliva o mediante la aplicación de remineralizantes locales para promover la restitución cristalina. Sin embargo, una vez que la superficie se ha roto y se produjo la cavidad, está indicada la terapia de restauración dental (50).

Distintos agentes naturales (saliva) y artificiales intervienen en la precipitación de calcio, fósforo y otros elementos tendientes a recuperar la superficie dañada. Los iones pueden proceder de la disolución del tejido mineralizado, de una fuente externa o una combinación de ambos. El depósito inicial de los minerales ocurre cerca o en la capa externa de la lesión. Simeone Giordano (88) sostiene que el compuesto mineral que se deposita inicialmente es una forma soluble y al transcurrir el tiempo los minerales son transferidos dentro de la lesión y eventualmente depositados en forma de compuestos insolubles, en la parte más profunda del cuerpo de la lesión.

Además, otros agentes químicos pueden depositarse sobre la superficie adamantina para evitar la disolución y/o promover la remineralización. Entre ellos se mencionaron el flúor que aún sigue siendo muy utilizado (1), los compuestos a base de calcio, incorporados en los últimos años(2), la hidroxiapatita sintética (3) y los derivados vegetales, todavía en estudio (9).

1. Efecto de la saliva sobre el esmalte desmineralizado

Entre las múltiples funciones que presenta la saliva natural (protectora, lubricante, mecánica, antibacteriana) la capacidad amortiguadora o buffer interviene en la protección del esmalte dental frente a la acción de ácidos del medio bucal (89). El principal amortiguador de la saliva es el bicarbonato, cuya concentración variará de acuerdo al flujo salival; el fósforo y las proteínas también actúan como amortiguadores salivales (89). Loyo Molina *et al.* (90) comprobaron que tanto el

número de superficies cariadas como el número de lesiones iniciales de caries, son independientes y no guardan relación con la cantidad de flujo salival estimulado o no estimulado, así como con la capacidad amortiguadora de la saliva, posiblemente debido al origen multifactorial de la caries.

Ionta *et al.* (91) evaluaron el efecto de distintas formulaciones de saliva artificial sobre la remineralización de lesiones iniciales de erosión (sin pérdida de sustancia) del esmalte dental y concluyeron que todas las fórmulas fueron capaces de remineralizar parcialmente las lesiones iniciales de erosión dental. Karlinsey *et al.* (92) por medio de la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB) compararon el efecto de soluciones de saliva simulada con distinta relación Ca/P sobre el esmalte erosionado con ácido cítrico al 0,3% y al 1%. Observaron que la menor concentración de ácido cítrico creaba poros de forma elíptica, con una zona desmineralizada más amplia y profunda y que el tratamiento con saliva simulada rica en fósforo (Ca/P 0,3) promovía la formación de capas mineralizadas sin poros, mientras que la saliva rica en calcio (Ca/P 1,6) produjo una mineralización porosa.

Meyer-Lueckel *et al.* (93) describieron el efecto de varias concentraciones de calcio y fosfato, en soluciones sustitutas de saliva basadas en linaza, sobre la pérdida mineral del esmalte pre-desmineralizado, observando que la re-mineralización fue obstaculizada por la presencia de polímeros de la linaza. El efecto inhibitorio de los polímeros también fue demostrado para la carboximetilcelulosa por su capacidad de formar complejos con el calcio y/o fosfato, reduciendo la disponibilidad de estos elementos para la re-mineralización de la lesión y aumentando la viscosidad de la saliva artificial disminuyendo, de ese modo la velocidad de difusión dentro de la solución (93).

Devlin *et al.* (81) utilizaron un producto comercial de saliva artificial (Salivart®) para remineralizar esmalte expuesto a la Coca Cola®, observando que la dureza del esmalte, aumentaba parcialmente un 18% en relación al esmalte desmineralizado.

Eisenburger *et al.* (94) demostraron el endurecimiento producido por la acción de saliva artificial (en distintos tiempos), del esmalte reblandecido después de la erosión con ácido cítrico (al 0,3% durante 2h), determinando que el proceso de

remineralización fue completo (con relación a la estabilización mecánica frente al ultrasonido) después de 6 h de inmersión en saliva aunque considera que la remineralización no restaura la estructura superficial igual al esmalte sano.

2. Efecto de compuestos sintéticos sobre el esmalte desmineralizado

La caseína es una proteína de la leche animal que estabiliza el calcio y fosfato, preservándolos en una forma soluble que es el fosfato de calcio amorfo (95). Recientemente se ha estudiado el efecto remineralizante del casein- fosfopéptido junto con el fosfato amorfo de calcio (CPP-ACP) (96, 97). Mettu *et al.* (98) midieron la recuperación de la dureza en lesiones de caries de esmalte con la aplicación de CPP-ACP in vitro y observaron que después de 1 h la dureza se incrementaba, adquiriría un pico a las 6 h y se mantenía en los límites normales a las 12 h. Hedge y Moany (99) evaluaron cuantitativamente el potencial de re-mineralización del CPP-ACP sobre lesiones de esmalte sub superficiales y concluyeron que este potencial se incrementa a medida que aumentaba el tiempo de exposición al compuesto.

El CPP-ACP se puede incorporar en pastas dentales, colutorios, dulces (goma de mascar) y bebidas sin efectos adversos organolépticos (96, 100, 101).

Sin embargo, Zhao *et al.* (102) citando una revisión realizada en el año 2008 sobre la eficacia clínica de los derivados de la caseína, concluyeron que no había suficientes pruebas clínicas existentes (en cantidad, calidad o ambas) para hacer una recomendación en cuanto a la efectividad a largo plazo de los derivados de la caseína, específicamente CPP-ACP, en la prevención de caries in vivo y el tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria o sequedad en la boca.

El efecto del flúor ha sido ampliamente estudiado para inducir la reparación de lesiones del esmalte, en distintas presentaciones y combinaciones (103-108).

Más recientemente se ha informado sobre el efecto en la remineralización del esmalte de la nanohidroxiapatita sintética (3, 109, 110).

3. Efecto de derivados vegetales sobre el esmalte desmineralizado

La teobromina es un alcaloide de la familia de la teofilina y la cafeína que se encuentra principalmente en las semillas de la planta de cacao (111). Los efectos de la teobromina sobre la dureza y la topografía del esmalte humano fueron descritos por Kargul *et al.* (112). Amaechi *et al.* (113) señalan que la saliva artificial con teobromina puede mejorar el potencial de remineralización de un medio formador de apatita.

Otro derivado es el extracto de semillas de uva. Esta semilla es una rica fuente de proantocianidinas que actúan fortaleciendo los tejidos a base de colágeno mediante el aumento de enlaces cruzados de colágeno (114). El efecto del extracto de semilla de uva en la remineralización de caries artificiales fue investigado por Mirkarimi *et al.* (13) resultando en el depósito de grumos amorfos sobre el esmalte desmineralizado y un incremento de la microdureza.

Rhus chinensis es una planta que durante mucho tiempo ha sido utilizada por los profesionales de la medicina popular en Asia. Las hojas, raíces, tallo, corteza, frutos y particularmente las agallas en las hojas (*Galla chinensis*) se reconoce que tienen efectos preventivos y terapéuticos sobre las diferentes enfermedades y pueden inhibir la desmineralización del esmalte (*in vitro*) y mejorar la re-mineralización con fluoruros (115). Cheng *et al.* (116) sostienen que el mecanismo de acción del extracto de *Galla chinensis* es diferente al del flúor, pues actuaría retardando la remineralización del esmalte en las capas superficiales facilitando el transporte de iones hacia el cuerpo de las lesiones de esmalte avanzadas.

La hesperidina es un flavonoide extraído de los cítricos (cáscara de naranjas). Islam *et al.* (117) demostraron que la hesperidina tiene la habilidad para preservar y estabilizar el colágeno dentinario (de la dentina radicular) e inducir la remineralización.

4. Propiedades de la semilla de sésamo

La semilla de sésamo o ajonjolí es extraída del *Sesamum Indicum*, planta que se cultiva en India, África, China, Sudán (Figura 7). Es valorada por sus componentes nutricionales que proveen numerosos efectos beneficiosos sobre la salud. Entre los componentes bioactivos presentes en la semilla se incluyen minerales, vitaminas, fitoesteroles, ácidos grasos poliinsaturados, tocoferoles y una clase única de lignanos como la sesamina y la sesamolina (16).

Los lignanos, pese a la diversidad de estructuras que presentan, poseen la característica común de estar formados por dos unidades de fenilpropano (C_6C_3) enlazadas por el átomo central de sus cadenas laterales (posiciones 8-8') (Figura 8).

Elleuch *et al.* (118) informaron la composición química de la semilla de sésamo (procedente de Sudán) en la cual, el contenido (del total de materia seca) de aceites fue del 52,24%; proteínas 25,77%; calcio 1,03%; fósforo 516 mg/100g; potasio 525,9 mg/100g; magnesio 349,9 mg/100g. Porcentajes de aceites similares fueron determinados en semillas de sésamo de Turquía (54,26%), como también se encontraron polifenoles asociados a fibra dietaria y ácidos grasos libres (oleico, linoleico, palmítico y esteárico) (119).



Figura 7. **A** *Sesamum Indicum* o Ajonjolí. **B** Semillas.
Fuente: Temas de Farmacognosia, Plantas Medicinales (120)

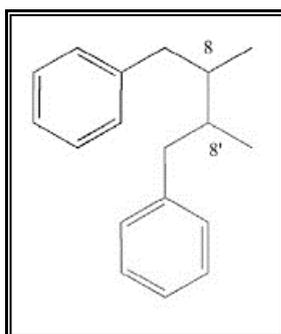
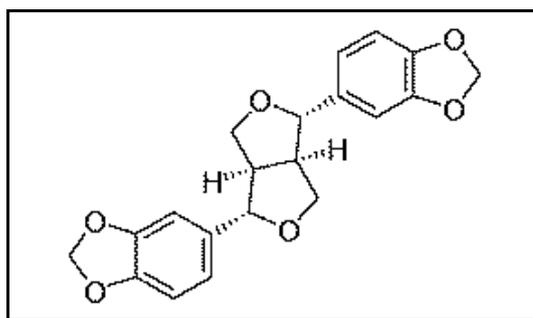
A**B**

Figura 8. **A** Estructura química del lignano. **B** Estructura molecular de la sesamina.
Fuente: **A** Moss, GP (121). **B** Calle Álvarez, J (122)

El-Saied *et al.* (123) encontraron valores elevados de aminoácidos como ácido glutámico, arginina, ácido aspártico y leucina. También, en semillas de las variedades locales de Corea, están presentes otros aminoácidos como histidina, lisina, fenilalanina, isoleucina, valina, treonina (124). La metionina es un aminoácido azufrado esencial contenido en buena cantidad en el ajonjolí (125) y otro es el triptófano (126). Además, es fuente de vitaminas del complejo B (niacina, ácido fólico, timina, piridoxina y riboflavina (15).

Sin embargo, la semilla contiene antinutrientes como el ácido fítico (Figura 9) que es un ácido fosfórico derivado del mio-inositol con capacidad de formar quelatos con minerales esenciales tales como el calcio, magnesio entre otros (125). El ácido fítico (AF) y sus sales constituyen la principal forma de almacenamiento de fósforo (P), aunque es necesaria la actividad de fosfatasa endógenas (fitasas) que sean capaces de liberar el grupo fosfato de la estructura del fitato. Martínez Domínguez *et al.* (127) mencionan entre los beneficios del fitato la inhibición de la formación de cálculos, disminución del colesterol, poder antioxidante y la prevención de caries por su alta afinidad por la hidroxiapatita.

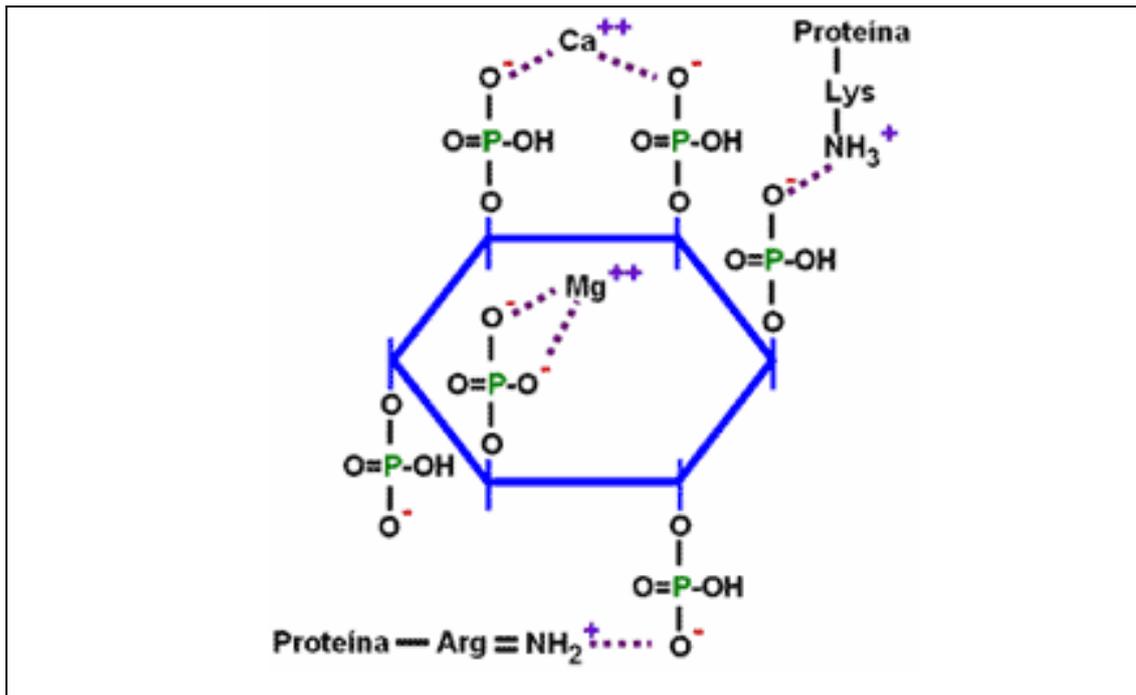


Figura 9. Estructura molecular del ácido fítico y su interacción con cationes y aminoácidos. Fuente: www.engormix.com (128)

El AF, a pH neutro y al pH que normalmente presentan los alimentos, es una molécula cargada negativamente y por tanto muy reactiva, que presenta una elevada capacidad para formar complejos o unirse a cationes y moléculas cargadas positivamente como proteínas. La interacción del AF con las proteínas es pH-dependiente, mientras que con los cationes la interacción es debida exclusivamente a sus numerosos grupos fosfato (127). Aparentemente, en la semilla el AF se encuentra como sales relativamente solubles de sodio (Na) o potasio (K). Las sales de calcio (Ca) y magnesio (Mg) son solubles a pH ácidos e insolubles a pH básicos, por lo tanto a pH fisiológico (pH 7,35 a 7,45) serían insolubles, de ahí el descenso de la biodisponibilidad mineral (129).

Chaparro *et al.* (130) demostraron que el contenido de calcio de la semilla de amaranto se incrementaba con el proceso de germinación (al segundo día) posiblemente debido a la hidrólisis del complejo ácido fítico - calcio, por la acción de fitasas endógenas. Las fitasas aumentan en todos los granos durante la germinación y su acción consiste en liberar el grupo ortofosfato de la molécula de mioinositol (129).

IV. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES SÓLIDAS

La caracterización de un sólido nos proporciona información acerca de distintos parámetros como su composición química, su estructura (en volumen y superficie), la textura y propiedades mecánicas.

1. Microanálisis por sonda de electrones (EDS)

El microscopio electrónico de barrido (MEB)¹ es uno de los instrumentos más versátiles para el examen y análisis de características microestructurales de sólidos; proporciona información morfológica y topográfica de la superficie de los mismos. Una de las razones de ello es su alta resolución (de 20 a 50 Å). Otra característica importante es la apariencia tridimensional de la imagen de la muestra, resultado de su gran profundidad de foco (aproximadamente entre 100 y 1000 veces mayor que la de un microscopio óptico a la misma magnificación).

El MEB, produce una imagen usando un haz de electrones que barre la muestra, en vez de un haz estacionario de luz como usa el microscopio óptico convencional. Dirige un haz de electrones de energía determinada emitidos por un cátodo de tungsteno o wolframio, sobre la muestra, en un receptáculo a alto vacío, pues la presencia de gas atenuaría el haz. Generalmente, trabaja a un vacío aproximado de 10^{-6} Torr. En estos microscopios las muestras no conductoras (orgánicas, biológicas, vidrios, polímeros, etc.) necesitan una cubierta conductora metálica (por ejemplo oro), para evitar carga eléctrica y daño por radiación, y lograr su observación. Los nuevos microscopios electrónicos de barrido (ESEM)² tienen la capacidad de trabajar con bajo vacío (hasta 20 torr), aumentando notablemente el campo de aplicación, llegando a extremos de poder estudiar en esas condiciones muestras con un 100% de humedad relativa (131). Cuando el haz electrónico finamente colimado, incide en la superficie de la muestra que se examina, la interacción entre los electrones y los átomos de la muestra da origen a distintos tipos de señal (Figura 10). Las principales son: los electrones reflejados, provenientes del haz incidente y que rebotan del

¹Frecuentemente SEM, de *Scanning Electron Microscopy*

²Del inglés *Environmental Scanning Electron Microscope* (Microscopio electrónico de barrido ambiental)

blanco, son los electrones retrodifundidos; los electrones que el haz arranca del blanco se llaman secundarios, el consiguiente reordenamiento de los electrones dentro de los átomos del blanco emite rayos X.

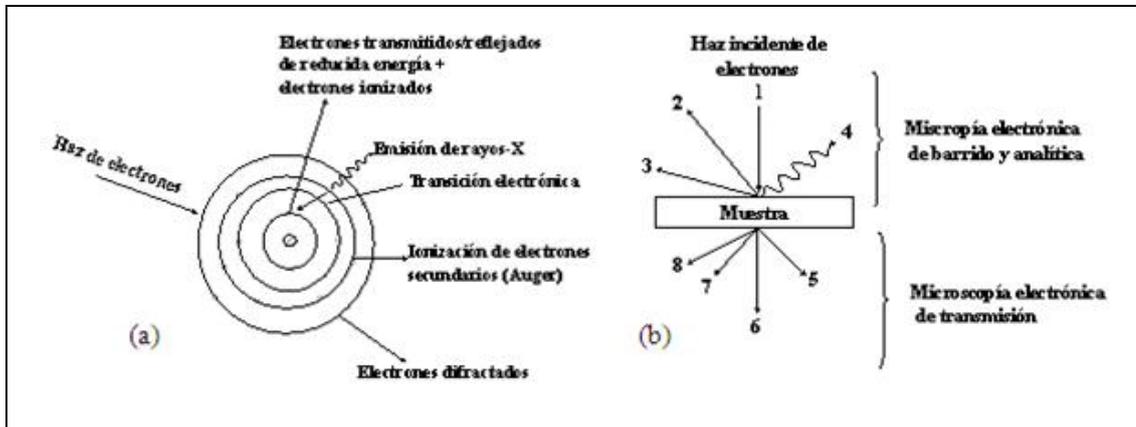


Figura 10. Interacción de electrones con la materia y técnicas microscópicas. (a) Cuando un haz de electrones incide en una muestra ocurren diferentes fenómenos físicos. (b) Técnicas microscópicas analíticas que registran y procesan las diferentes señales: 1: Haz de electrones; 2: electrones retrodispersados; 3: electrones secundarios; 4: rayos X o fotones ópticos; 5: dispersión elástica coherente; 6: transmisión de electrones; 7: dispersión inelástica; 8: Dispersión elástica incoherente. Fuente: García Jacomino, J (132)

La emisión de electrones secundarios depende fuertemente de la topografía de la muestra: las zonas altas emiten más que las bajas, lo cual hace que la imagen producida por estos electrones sea muy similar a la producida por un microscopio óptico, pero de mayor profundidad de foco.

La retrodifusión de electrones, en cambio, depende del número atómico del blanco: los átomos más pesados reflejan más electrones que los más livianos. Las imágenes producidas por electrones retrodifundidos no muestran relieve como las anteriores, pero muestran claramente zonas donde hay átomos pesados, aunque estén tapados por otros más livianos, pues el haz electrónico penetra en la materia. En consecuencia, la imagen de electrones retrodifundidos se parece más a una placa de rayos X médica.

Por último, los rayos X emitidos son característicos de los átomos que los emiten, y permiten un análisis cuantitativo de sustancias en cantidades muy pequeñas.

El análisis de los rayos X característicos emitidos por una muestra implica medir muy precisamente sus longitudes de onda o energías y las correspondientes intensidades. Cuando se usa el sistema dispersivo en energías, el detector de rayos X se coloca antes de dicho sistema dispersante a fin de coleccionar la mayor cantidad de radiación posible. Así la señal de rayos X proveniente del detector es analizada por un sistema de análisis de altura de pulsos donde esta altura está relacionada con la energía del fotón incidente. Para que los procedimientos de corrección desarrollados para análisis cuantitativo sean válidos, la muestra debe ser de composición homogénea y tener una superficie plana, dentro del diámetro de la nube de difusión de electrones. El volumen de interacción del haz con la muestra que permite conocer el volumen de muestra analizado es del orden de $1 \mu\text{m}^3$ (Figura 11).

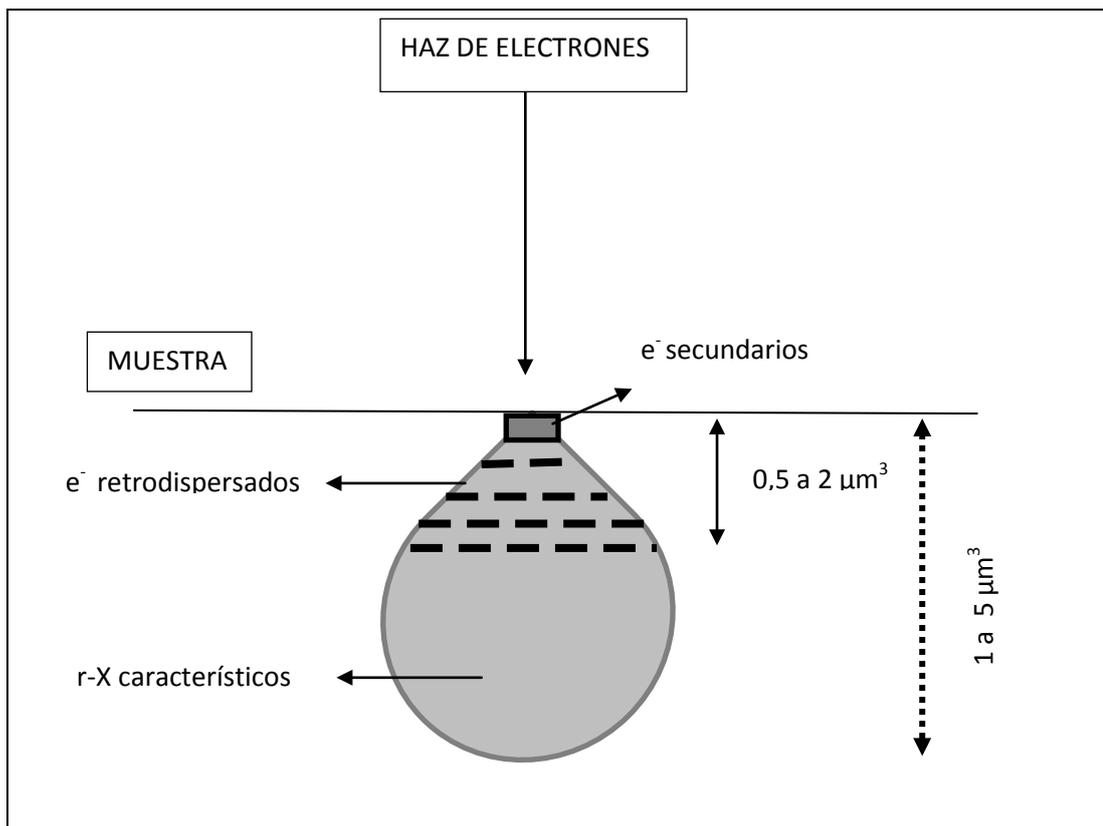


Figura 11. Esquema de la interacción del haz de electrones con la muestra. Los r-X característicos brindan información de un volumen de $1 \text{ a } 5 \mu\text{m}^3$ la composición de la muestra. Fuente propia.

Los rayos X, al igual que los electrones acelerados, son radiaciones ionizantes. Es decir, los rayos x generados en la muestra por el haz de electrones pueden interactuar

con los átomos circundantes, ser absorbidos, arrancar electrones o nuevos fotones de los mismos, por lo tanto, una parte de los rayos x generados no van a escapar de la muestra y no van a poder ser detectados.

El análisis cualitativo se basa en la discriminación de las energías de los rayos X captados por el detector del microscopio, sabiendo que cada energía es característica del tránsito orbital de determinados electrones en cada elemento. El resultado del análisis es un espectro de “cuentas vs energía”. Las partes principales del espectrómetro son: - el detector - el procesador electrónico - el analizador multicanal. El detector genera un pulso de carga proporcional a la energía del rayo X. Este pulso se convierte en voltaje. La señal se amplifica a través de un transistor (FET)³, se aísla de otros pulsos, se vuelve a amplificar y se identifica electrónicamente como proveniente de un rayo X con una energía específica (133).

El espectrómetro realiza dos funciones:

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

El software del equipo de espectrometría por energía dispersa de rayos X (EDS/EDAX)⁴ posee unas tablas internas con constantes determinadas experimentalmente, que pueden utilizarse para calcular un análisis cuantitativo rápido, con un margen de error de hasta un 20% relativo, aproximadamente. Aunque en principio parezca un margen elevado, en la práctica, si conocemos la muestra que estamos observando, será una información suficiente para complementar a la imagen obtenida en el microscopio. En cuanto al límite de detección de elementos minoritarios, puede llegar a ser de entre el 1% y el 0,1% en peso de MMF (Minimum-detectable Mass Fraction), o bien hasta 10-20 gramos de MDM (Minimum Detectable Mass).

En todo caso, el analizador por microsonda electrónica de barrido (EPMA)⁵, es la herramienta adecuada para realizar un análisis cuantitativo. El EPMA está diseñado

³Del inglés *Field-Effec Transistor* (Transistor de efecto campo)

⁴Del inglés *Energy dispersive X-ray spectroscopy analysis*

⁵Del inglés *Electron Probe Microanalysis*.

para realizar análisis por rayos-X precisos, siendo la captura de imágenes un complemento extra.

En nuestro trabajo de investigación utilizamos microscopios electrónicos pertenecientes a distintas dependencias de la Universidad Nacional de La Plata. El ESEM marca FEI, modelo Quanta 200 (Figura 12), del Laboratorio de Investigaciones en Metalurgia Física (LIMF) cuenta con capacidad analítica por rayos X. El detector de rayos X dispersivo en energías adosado al microscopio permite obtener imágenes de rayos X, además de los espectros de composición química elemental. Estos análisis proveen información cualitativa y semicuantitativa de la zona en que se encuentran determinados elementos en forma simultánea (131). Los microscopios FE- SEM trabajan utilizando como fuente de electrones un cañón de emisión de campo (Field Emission Gun, FEG) que proporcionan haces de electrones de alta y baja energía más focalizados, lo que permite mejorar la resolución espacial, minimizar cargas sobre el espécimen a observar, causando además menos daños en muestras sensibles. Los detectores Helix y vCD posibilitan la obtención imágenes de alta resolución trabajando a bajo vacío y muy bajos kV sin necesidad de metalizar las muestras, lo que permite visualizar muestras biológicas y materiales de muy diverso tipo (polímeros, cerámicas no conductoras, materiales híbridos órgano-inorgánicos, etc.), incluso a la escala nanométrica.

El Servicio de microscopía del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas (CINDECA) cuenta con un microscopio electrónico de barrido marca Philips SEM 505 (Figura 13), con capacidad analítica a través del Sistema de Microsonda EDAX DX PRIME 10 para análisis cualitativo/cuantitativo. El sistema de microanálisis EDAX permite la realización de rápidos análisis químicos de elementos de número atómico Z mayor que 11 (Na) y concentraciones superiores a 0.5 wt %⁶.

⁶ Unidad de medida en inglés correspondiente a peso%



Figura 12. Microscopio electrónico de barrido ambiental ESEM FEI QUANTA 200.
Fuente: Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis del LIMF.
Facultad de Ingeniería UNLP (130)



Figura 13. SEM PHILIPS 505 CINDECA. Gentileza Biol. Mariela Theiller.
MEB-CINDECA

Las principales utilidades del SEM son la alta resolución ($\sim 100 \text{ \AA}$), la gran profundidad de foco que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras. La técnica ha sido perfeccionada con las facilidades derivadas de la digitalización y tratamiento de las imágenes. Mediante la aplicación conjunta de ambas técnicas (SEM-EDAX) es posible obtener la distribución de los elementos químicos seleccionados en áreas definidas de interés (mapping). Otra

aplicación en el campo biológico es el análisis inmunocitoquímico de los componentes de la superficie de la muestra. Esta técnica se utiliza con bastante éxito para el análisis de los antígenos de superficie linfocitarios, así como para los lugares de unión del virus del SIDA. Además, el MEB brinda la posibilidad de congelar la muestra, fracturarla mecánicamente y examinar el interior de las células (134).

Para la preparación de las muestras se utiliza un metalizador Balzers SCD 030, que por el método de “sputtering” (pulverización) permite realizar depósitos delgados de Au, Au-Pd, Cr, Ni, y Cu. El Sputter Coater Edwards S150B, permite hacer depósitos delgados de Au, y el evaporador de carbono, depósitos de carbón. La dispersión de partículas y limpieza de superficies se realiza con un vibrador ultrasónico.

2. Microscopio de fuerza atómica (AFM)

El Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)⁷ sirve para caracterizar la superficie de muestras sólidas y semisólidas relativamente planas. Es un instrumento mecano-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los nanonewton. Al analizar una muestra, se registra continuamente la altura sobre la superficie de una sonda o punta cristalina de forma piramidal (Figura 14 A y B). La sonda va acoplada a un listón (cantiléver) microscópico, muy sensible al efecto de las fuerzas, de sólo unos 200 μm de longitud (135).

La fuerza atómica se puede detectar cuando la punta vibrante se aproxima periódicamente, interactúa y se retrae de la superficie de la muestra. La información sobre la superficie bajo examen se recoge a través de una punta muy delgada (pocas decenas de micrones) montada en el extremo de una varilla elástica. Esta última consiste, por lo general, de uno o varios haces de fibras de nitruro de silicio o de silicio metálico cuya longitud varía entre 100 y 500 micrómetros (0,1 a 0,5 mm), con un espesor entre 0,5 y 5 micrómetros. La punta sensible transmite la fuerza que se ejerce entre la misma y los átomos o moléculas de la superficie de la muestra cuando aquélla se mueve hacia arriba y hacia abajo sobre ésta última, detectando su rugosidad, y este movimiento puede ser medido con extrema precisión por medio de,

⁷ Del inglés *Atomic Force Microscopy*

por ejemplo, un haz láser reflejado por un espejo pequeño colocado sobre la punta y recogido por un elemento sensible (fotodiodo). Los datos procesados permiten reconstruir la estructura superficial en la dirección vertical, “z” (Figura 15). Una pequeña unidad que contiene un cristal piezoeléctrico, del tipo de las antiguas cápsulas con la púa de los tocadiscos, permite detectar la estructura horizontal de la superficie, en función de las ordenadas “x” e “y” (Figuras 14 *A* y 15). Se puede obtener así, con resolución nanométrica, la topografía de una muestra en una escala que varía desde 100 hasta 150.000 nm (0,15 mm), pudiéndose lograr resoluciones del orden de 1 nm (136).

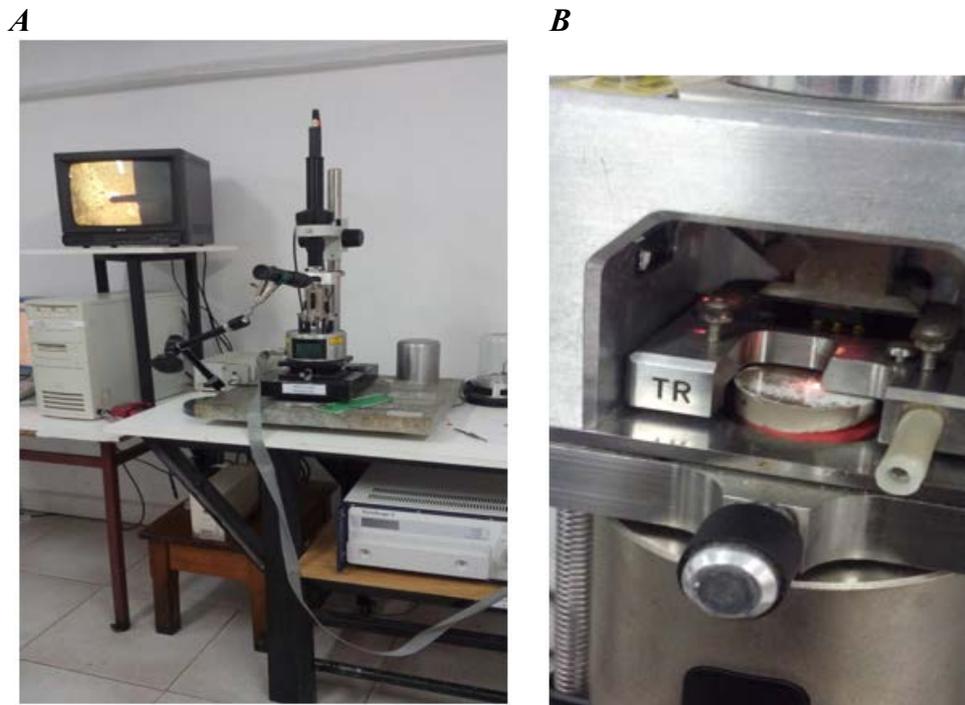


Figura 14. Microscopio AFM. *A* Microscopio en funcionamiento. En la pantalla se observa la proyección del cantiléver. *B* Detalle de la platina con una muestra.
 Gentileza Dr. Eduardo Prieto, INIFTA-CONICET

El microscopio de AFM, puede realizar dos tipos de medidas: imagen y fuerza. En la modalidad de imagen, la superficie es barrida en el plano de la superficie por la punta. Durante el barrido la fuerza interatómica entre los átomos de la punta y los átomos en la superficie de la muestra, provoca una flexión del listón. Esta flexión es registrada por un sensor adecuado (normalmente balanza óptica) y la señal obtenida se introduce en un circuito o lazo de realimentación. La fuerza interatómica se puede

detectar cuando la punta está muy próxima a la superficie de la muestra. Las medidas de fuerza son útiles en estudios de fuerzas de adhesión y permiten estudiar a nivel de una sola molécula interacciones específicas entre moléculas (ej. interacción antígeno-anticuerpo, interacción entre hebras complementarias de ADN) o interacciones estructurales de las biomoléculas (plegado de proteínas) así como caracterizar la elasticidad de polímeros (135).

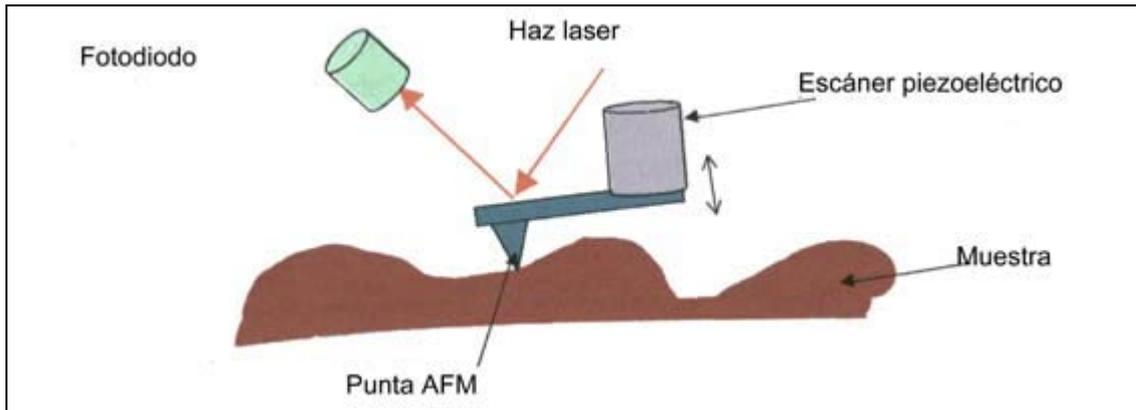


Figura 15. Esquema del funcionamiento del AFM. Fuente: Bonfiglioli A (136)

Se distinguen dos modos de trabajo: manteniendo la interacción punta-muestra constante o manteniendo la distancia punta-muestra constante. Además se puede trabajar en modo contacto, no-contacto o contacto intermitente. Se pueden hacer medidas en diferentes medios: aire, líquido, vacío, atmósfera controlada, etc. (137).

En la microscopía de efecto túnel (STM) se mide la corriente eléctrica que aparece entre la punta y la muestra cuando se aplica una diferencia de potencial entre ambas. Cuando la punta se encuentra a unos 10 \AA de la muestra, los electrones fluyen hacia la punta por efecto túnel, o viceversa, según el signo del voltaje aplicado. Para que esto suceda es necesario que la muestra sea conductora o semiconductor. La imagen obtenida corresponde a la densidad electrónica de los estados de la superficie.

En la microscopía de efecto túnel se pueden obtener imágenes con resolución por debajo del ångström.

3. Dureza superficial

La dureza superficial se define como la resistencia del material a ser rayado y a la deformación plástica mediante la indentación. También puede referirse a la resistencia a la abrasión o al corte. La dureza no es una propiedad fundamental del material sino que está relacionada con su comportamiento elástico (138).

El ensayo de dureza no destruye la muestra. Los métodos disponibles se distinguen por la forma del penetrador, las condiciones de aplicación de la carga y la forma de calcular la dureza. La elección del método a emplear depende de distintos factores como el tipo, dimensiones y espesor de la muestra.

En la prueba Vickers el valor de la dureza, expresada como HV, es la razón de la carga aplicada al área de indentación. La punta tiene una forma piramidal de base cuadrada y las medidas de las diagonales de la indentación se efectúan con la ayuda de un microscopio (Figura 16).

El Triboindenter (TI) Hysitron (Figura 17) está diseñado para medir las propiedades mecánicas de las superficies a escala submicroscópica. El indentador lleva un pequeño diamante, que está configurado como una pirámide o una esfera, y empuja la punta de diamante en la superficie del material que se está probando. La profundidad de la indentación puede oscilar entre un par de cientos de nanómetros y un máximo de 4 micras. Típicamente, el radio a través de la indentación será de 1 a 5 micrómetros. Midiendo la fuerza requerida para empujar la punta del diamante en el material en comparación con la profundidad de la indentación, el instrumento puede determinar la dureza de la muestra. Viendo hasta qué punto el material vuelve a su forma anterior determina su módulo elástico (la rigidez de sus enlaces atómicos).



Figura 16. Microdurómetro Future Tech 700 (LIMF)

A



B



Figura 17. *A* Triboindenter TI 900 Hysitron (INTEMA). *B* Software

Además de las propiedades mecánicas, el nanoindentador se puede utilizar para rascar películas y revestimientos y para ver cómo se comporta el desgaste. Algunas de sus funciones se detallan a continuación (139):

- Nanoindentación cuasistática. Mide el módulo de Young, dureza, tenacidad a la fractura y otras propiedades mecánicas a través de la indentación.
- Pruebas de rascado. Cuantificar la resistencia al rayado, las fuerzas de delaminación críticas, los coeficientes de fricción y más con supervisión simultánea de fuerza y desplazamiento normal y lateral.
- Óptica descendente. Cámara CCD en color para la identificación individual de la estructura antes de la prueba.
- Captura de imágenes SPM. La imagen in situ mediante la punta del indentador proporciona un posicionamiento de precisión nanométrico y una topografía SPM.
- Scanning Wear™. Observar y cuantificar los volúmenes de desgaste y las tasas de desgaste utilizando la capacidad de imagen in situ.
- Control de realimentación. Funciona en control de carga o desplazamiento en bucle cerrado para permitir técnicas de prueba tales como fluencia y relajación de estrés.

El TI presenta un módulo nano cuya carga máxima de trabajo es de $10000\mu\text{N}$ y un módulo de microindentación que permite hasta 10N de carga. Los resultados de “H” (dureza), “Er” (módulo reducido) y “hc” (profundidad de contacto) se obtienen por la metodología Oliver-Phar (140).

Generalmente, el indentador para la nanoescala es una punta de diamante Berkovich de forma de pirámide trigonal que crea una indentación generalmente de $1\mu\text{m}$ de longitud bajo cargas de $0,25$ a $50\mu\text{N}$. De acuerdo a Schlueter *et al.* (141)

esta técnica es más sensitiva a los cambios en la capa más superficial del esmalte erosionado.

Siempre es aconsejable que las profundidades de indentación sean un orden de magnitud mayor que la rugosidad de la superficie a ensayar. O que la rugosidad no supere el 10% de la profundidad de indentación para obtener ensayos y lecturas repetidas.

4. Difracción de rayos- X (DRX)

La difracción de rayos X ha proporcionado un medio adecuado y práctico para la identificación cualitativa de compuestos cristalinos y sobre el ordenamiento y espaciado de los átomos en materiales cristalinos. El método de difracción de rayos X en general y en particular de polvo cristalino es el único método analítico capaz de suministrar información cualitativa y cuantitativa sobre los compuestos cristalinos presentes en un sólido, basándose en el hecho de que cada sustancia cristalina presenta un diagrama de difracción único. Así, pueden compararse un diagrama de una muestra desconocida y el de una muestra patrón, y determinar su identidad y composición química (142).

La técnica consiste en hacer incidir un haz de rayos X sobre el sólido sujeto a estudio. La interacción entre el vector eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa dan lugar a una dispersión. Al producirse la dispersión tienen lugar interferencias (tanto constructivas como destructivas) entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación (Figura 18). El resultado es la difracción, que da lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse según la ubicación de los átomos en el cristal, por medio de la ley de Bragg. La misma postula que cuando un haz de rayos X incide sobre la superficie de un cristal formando un ángulo θ una porción del haz es dispersada por la capa de átomos de la superficie; la porción no dispersada del haz penetra en la segunda capa de átomos donde, nuevamente una fracción es dispersada y así sucesivamente con cada capa hasta la profundidad de aproximadamente 1000 nm, lo que lo hace una técnica

másica. El efecto acumulativo de esta dispersión producida por los centros regularmente espaciados del cristal es la difracción del haz.

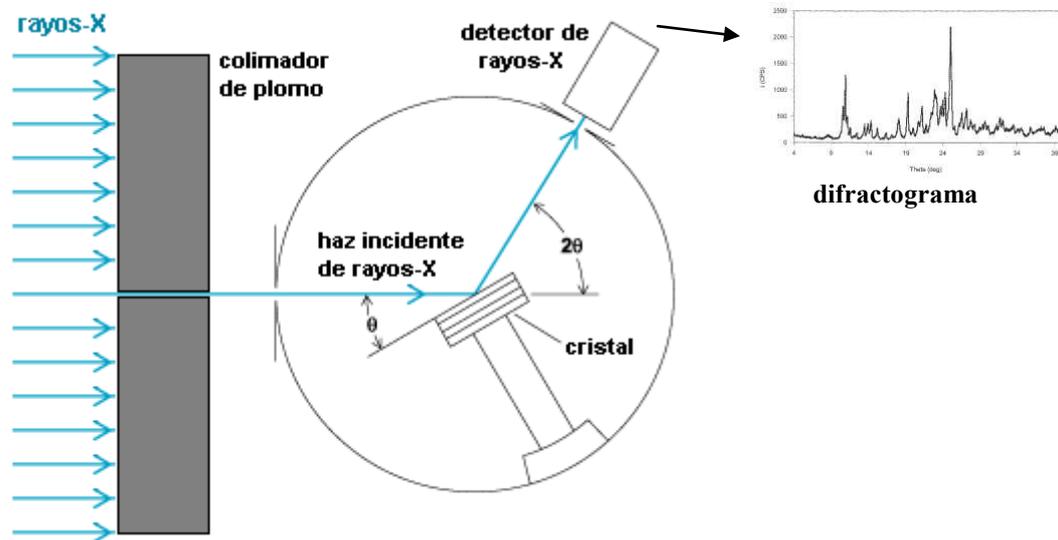


Figura 18. Esquema del difractómetro de rayos X. El funcionamiento se basa en obtener, de la fuente de rayos-X, un haz fino con la ayuda de un colimador de plomo, que envía el haz directamente hacia la superficie de un cristal, que forma cierto ángulo con el haz incidente de rayos-X y envía el haz reflejado hacia un detector. El aparato se puede girar hasta obtener los ángulos en los cuales se miden los “picos” de mayor intensidad. Fuente: La mecánica cuántica blogspot.com.ar (143).

La identificación de las especies a partir de su diagrama de difracción de polvo cristalino se basa en la posición de líneas y en sus intensidades relativas. Las intensidades de las líneas dependen del número y del tipo de centros atómicos de reflexión que existen en cada grupo de planos y las concentraciones relativas de los distintos planos. Generalmente para identificar las diferentes fases cristalinas obtenidas se utilizan los patrones de difracción contenidos en la base de datos JCPDS (Joint Committee for Powder Diffraction Sources) de la ICDD (International Center for Diffraction Data). En estas fichas figuran los ángulos de difracción, intensidades, espaciados reticulares, índices de Miller de los planos, así como otras características del material (composición, color, punto de fusión, clasificación mineralógica, densidad) y las condiciones en que se hizo la difracción (información bibliográfica). Hasta el 2005 este archivo contenía diagramas de más de 477000 materiales de referencia. Las bases de datos están disponibles en CD-ROM. Si la muestra contiene dos o más compuestos cristalinos, la identificación se hace más difícil. En este caso

se utilizan varias combinaciones de las líneas más intensas hasta encontrar una coincidencia. Los materiales producen picos de difracción cuyas anchuras se relacionan con el tamaño de los cristales. Los materiales con cristales muy desarrollados producen picos bien definidos, y los menores a 1 μm generan picos de difracción anchos y hasta domos.

5. Espectroscopia infrarroja (FT-IR)

La región del infrarrojo del espectro abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12800 y 10 cm^{-1} , que corresponden a longitudes de onda de 0,78 a 1000 μm . Según las técnicas experimentales y las aplicaciones, la región infrarroja total puede subdividirse en tres regiones denominadas infrarrojo cercano, medio y lejano. Los espectrofotómetros de Transformada de Fourier (TF- IR) se diseñaron para acceder a la región de 10 a 400 cm^{-1} (IR lejano) (Figura 19).

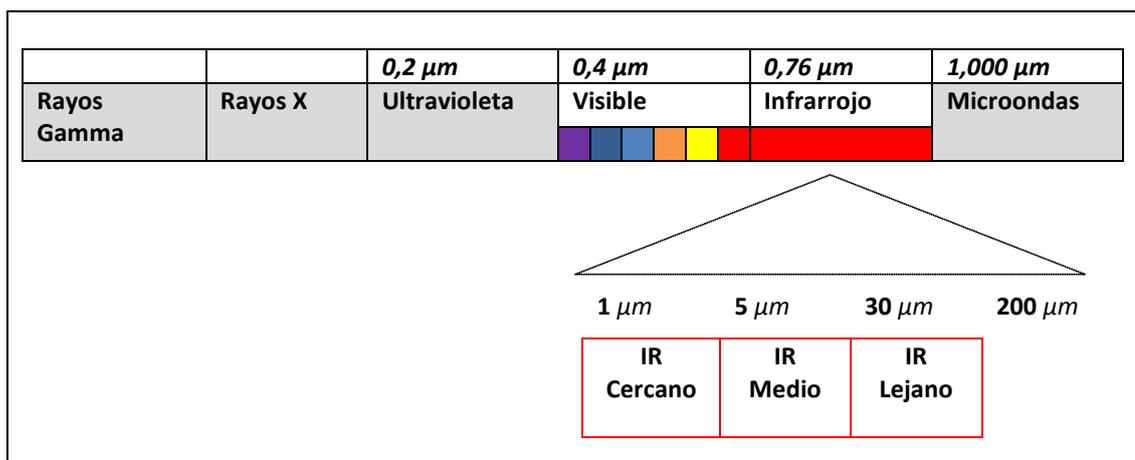


Figura 19. Rango de medición infrarrojo. Fuente propia

La espectrometría infrarroja se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Estas frecuencias dependen de la forma de la superficie de energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y, posiblemente, el acoplamiento vibracional. Si la molécula recibe luz con la misma energía de esa vibración, entonces la luz será absorbida si se dan ciertas condiciones. Para que una vibración aparezca en el espectro infrarrojo, la molécula debe someterse a un cambio en su momento dipolar durante la vibración. Cada

molécula, según las características de sus enlaces absorberá radiación de una o varias longitudes de onda específicas por lo que podrá ser identificada (142). Los espectros de absorción en el infrarrojo son el resultado de los distintos cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros (142).

Con el fin de hacer medidas en una muestra, se transmite un rayo monocromo de luz infrarroja a través de la muestra, y se registra la cantidad de energía absorbida. Repitiendo esta operación en un rango de longitudes de onda de interés (por lo general, $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) se puede construir un gráfico. Al examinar el gráfico de una sustancia, se puede obtener información sobre la misma. Esta técnica funciona casi exclusivamente en enlaces covalentes, y se usa mucho en química, en especial en química orgánica para la identificación de mezclas complejas.

El espectrofotómetro de Infrarrojo requiere de una fuente de radiación continua y un detector sensible a la radiación, en el infrarrojo (Figura 20 A). Funciona con una pequeña muestra que es colocada en una celda infrarroja (Figura 20 B), donde es sometida a una fuente de luz infrarroja, la cual hace un barrido desde las longitudes de onda de 4000 cm^{-1} hasta $600/400\text{ cm}^{-1}$. La intensidad de la luz transmitida a través de la muestra es medida en cada número de onda, lo que permite que la cantidad de luz absorbida por la muestra sea calculada por la diferencia entre la intensidad de la luz antes y después de pasar por la celda de muestra. Esto se conoce como el espectro infrarrojo de la muestra (Figura 20 C). En la región infrarroja del espectro, las frecuencias de resonancia (vibración) de una molécula se deben a la presencia de grupos funcionales moleculares. Un grupo funcional es simplemente un grupo de dos o más átomos, enlazados de una manera específica. Por lo tanto, es posible determinar su presencia en una muestra mediante la prueba FTIR, simplemente midiendo la absorción a diferentes longitudes o números de onda.

A



B



C

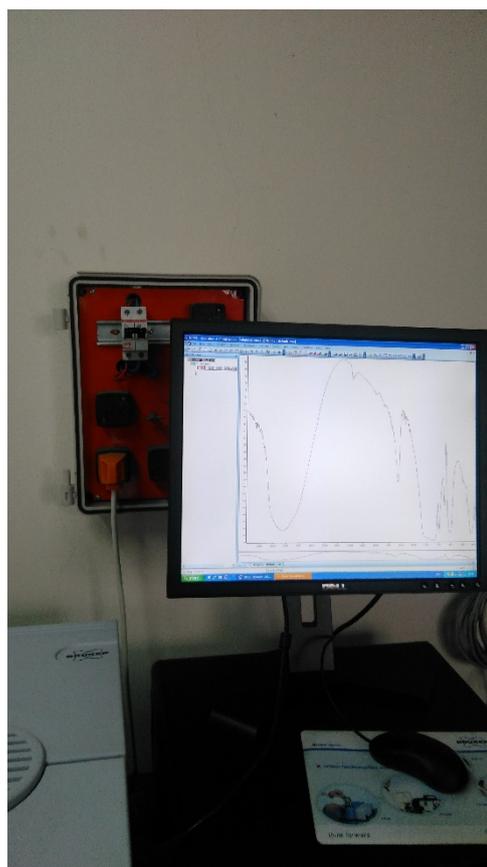


Figura 20. *A* Equipo de FTIR. *B* Detalle de la celda y la platina. *C* Espectro infrarrojo. Gentileza: Jorge Sambeth y Graciela Valle. CINDECA

6. Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

La técnica de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, del nombre en inglés Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), es una variante de las técnicas de análisis por espectrometría de masas. Las ventajas principales de esta técnica radican en la alta precisión, bajos límites de detección y bajo coste económico, analizando la mayoría de los elementos e isótopos presentes en la tabla periódica de manera simultánea en no más de un par de minutos (Figura 21). Es por lo tanto una técnica ideal en el análisis de aguas, lixiviados de rocas y minerales, alimentos etc.

A



B



Figura 21. *A* y *B* Equipo de ICP-MS. Gentileza Claudia E Cavarozzi. CIG-CONICET

La técnica ICP-MS combina la ionización del plasma de argón y las técnicas de espectrometría de masas. Fernández-Ruiz (144) define un plasma como cualquier volumen de gas con parte de sus moléculas o átomos ionizados y coexistiendo a alta temperatura (8000°C) en una sopa de iones, electrones, átomos neutros o átomos excitados. Se suele decir que hay cuatro estados de la materia: líquido, sólido, gaseoso y plasma. La generación del plasma se consigue sometiendo un flujo de gas, que se conoce como gas plasmógeno (argón usualmente), a la acción de un campo magnético oscilante, inducido por una corriente que oscila a alta frecuencia. En el proceso de generación del plasma, los iones de argón (Ar) y los electrones libres presentes son acelerados siguiendo trayectorias anulares, debido a la alternancia del campo magnético presente generado por el generador de radiofrecuencia.

Los procesos de recombinación radiante que se producen explican que el plasma aparente ser una llama cuando en realidad no lo es.

La mayoría de los análisis de ICP-MS se realizan sobre muestras líquidas, siendo necesaria una corriente de gas para que la muestra alcance el plasma. La forma más fácil de que la muestra líquida sea introducida en la corriente de gas es en forma de aerosol originado en un nebulizador. Después del nebulizador existe una cámara de spray, cuya función es la de separar y desechar las gotas grandes de la solución que se hayan formado en el proceso de pulverización. La antorcha como sistema de confinamiento del plasma es otra de las partes fundamentales del equipo de ICP-MS.

La función del espectrómetro de masas cuadrupolar consiste en separar los iones en función de su relación carga masa. El detector más utilizado es el Channeltron electron multiplier (electrón multiplicador). El efecto es muy parecido al fotomultiplicador. Es un tubo de vidrio abierto con un cono en una terminación. Para la detección de iones positivos, el cono es sometido a un alto potencial negativo (aproximadamente -3kV).

El ICP-MS permite recoger las señales de todas las masas durante una serie de escaneos y examinar el espectro visualmente para determinar la presencia o no de un analito y para identificar las posibles fuentes de interferencias.

La cuantificación de un dato medido con el ICP-MS se alcanza a través de la comparación de las cuentas medidas de la muestra desconocida con aquellas de una sustancia que contiene una cantidad medida del elemento o isótopo de interés.

7. Espectroscopia foto electrónica de rayos - X (XPS)

La espectroscopia de electrones para el análisis químico proporciona información acerca de la composición atómica de la muestra, la estructura y el grado de oxidación de los elementos que forman los compuestos que están siendo examinados (Figura 22).

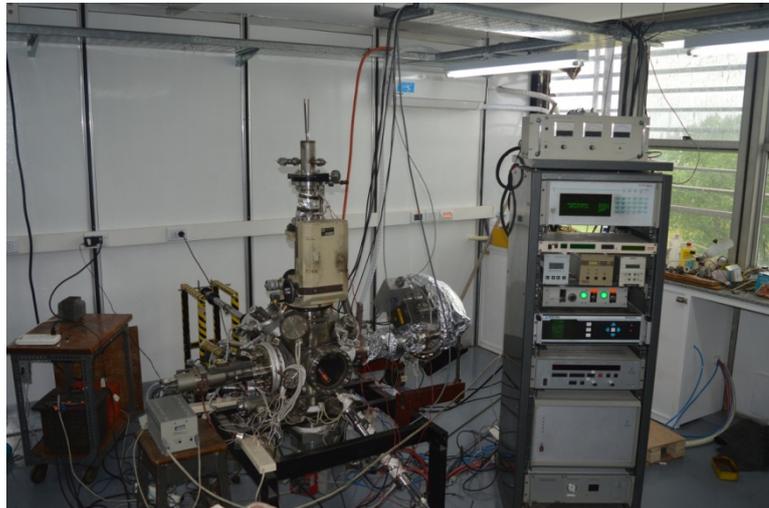


Figura 22. Equipo XPS- INIFTA. Foto de archivo

La técnica de XPS se basa en que la interacción de los electrones con la materia es muy fuerte y las energías de los electrones emitidos son relativamente bajas por lo que son detenidos muy fácilmente. Sólo los electrones emitidos o que han interactuado en la superficie de la muestra pueden alcanzar el detector para ser analizados. Por esto la técnica XPS es superficial (informa sobre tres o cuatro capas de átomos en la superficie de la muestra). Un espectro XPS de amplio barrido y baja resolución sirve como base para la determinación de la composición elemental de la muestra. Todos los elementos excepto el hidrógeno y el helio emiten electrones

internos que tienen energías de enlace características. Normalmente un espectro general abarca un intervalo de energías cinéticas desde 250 a 1500 eV, que corresponde a energía de enlace entre 0 y 1250 eV. Cada elemento de la tabla periódica tiene uno o más niveles de energía que dan lugar a la aparición de picos en esta región. En muchos casos los picos están bien resueltos, y permiten identificaciones inequívocas, siempre y cuando el elemento esté presente en concentraciones superiores a 0,1 % (142).

8. Superficie específica

En la mayoría de los sólidos, la superficie no es totalmente plana (Figura 23). Las técnicas de análisis de superficie permiten la caracterización física de la superficie de un sólido. La superficie real de una estructura sólida está determinada por distintos factores como el tamaño de partícula (es decir su grado de división), la forma de la partícula y la porosidad (145).

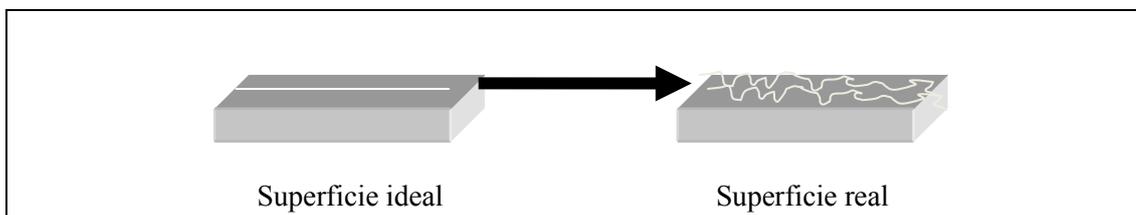


Figura 23. Superficie plana ideal y real. Fuente propia

La superficie específica de un sólido se define como la relación entre su superficie y su volumen (o su masa). Este parámetro es importante cuando se quiere tener un índice para medir el potencial de interacción de este sólido con su entorno. Mientras mayor es la superficie específica mayor es la interacción.

A medida que el tamaño de partícula disminuye, el área superficial por unidad de masas aumenta. La adición de porosidad, especialmente si se trata de poros muy pequeños hace que la superficie aumente mucho más. Dado que el área superficial corresponde a la rugosidad del exterior de la partícula y a su interior poroso, la técnica más usada es la adsorción de gases. La tendencia de todas las superficies

sólidas para atraer moléculas de gas circundantes da lugar al proceso denominado adsorción de gas. La monitorización de este proceso provee una información muy útil sobre las características texturales de materiales sólidos.

La superficie específica aumenta cuanto más se aleja la morfología de la partícula de la equidimensionalidad: es mínima en la esfera y máxima en morfologías fibrosas y laminares. Y aumenta al disminuir el tamaño de la partícula.

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la porosidad se clasifica en macroporos ($\phi > 50$ nm), mesoporos ($2\text{nm} < \phi < 50$ nm) y microporos ($\phi < 2$ nm) (146).

Existen distintos métodos para cuantificar la porosidad, considerada ésta como el volumen poroso total ocupado por los espacios vacíos, o bien, fracciones de dicho volumen en relación con determinados elementos del sistema poroso (tamaño, forma, grado de comunicación de los vacíos) (147).

Una técnica utilizada para la determinación de la porosidad de una superficie, consiste en la adsorción física de gases y vapores. Los gases (adsorbatos) presentan una tendencia a concentrarse en las proximidades de la interface de un sólido (adsorbente). La cantidad de gas adsorbida depende de la presión, la temperatura y la energía de interacción adsorbente-adsorbato) y determina la forma de la isoterma de adsorción. Una isoterma de adsorción es la relación general entre la cantidad de gas adsorbido por un sólido, a temperatura constante, como función de la presión del gas. Hay 5 tipos de isotermas I-V: Isotherma I de Langmuir (sólidos con estructura porosa muy fina), Isotherma II Sigmoide (adsorción en multicapas en sólidos con microporos), Isotherma III de Flory- Huggings (sistemas con fuerzas pequeñas de adsorción en la monocapa), Isotherma IV (sólidos hidrófilos porosos “hinchables”), Isotherma V Brunauer Emmet y Teller (semejante a la tipo III, multicapas), Isotherma VI (sólidos con superficies muy homogéneas y varios tamaños de poro muy definidos) (146, 148). La diferencia en el mecanismo de adsorción y desorción da lugar a la histéresis.

En el caso de que el poro sea suficientemente ancho las moléculas se irán adsorbiendo formando una monocapa a una distancia determinada de la superficie (distancia de adsorción). Posteriormente, y a medida que aumenta la cantidad adsorbida, el adsorbato se ordena en capas sucesivas (llenado en multicapas). Este proceso se conoce como condensación capilar, que es característica de la adsorción en mesoporos. Cuando el tamaño del poro disminuye, la interacción con las paredes del poro es mayor y por tanto, mejor el confinamiento de la molécula adsorbida (149).

La forma de las isotermas nos puede dar alguna indicación sobre el tipo de porosidad del sólido. Se han desarrollado numerosos métodos con el objetivo de estimar algunas de las propiedades relacionadas con la porosidad de los sólidos tales como la superficie específica, el volumen de poros, la distribución del tamaño de poros. Entre todos ellos el método BET desarrollado por Brunauer, Emmet y Teller para la obtención de la superficie específica o simplemente área BET es el que se utiliza más ampliamente. La idea central del método BET consiste en que conocida la cantidad gas adsorbido necesario para formar una monocapa (y por lo tanto el número de moléculas que forman la monocapa) y el área que ocupa una de estas moléculas adsorbidas es posible estimar el área del sólido (146, 147, 150).

V. ANÁLISIS PRELIMINAR DEL ESMALTE TRATADO CON SÉSAMO

Finalizados los ensayos de dureza superficial realizados durante la pasantía y previo al diseño final del presente trabajo, surgió el interés de estudiar una muestra tratada con sésamo germinado ciclado en saliva artificial al MEB- EDS con el propósito de indagar sobre el efecto de la solución de sésamo sobre el esmalte erosionado.

Los hallazgos derivados de este análisis plantearon la necesidad de incluir otros instrumentos para profundizar el estudio de la superficie del esmalte y la naturaleza del material depositado.

Se utilizó el microscopio electrónico ESEM-EDAX FEI QUANTA 200 del LIMF- UNLP. Las condiciones de observación fueron a bajo vacío con presión variable de 20 kV y un conteo de electrones de alrededor de 60 segundos (Lsec). Se utilizó la función de escaneo lineal (Line- Scan) y se obtuvieron los espectros correspondientes.

Se observó el depósito de una capa delgada de material sobre la superficie externa del esmalte erosionado cuya extensión osciló entre los 4 y 7 μm (Figura 24). El análisis EDS lineal permitió detectar elementos como calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg) y azufre (S). El espectro del Ca y del P en la zona superficial del esmalte, mostró un descenso que estaría relacionado con la pérdida mineral del esmalte producido por la erosión y luego, en relación con el material depositado, se observaron picos, que fueron más acentuados en el azufre y el magnesio, a la vez que se notó una recuperación en el calcio y el fósforo (Figura 25).

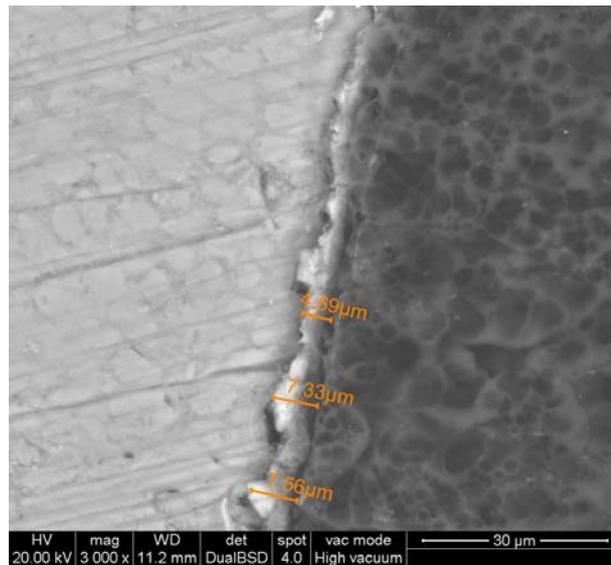


Figura 24. Micrografía del esmalte tratado con sésamo ciclado. Corte longitudinal. A la izquierda, esmalte. Medidas del material depositado en la superficie. MEB x 3000

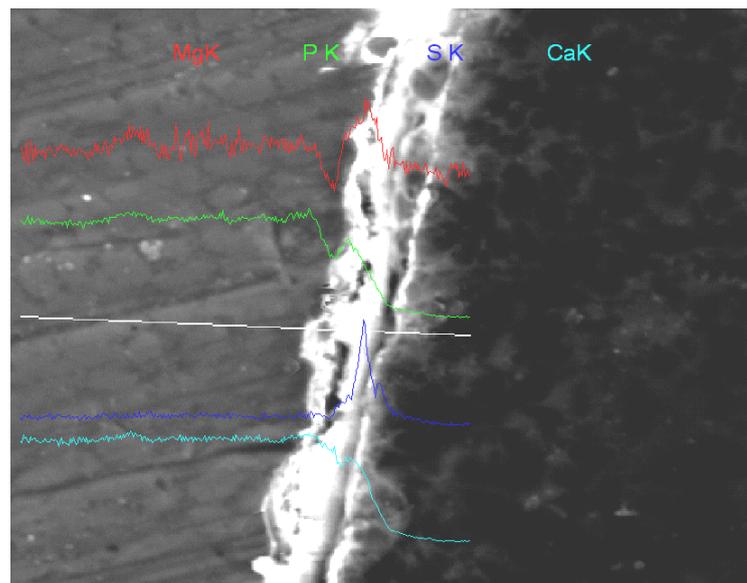


Figura 25. EDS del esmalte tratado con sésamo ciclado. Representación de espectros en la muestra.

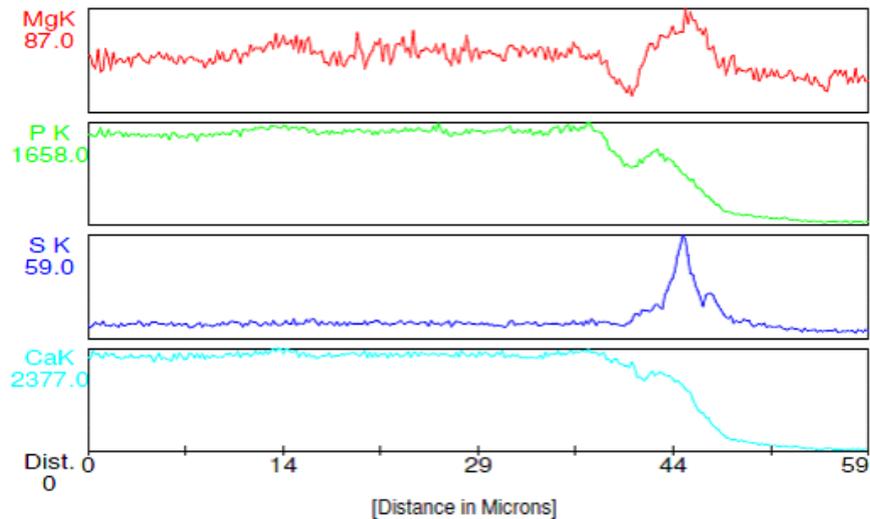


Figura 25 (continuación). EDS Line Scan. Espectros del magnesio (Mg); fósforo (P); azufre (S); calcio (Ca). De izquierda a derecha esmalte sano (0 a 40 micrones), esmalte desmineralizado tratado con sésamo (40 a 46 micrones) y resina (46 a 59 micrones).

Considerando estos resultados se decidió estudiar la superficie del esmalte tratado con la solución de sésamo mediante técnicas de caracterización de superficies sólidas.

El propósito de nuestro trabajo consistió en describir el efecto producido por los bioelementos de una solución de sésamo germinado, sobre los aspectos mecánico, morfológico, topográfico y químico, de lesiones de erosión del esmalte dental. Se consideraron dos regímenes de exposición. Un régimen cíclico, en el cual, la inmersión de las muestras en solución de sésamo se alternó con la conservación en saliva artificial. Y un régimen estático sin intervención de la saliva artificial.

Si bien la composición de las semillas de sésamo y sus potenciales beneficios sobre la salud son de actual conocimiento, resultó conveniente determinar además, las características químicas del sésamo mediante el análisis elemental y la acidez de la solución obtenida.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL

Generar un aporte al conocimiento de la prevención de lesiones del esmalte en dientes humanos permanentes, a partir del estudio de los fenómenos de desmineralización y remineralización de la microestructura adamantina en el campo de la histología dental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comprobar cuali y cuantitativamente la presencia de bioelementos contenidos en la semilla y en la solución de sésamo.
- Reconocer la acidez de la solución de sésamo y de la bebida gaseosa.
- Definir las condiciones de producción de lesiones de erosión del esmalte dental.
- Explorar las variaciones producidas en el contenido mineral de las lesiones de erosión del esmalte dental expuesto a una solución de sésamo con régimen cíclico mediante el registro de microdureza.
- Observar la modificación topográfica, morfológica y elemental, producida en la microestructura de las lesiones de erosión del esmalte dental expuesto a una solución de sésamo con régimen cíclico.
- Investigar el efecto producido por una solución de sésamo en condiciones estáticas sobre lesiones de erosión del esmalte dental.
- Establecer las variaciones en el contenido mineral en la capa más superficial de las lesiones de erosión del esmalte dental, expuestas a una solución de sésamo en condiciones estáticas, mediante el registro de microdureza.

- Observar las características morfológicas y topográficas de las lesiones de erosión expuestas a una solución de sésamo en condiciones estáticas, mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y fuerza atómica (AFM).
- Analizar cuali y cuantitativamente la variación de los bioelementos calcio, fósforo y nitrógeno de las lesiones de erosión, expuestas a una solución de sésamo en condiciones estáticas, mediante espectrometría de energía dispersa (EDS) y espectrometría de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS).
- Interpretar las variaciones de la estructura química de las lesiones de erosión expuestas a una solución de sésamo en condiciones estáticas, mediante difracción de rayos X y espectrometría infrarroja (FTIR).
- Determinar las variaciones de porosidad de las lesiones de erosión expuestas a una solución de sésamo en condiciones estáticas, mediante el análisis de superficie específica.
- Comparar el efecto del sésamo con la saliva artificial en las distintas condiciones de exposición.

HIPÓTESIS

Las **hipótesis** planteadas fueron las siguientes:

- La semilla de sésamo contiene una relación Calcio/Fósforo semejante a la hidroxiapatita.
- La solución de semillas de sésamo presenta un pH semejante al medio bucal.
- Existe variación en el contenido mineral de las lesiones de erosión del esmalte dental expuesto a una solución de sésamo en un medio de saliva artificial.
- Las lesiones de erosión del esmalte dental expuestas a una solución de sésamo presentan igual o mayor dureza que las expuestas a la saliva artificial.
- Los bioelementos calcio, fósforo y nitrógeno contenidos en la semilla de sésamo producen modificaciones de las características morfológicas, topográficas, químicas, cristalinas y de porosidad, en la microestructura de las lesiones de erosión del esmalte dental.
- El depósito de bioelementos sobre las lesiones de erosión del esmalte dental por efecto de la semilla de sésamo es igual o mayor que el producido por la saliva artificial.

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODO

I. VARIABLES

La investigación fue de tipo explicativa, la **variable independiente**, la semilla de sésamo y la **variable dependiente**, la microestructura de lesiones superficiales del esmalte dental.

Las categorías de la **variable independiente** fueron los bioelementos Calcio, Fósforo y Nitrógeno contenidos en la semilla de sésamo y la acidez de la solución. El nivel de medición fue nominal y de razón para la categoría “bioelementos” e intervalar para la “acidez”.

Las dimensiones de la **variable dependiente** fueron la microdureza, la morfología, la topografía, el análisis químico elemental, la porosidad superficial, la estructura cristalina y el análisis de grupos funcionales. El nivel de medición fue de razón para los indicadores microdureza, análisis químico elemental, topografía y porosidad superficial; en cambio, para el indicador morfología de la superficie adamantina, estructura cristalina del esmalte y el análisis de grupos funcionales, fue nominal.

La investigación comprende dos regímenes de exposición del esmalte erosionado a la solución de sésamo: cíclico y estático. El régimen cíclico consistió en realizar el ciclado de la muestra en la solución de sésamo activado y la saliva artificial. La muestra se sumergió en la solución de sésamo 4 veces por día durante 5 días y se conservó en saliva artificial entre ciclos. En el régimen estático (condiciones estáticas de exposición), las muestras se sumergieron 24 h en la solución de sésamo y no se cicló en saliva artificial.

Previo a la aplicación del tratamiento, se definieron las condiciones para la producción de la lesión de erosión del esmalte dental.

Unidad de análisis

Estuvo constituida por la *microestructura de lesiones superficiales del esmalte dental (erosión)*. Se consideraron lesiones de erosión provocadas artificialmente en

la superficie del esmalte dental de las caras vestibular de piezas unirradiculares y palatina/lingual de multirradiculares. La lesión superficial se localizó completamente en el esmalte radial (cuyo espesor oscila entre 200 y 260 μm aproximadamente. Para producir la lesión de erosión se empleó una bebida gaseosa.

Definición conceptual y operacional de las variables

Variable independiente

La variable independiente “**semilla de sésamo**” estuvo representada por la SOLUCIÓN DE SÉSAMO que consistió en una solución concentrada extraída de semillas de sésamo activadas y procesadas con agua destilada. En la solución obtenida de la semilla de sésamo se realizaron las siguientes determinaciones:

A. La composición elemental: Se identificó la presencia de los bioelementos calcio y fósforo en la semilla de sésamo mediante MEB (PHILLIPS-SEM 505 con detector EDS) y en la solución de sésamo preparada con distintos medios (agua destilada y solución fisiológica) mediante ICP. La Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP- MS) es una técnica de análisis inorgánico que es capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica en un rango dinámico lineal de 8 órdenes de magnitud (ng/l-mg/l). Es ideal para el análisis de elementos traza y para la determinación cualitativa y semicuantitativa simultánea de calcio y fósforo. Se utilizó un equipo ICP-MS Perkin Elmer, modelo Nexlon 300X y las curvas de calibrado se realizaron mediante una solución patrón certificada por Perkin Elmer.

El microscopio utilizado pertenece al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas (CINDECA- CONICET- UNLP) y el equipo de ICP al Centro de Investigaciones Geológicas (CIG-CONICET-UNLP)

B. La acidez de la solución: Se obtuvo mediante de la determinación del pH. Se utilizaron tiras reactivas para pH de escala 1-14.

Variable dependiente

La variable dependiente **microestructura de lesiones superficiales del esmalte dental** estuvo representada por lesiones de EROSIÓN y comprendió las siguientes dimensiones:

A. Contenido mineral del esmalte: Se realizó la determinación indirecta de la variación del contenido mineral mediante ensayos de microdureza utilizando un microdurómetro con penetradores Vickers FUTURE TECH FM-700 (capacidad de carga de 1-2000 gF) del Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física (LIMF) Facultad de Ingeniería Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Esta técnica exige un espesor mínimo de tejido de 8 μm .

Además se estudiaron las variaciones de dureza de la capa más superficial utilizando un TRIBOINDENTER-MULTIRANGE NANO PROBE (MRNP) HYSITRON INC. del Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA) Facultad de Ingeniería Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP). Estos ensayos se programaron para estudiar una superficie de penetración de 2 μm . De acuerdo a Schlueter (141) esta técnica resulta más sensitiva a los cambios en la capa más superficial del esmalte erosionado.

B. Morfología de la superficie adamantina: Para la caracterización de la morfología de los prismas del esmalte al MEB determinando la presencia o ausencia de los patrones I, II y III de grabado del esmalte.

Se utilizó el Microscopio Electrónico de Barrido ESEM-EDAX FEI QUANTA 200 (LIMF- UNLP) para determinar las características de la lesión de erosión creada y el PHILLIPS-SEM 505 con detector EDS (CINDECA-CONICET- UNLP) para los regímenes de aplicación del sésamo.

C. Topografía superficial: El análisis de rugosidad superficial en distintas áreas y a distintos aumentos de la superficie del esmalte, mediante Microscopía de Fuerza Atómica (SPM-AFM VEECO NANOSCOPE V-UNIDAD DE CONTROL)

perteneciente al Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA-CONICET-UNLP).

D. *Análisis elemental:* La variación relativa porcentual (peso%) de calcio (Ca), fósforo (P) y nitrógeno (N) en el esmalte superficial se registró con espectrometría de energía dispersiva EDS al MEB (PHILIPS-SEM 505-EDS) y con Espectroscopia de Fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS). El EDS permite obtener información de un volumen de muestra de alrededor de 1 a 5 μm^3 .

El XPS consiste en una espectroscopia semicuantitativa y de baja resolución espacial que se utiliza para estimar la estequiometría (con un error del 10% aproximadamente), el estado químico y la estructura electrónica de los elementos que existen en los primeros 10 nm de una superficie. Permite la identificación de todos los elementos presentes (excepto H, He) en concentraciones mayores al 0,1%.

El MEB pertenece al CINDECA- CONICET- UNLP y el equipo XPS al Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA-CONICET-UNLP).

E. *Estructura química del esmalte.* Se caracterizó la estructura cristalina de la hidroxiapatita de la superficie adamantina mediante el estudio de difracción de rayos X y el análisis por espectroscopia FTIR de grupos funcionales. Esta técnica proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias inorgánicas y orgánicas, por lo cual es posible realizar una identificación de los materiales. Permite la evaluación de grupos funcionales tales como CO_3^{2-} , PO_4^{3-} .

Se utilizó un difractómetro Philips usando una radiación $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), con una velocidad de $0,02^\circ \text{ min}^{-1}$ y un tiempo de conteo de 2 s por paso. Los estudios por espectroscopia infrarroja se realizaron por la técnica DRIFTS (reflectancia difusa) en un Espectrómetro Infrarrojo por Transformada de Fourier, Bruker Vertex 70, con una resolución de 4cm^{-1} . Ambos instrumentos pertenecen al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas (CINDECA- CONICET- UNLP).

F. *Análisis de porosidad:* La superficie real del esmalte y sus variaciones de porosidad se determinaron mediante la técnica de adsorción de gases y el cálculo de superficie específica.

Se realizaron ensayos que utilizan la teoría B.E.T. (Brunauer, Emmet y Teller) y de los mismos se obtuvieron datos de superficies específicas del esmalte y la distribución de tamaños de poros del mismo. Las áreas BET se midieron por adsorción de N₂ a la temperatura del nitrógeno líquido (77 K) en un sortómetro Micromeritics Accusorb 2100 D (CINDECA-CONICET-UNLP).

II. POBLACIÓN Y MUESTRA

La población estuvo conformada por coronas de piezas dentarias humanas permanentes sanas, pertenecientes al grupo dentario anterior o posterior, procedentes del archivo de la Asignatura Histología y Embriología de la Facultad de Odontología de la UNLP, obtenidas con el debido consentimiento del paciente. Éstas fueron conservadas en seco previa descontaminación. La muestra fue por conveniencia (Figura 26) y el tamaño fue de 50 coronas dentarias, de las cuales se obtuvieron secciones de esmalte que se dispusieron en distintos grupos según los métodos de análisis considerados.



Figura 26. Una muestra de los dientes utilizados. En algunos se evidencia la presencia de cálculo radicular.

1. Criterios de inclusión

Se incluyeron coronas dentarias permanentes, con esmalte intacto en las caras libres; sin caries ni mancha blanca; sin restauraciones plásticas o rígidas en esas superficies; con o sin desgaste en borde incisal o cuspeído siempre que no comprometiera la totalidad del tercio oclusal.

2. Criterios de exclusión

- No se consideraron coronas dentarias con hipoplasia del esmalte, amelogénesis imperfecta, con lesiones cervicales de erosión o adfracción.

- No se tomaron muestras de la cara palatina de dientes anteriores superiores, pues el espesor del esmalte radial es menor y puede estar ausente. Con igual criterio no se consideró el esmalte del tercio cervical.

- No se incluyeron piezas dentarias temporarias pues frecuentemente presentan esmalte aprismático en las caras libres.

3. Variables no relevantes

No fue relevante el grupo dentario al que pertenece la pieza, pudiendo ser anterior y posterior, superior e inferior debido a que todas ellas, en las superficies libres, presentan semejante organización en la microestructura (esmalte radial).

III. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño longitudinal **experimental in vitro** sobre un modelo biológico. Se consideró un grupo experimental sésamo y uno control, saliva artificial (Cuadro 2 A). Para el control de variables intervinientes, se realizaron medidas repetidas y/o se formaron grupos emparejados constituidos por secciones de una misma pieza dentaria (Cuadro 2 B).

La primera etapa de la investigación, consistió en determinar las condiciones de producción de la lesión de erosión del esmalte dental. Para ello se utilizaron ensayos

de microdureza Vickers en muestras apareadas (secciones de esmalte de una misma corona), siendo un grupo control sano y un grupo experimental. Los resultados obtenidos se compararon con estudios previos para definir el tiempo de exposición. Una muestra de cada grupo fue observada y analizada mediante MEB-EDS para determinar la morfología y la composición química.

En la segunda etapa, sobre el esmalte erosionado, se aplicó un tratamiento con sésamo ciclado en saliva artificial durante 5 días. Posteriormente se diseñó una tercera etapa, para conocer la potencialidad del sésamo sin intervención de la saliva artificial, exponiendo el esmalte erosionado durante un tiempo de 24 h en condiciones estáticas.

Cuadro 2 A. Modelo experimental. Grupos independientes

	Registro de la variable dependiente	
Grupos	EXPERIMENTAL Sésamo	CONTROL Saliva artificial

Cuadro 2 B. Modelo experimental. Grupos con medidas repetidas

		Registro de la variable dependiente		
Grupos	EXPERIMENTAL Sésamo	Esmalte sano (antes)	Esmalte con erosión (después de desmineralización)	Esmalte tratado (después de la solución)
	CONTROL Saliva artificial	Esmalte sano (antes)	Esmalte con erosión (después de desmineralización)	Esmalte tratado (después de la solución)

Además, para profundizar el conocimiento del efecto del sésamo, se consideró un modelo **pre-experimental** con un único grupo (sésamo) y se realizaron registros antes de crear la lesión superficial de erosión (esmalte sano), después de la erosión (esmalte desmineralizado) y después del tratamiento (Cuadro 3). Se utilizó para la descripción de la estructura química, grupos funcionales y porosidad en el régimen en condiciones estáticas (24 h).

Cuadro 3. Modelo pre-experimental

		Registro de la variable dependiente		
Grupo experimental	SÉSAMO	Esmalte sano (antes)	Esmalte con erosión (después de desmineralización)	Esmalte tratado (después de la solución)

Para el estudio de los bioelementos contenidos en la semilla de sésamo y la acidez de la solución y la bebida el modelo fue descriptivo.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el software Origin Pro 8 (OriginLab). Se utilizó test ANOVA con comparaciones múltiples Turkey. El error α aceptado fue menor a 0,05.

La caracterización de la superficie del esmalte mediante técnicas de mayor complejidad (XPS, AFM, DRX, FTIR, superficie específica) fueron realizados como estudios complementarios de apoyo y/o confirmación de los datos registrados mediante otros ensayos, para lo cual, se destinó una muestra seleccionada al azar para cada método. La combinación de distintas técnicas de estudio de superficies sólidas permitió integrar la información obtenida de los niveles superficial y subsuperficial.

IV. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para el estudio de la composición elemental de la solución de sésamo mediante ICP se prepararon las siguientes muestras: semillas de sésamo seco, sésamo germinado, solución de sésamo preparada con agua destilada y solución de sésamo preparada con solución fisiológica. Las muestras fueron secadas en estufa, luego se disolvieron en una mezcla ácida de 3 ml de HNO_3 y 3 ml de HClO_4 y finalmente se llevaron a solución acuosa de 100 ml. Además se metalizaron semillas secas para su análisis al MEB-EDS.

En la preparación de las muestras de esmalte, se separó la porción radicular de la coronaria con piedra de diamante y alta velocidad con refrigeración acuosa (Figura

27). Antes del experimento, se realizó la limpieza del esmalte con instrumental rotatorio de baja velocidad, brochita y pasta de piedra pómez. Se lavaron con agua a presión y se hidrataron primero en agua destilada durante 1 mes y en saliva artificial hasta el momento de su uso. Previo a disponer su uso, se obtuvieron secciones de esmalte de las caras libres, mediante instrumental rotatorio de alta velocidad y piedra de diamante cilíndrica delgada, bajo refrigeración acuosa. La porción correspondiente a dentina y cámara pulpar se cubrió con un material impermeable.



Figura 27. Coronas dentarias limpias

Cada ensayo requirió condiciones particulares de preparación de las muestras y un diseño experimental acorde, debido a las características de los instrumentos utilizados. A continuación se detalla su preparación de acuerdo a la técnica considerada.

A. Preparación de las muestras para MICRODUREZA.

Para el registro de microdureza, la superficie a ensayar debe ser plana y con pulido a “espejo”.

Para determinar las condiciones de erosión del esmalte se utilizaron 8 secciones de esmalte sano, de las cuales 4 de ellas se expusieron a la bebida y 4 permanecieron sanas. Se trabajó con grupos apareados, tal que la muestra sana se correspondía con

la tratada. Después del tratamiento las coronas fueron incluidas en polímero, desgastadas con lijas de grano 600-1000-1500 y 2000, pulidas con paño y pasta de brillo. Se lavaron con alcohol, ultrasonido 10 minutos y se secaron con calor seco.

Para la evaluación de las variables del esmalte erosionado tratado con régimen cíclico (sésamo y saliva 5 días), se destinaron 36 muestras distribuidas en 3 grupos experimentales: agua (A), saliva (S) y sésamo (SE) de manera tal que, cada grupo contenía una muestra tratamiento y su respectiva mitad sana (AS, SS y SES). Después del tratamiento se procedió a la inclusión, desgaste y pulido tal como se explicó en el párrafo anterior.

Para las condiciones estáticas de exposición (sésamo 24 h), 21 secciones de esmalte de lascaras libres se incluyeron en polímero, se desgastaron con lijas de grano 1000- 1500 y 2000, se pulieron con paño y pasta de brillo. Luego se lavaron con alcohol, ultrasonido 10 minutos y se secaron. Se realizaron ensayos de microdureza sobre el esmalte sano. Se descartaron aquellas muestras cuyos valores de dureza se desviaban más de 1 GPa. Del total, 17 muestras, fueron desmineralizadas y nuevamente ensayadas. Finalmente se distribuyeron en 2 grupos, sésamo y saliva artificial, y se realizaron registros después del tratamiento.

B. Preparación de las muestras para MEB- EDS.

La técnica para MEB requiere metalizado de las muestras por lo que no resulta viable medir antes, después de la erosión y después del tratamiento en el mismo diente. Por lo tanto, se trabajó con secciones de una corona. Se realizaron conteos para EDS en 3 zonas de cada muestra.

Para caracterizar la superficie del esmalte tratado con régimen cíclico, se prepararon 2 secciones de esmalte de una misma corona sin incluir en resina, y se aplicó en una el tratamiento con saliva y en la otra el sésamo ciclado 5 días. Se observaron al MEB y se analizaron con EDS.

Además, se destinaron 26 secciones de esmalte para analizar la superficie libre, sin desgaste ni inclusión en resina aplicando el tratamiento con sésamo 24 h. Se distribuyeron en mitades, una porción quedó sólo desmineralizada y la otra se expuso

al tratamiento, quedando constituidos los siguientes grupos de muestras: sanas (6 muestras), saliva desmineralizada (5 muestras), saliva 24 h (5 muestras), sésamo desmineralizada (5 muestras), sésamo 24 h (5 muestras). Las secciones se metalizaron para su observación al MEB y el análisis con EDS

C. Preparación de las muestras para XPS- AFM - ESPECTROSCOPIA FTIR- DIFRACCIÓN DE RAYOS X - SUPERFICIE ESPECÍFICA

Para ambos regímenes de exposición, se utilizaron secciones de esmalte de espesor delgado, con una fina capa de dentina subyacente. No se realizó degaste, ni inclusión en resina para no alterar la superficie a estudiar.

Para los regímenes cíclico y estático se utilizaron secciones de una misma pieza para el análisis XPS (2 muestras) y AFM (2 muestras); una de ellas recibió el tratamiento con sésamo 24 h y la otra saliva artificial. En cambio, para el análisis mediante DRX, FTIR y superficie específica sólo se consideró el régimen estático y trabajó con una muestra realizando registros en el esmalte sano, erosionado y tratado con sésamo.

V. PROCEDIMIENTO

A. Análisis del esmalte dental sano

Se analizó la superficie libre del esmalte dental para valorar las condiciones iniciales y las variaciones en la microestructura producidas por la desmineralización y el tratamiento con la solución de sésamo y la saliva artificial.

B. Desmineralización del esmalte: lesiones de erosión

Se utilizaron 100 ml de bebida gaseosa sabor cola, envasada en botella de vidrio, recién destapada. La lesión de erosión fue creada por inmersión durante 90 minutos. Las condiciones de producción de las lesiones de erosión del esmalte dental fueron determinadas considerando estudios previos (64, 81, 92, 151, 152).

Composición de la bebida

La bebida utilizada está compuesta por agua carbonatada, azúcar, Col E-150d, ACI E-338 y ARO, cafeína (153). El colorante E-150d es caramelo de sulfito amónico; el acidulante E-338 es ácido fosfórico, un ácido relativamente débil que mantiene el pH (grado de acidez) de la bebida y ARO es un aromatizante de vainilla (154).

De acuerdo con métodos electroquímicos de titulación ácido- base para la valoración de la acidez (H_3PO_4) de una bebida cola, se determinó el punto de equivalencia por el método potenciométrico usando un electrodo de vidrio (155) resultando una concentración de ácido fosfórico de 0,03% (156).

El grado de desmineralización del esmalte dependerá de la composición química inicial del esmalte. Sabel (63) demostró que la solubilidad del esmalte a los ácidos es función de la composición química y del grado de porosidad del tejido. También depende del tipo de ácido utilizado y el tiempo de exposición al mismo (56).

C. Tratamiento con la solución de sésamo

El régimen **cíclico** en saliva artificial, consistió en la inmersión del esmalte desmineralizado en una solución de sésamo, durante 3 minutos, 4 veces por día, 5 días, a temperatura ambiente. Las muestras se conservaron en saliva artificial entre los ciclos. Ambas soluciones fueron renovadas cada 48 h.

El **régimen en condiciones estáticas** consistió en la inmersión del esmalte desmineralizado durante 24 h en la solución de sésamo. Este tiempo de inmersión se estableció de acuerdo a trabajos realizados sobre la remineralización del esmalte erosionado con saliva artificial (157).

Preparación de la solución de sésamo

Se colocaron 100 g de semillas de sésamo integrales en un recipiente con agua y una gota de agua lavandina para lavarlas, agitando con una cuchara. Luego se escurrieron y se enjuagaron con agua corriente. Se sumergieron en agua destilada (3

veces su volumen) y se dejaron en remojo durante 6 horas. Luego se quitó el agua, se enjuagaron con agua corriente y se colocaron en recipiente seco, tapado en lugar templado, con poca luz durante 24- 48 h (dependiendo de la época del año). Este procedimiento tiene la finalidad de activar la semilla mejorando el aprovechamiento de sus nutrientes y minerales (158, 159). La aparición del brote inicial es indicador del cese en el tiempo de germinación (Figura 28). Después de ese lapso se procesaron hasta obtener una pasta agregando agua destilada (100 ml) (Figura 29).



Figura 28. Semillas de sésamo germinadas



Figura 29. Pasta obtenida del procesamiento de las semillas

Se pasó la pasta por una tela de seda comprimiendo hasta obtener una solución de aspecto lechoso, blanco marfil, espesa (Figura 30). La solución se conservó hasta 48 horas en la heladera.



Figura 30. Solución de semillas de sésamo

D. Tratamiento con la saliva artificial

Las muestras expuestas a la saliva artificial con régimen cíclico y estático constituyeron el grupo control. Se conservaron en saliva artificial por 5 días renovándose la solución cada 48 h o durante 24 h según el régimen. Se comparó el efecto del sésamo con la saliva artificial en las distintas condiciones de exposición.

Composición de la saliva artificial

Se utilizó el producto comercial Solución Oral NAF® que posee un pH neutro y la siguiente composición cada 100 ml:

Hidroxipropilmetilcelulosa 1g

Xilitol 3 g

Cloruro de sodio 0,1 g

Cloruro de potasio 0,1 g

Fluoruro de sodio 0,2 mg (0,9 ppm de ión flúor)

Cloruro de magnesio 5 mg

Cloruro de calcio 15 mg

Sulfato de potasio 40 mg

Bouquet de menta.

Nipagin sódico

Agua

VI. ASPECTOS METODOLÓGICOS DEL RÉGIMEN CICLÍCO

En esta parte del experimento, se utilizaron en total 39 secciones de esmalte. Para el registro de microdureza, 36 secciones se distribuyeron para formar los grupos experimentales apareados (Figura 31).



Figura 31. Muestras preparadas para dureza Vickers. De izquierda a derecha grupo agua, saliva artificial, sésamo ciclado, En cada grupo, las hileras de la izquierda corresponden a las mitades sanas.

Los ensayos se realizaron con un microdurómetro Future Tech FM-700 (LIMF). Se trabajó con una carga de 50 gf durante 10 segundos (tiempo de carga) según ASTM E 384-89. El registro se realizó en la zona media superficial de cada muestra. Se realizaron 5 improntas por muestra.

La dureza Vickers se calculó con la siguiente fórmula (160):

$$HV = 1854 (F/d^2)$$

F = es la carga en gramos; d = es la longitud de la diagonal de la impronta en micrómetros

Se determinó el porcentaje de pérdida mineral en cada grupo mediante la siguiente ecuación (161):

$$\% \Delta HV = 100 * (HV_i - HV_f) / HV_i$$

Donde **HV_i** es microdureza inicial esmalte sano y **HV_f** microdureza final después del tratamiento

Para investigar las características de la superficie de esmalte tratado con sésamo, se recurrió al análisis topográfico de la superficie del esmalte antes y después de la erosión y después del tratamiento. Para ello, dos secciones delgadas de la superficie libre del esmalte de una corona dentaria, sin incluir en resina, fueron tratadas, una con saliva y otra con sésamo ciclado. Las mediciones se realizaron antes (esmalte sano), después de la desmineralización y después del tratamiento.

De las mismas secciones se obtuvieron espectros de EDS para valorar cuali y cuantitativamente los elementos presentes en superficie. Las muestras se metalizaron con oro y se observaron mediante un MEB, con 25kV de presión a alto vacío y un conteo de electrones vivos de 30-40 s (CINDECA –CONICET- UNLP).

Además otra muestra de esmalte sin incluir en polímero, se dispuso para el estudio mediante XPS. Se obtuvieron espectros del esmalte sano, desmineralizado y tratado con sésamo ciclado.

Los espectros se tomaron excitando con radiación de 1486,6 eV (Al $K\alpha$, no monocromático), voltaje del ánodo 13 kV y una potencia de 200 W. Se utilizó un analizador de energías Hemisférico PHOIBOS 100 MCD, SPECS operando con una energía de paso de 40eV. La escala de energía se calibró con una muestra de Au-Cu: Au 4f $_{7/2}$: 84 eV y Cu 2p $_{3/2}$: 932.66 eV. Como referencia interna para corregir posibles efectos de carga se utilizó el C 1s (285,0 eV).

La cuantificación, en átomos por ciento, se realizó teniendo en cuenta las sensibilidades relativas y suponiendo que los elementos se encuentran distribuidos homogéneamente en el. Los espectros se tomaron excitando con radiación de 1486,6 eV (Al $K\alpha$, no monocromático), voltaje del ánodo 13 kV y una potencia de 200 W.

VII. ASPECTOS METODOLÓGICOS DEL RÉGIMEN EN CONDICIONES ESTÁTICAS

Para la evaluación del efecto del sésamo en condiciones estáticas se utilizaron en total 52 secciones de esmalte.

Los grupos experimentales para medir microdureza en la superficie libre de la erosión tratada con las soluciones, fueron saliva y sésamo; los registros se realizaron antes, después de la desmineralización y después del tratamiento. Las secciones de esmalte (21 muestras) fueron incluidas en polímero antes de comenzar los ensayos (Figura 32). Después de desgastadas y pulidas se montaron en la platina para los ensayos (Figura 33).

La microdureza superficial se registró con un equipo Triboindenter- Multirange Nano Probe (MRNP) Hysitron Inc. (INTEMA- UNMdP) (Figura 34). La carga aplicada fue de con una fuerza de 4000 μN . La función utilizada se muestra en las Figuras 35 y 36. Las improntas se efectuaron sobre el esmalte más externo (Figuras 37 y 38).



Figura 32. Muestras preparadas para microdureza

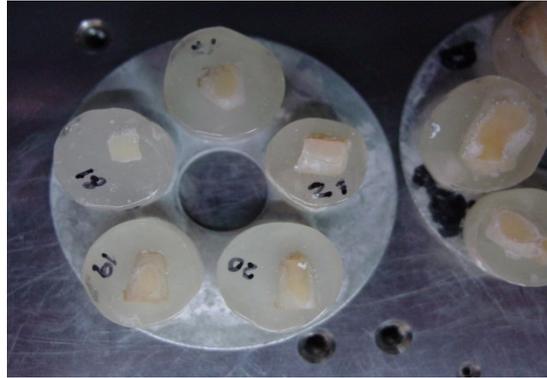


Figura 33. Muestras montadas en la platina



Figura 34. Muestras en el Triboindenter

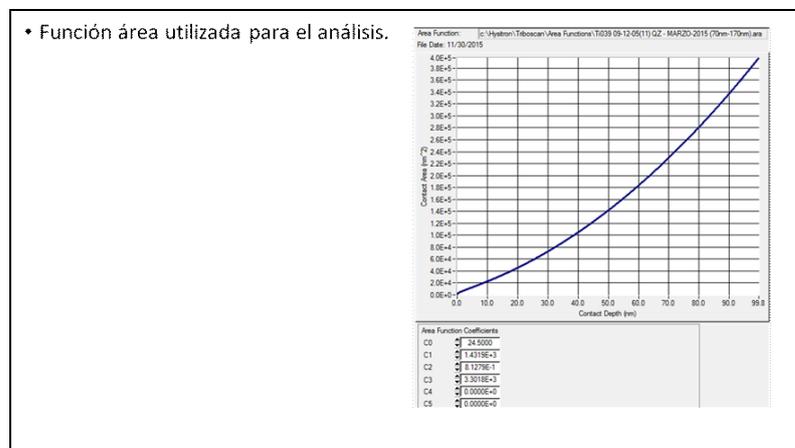


Figura 35. Función área para dureza superficial

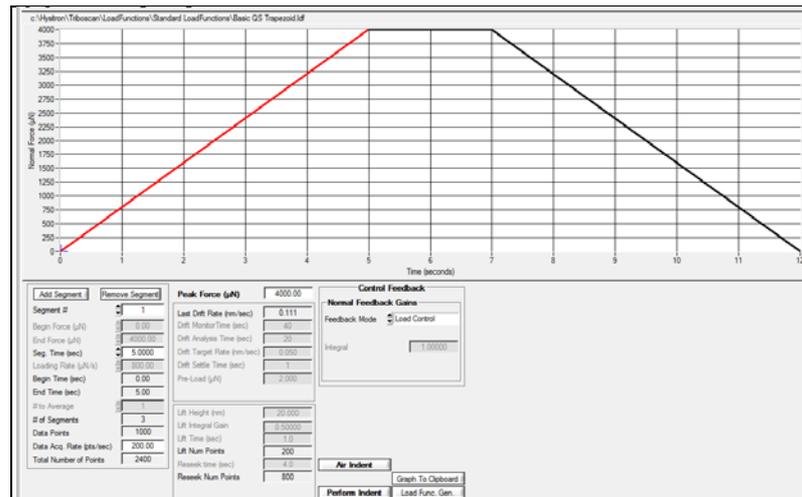
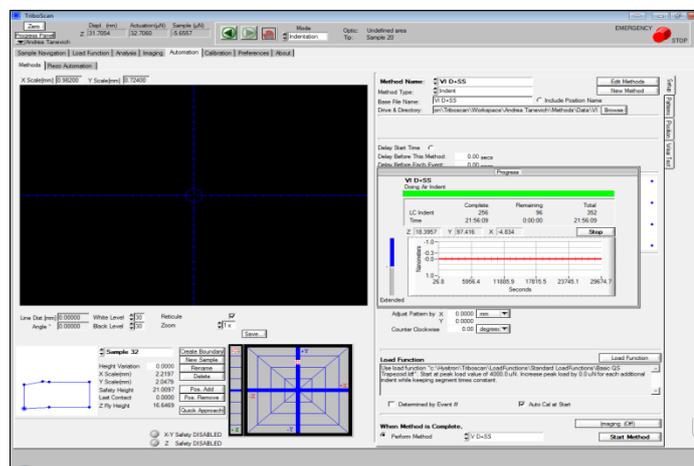


Figura 36. Función carga utilizada

A



B

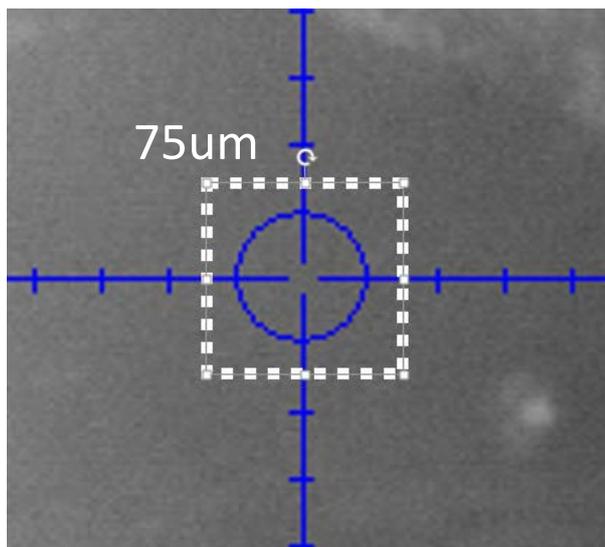
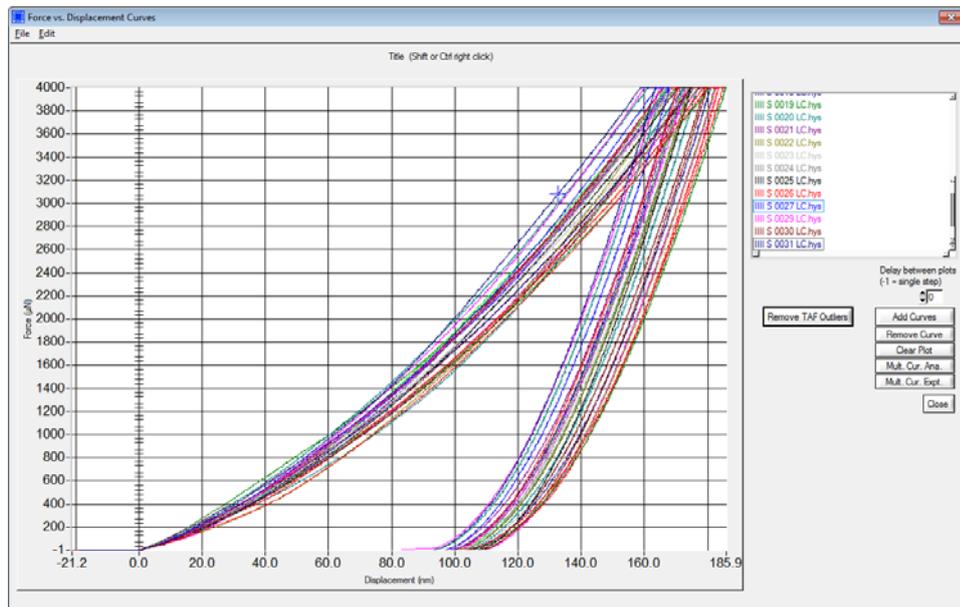


Figura 37. **A** Software Tribo Scan. **B** Zona de indentación

C



D

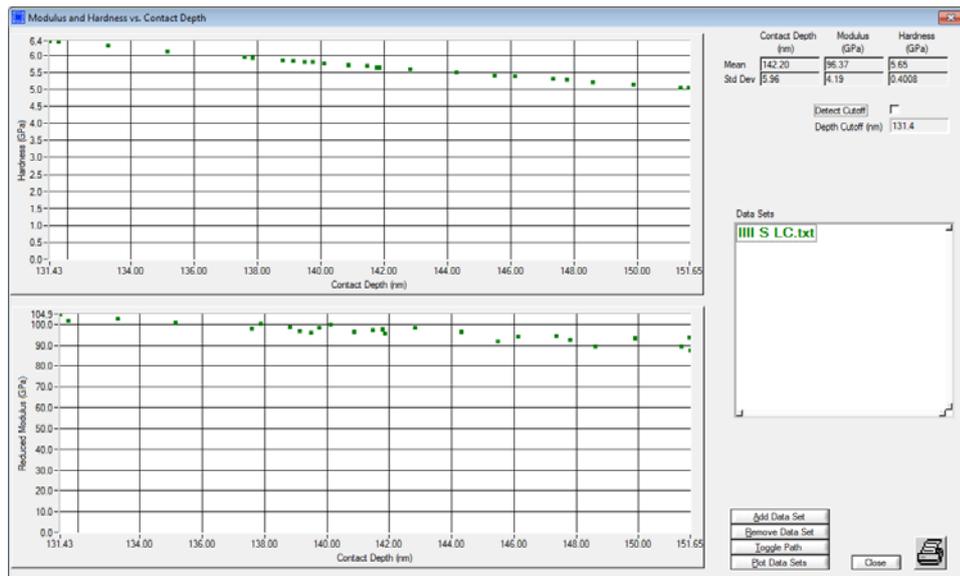


Figura 37 (continuación). **C** Curvas obtenidas de una muestra ensayada.
D Resultados del Triboindenter

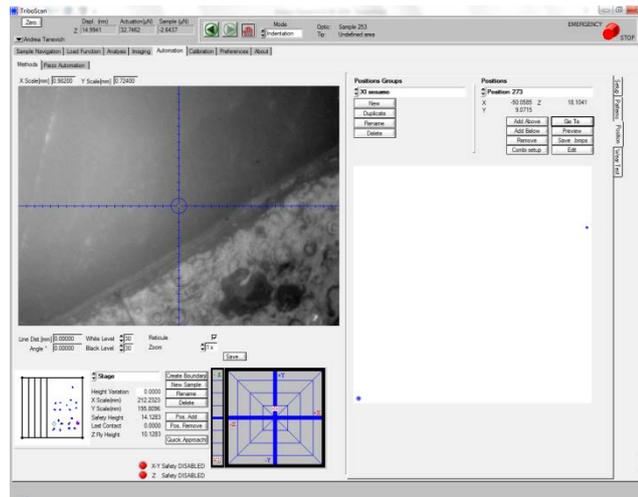


Figura 38. Zona de indentación en la superficie más externa

Los fragmentos de esmalte (n=26) destinados al estudio mediante MEB- EDS (CINDECA) no se incluyeron en resina ni fueron desgastados. Los grupos conformados para el análisis morfológico y químico fueron esmalte sano, desmineralizado, sésamo y saliva. La superficie de dentina se cubrió con esmalte de uñas. Se realizó metalizado con oro.

Dos secciones correspondientes a una misma corona dentaria sin incluir, fueron examinadas al AFM para estudiar la rugosidad, una fue tratada con sésamo 24 h y otra con saliva artificial 24 h. En cada muestra se realizaron registros en esmalte sano, desmineralizado y tratado.

Además otras 2 muestras apareadas de esmalte sin incluir en polímero, se dispusieron para el estudio mediante XPS. Se obtuvieron espectros del esmalte sano, desmineralizado y tratado con ambas soluciones.

Una muestra de esmalte sin incluir se destinó para el análisis de difracción de rayos X, espectroscopia infrarroja y de superficie específica. Se examinó el esmalte sano, desmineralizado y tratado con sésamo.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

I. ANÁLISIS DE LA SEMILLA DE SÉSAMO

Resultados para el objetivo: *Comprobar cuali y cuantitativamente la presencia de bioelementos contenidos en la semilla y en la solución de sésamo.*

Las semillas secas de sésamo fueron observadas al MEB y se registró la composición de elementos con sonda de EDS. Los espectros de energía dispersa r-X muestran la presencia de calcio, fósforo, magnesio, potasio, encontrándose ausente el sodio. La relación porcentual de los elementos de la cubierta (Figura 39) fue diferente de la del interior (Figura 40).

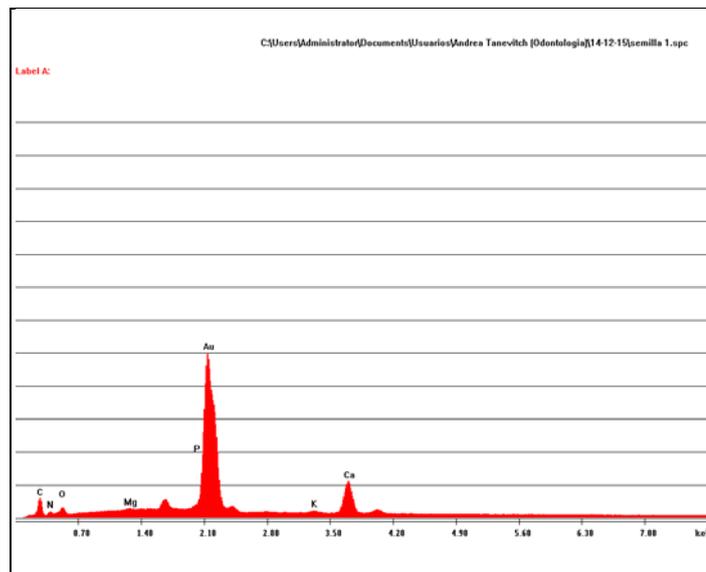


Figura 39. EDS de la semilla de sésamo en la cubierta

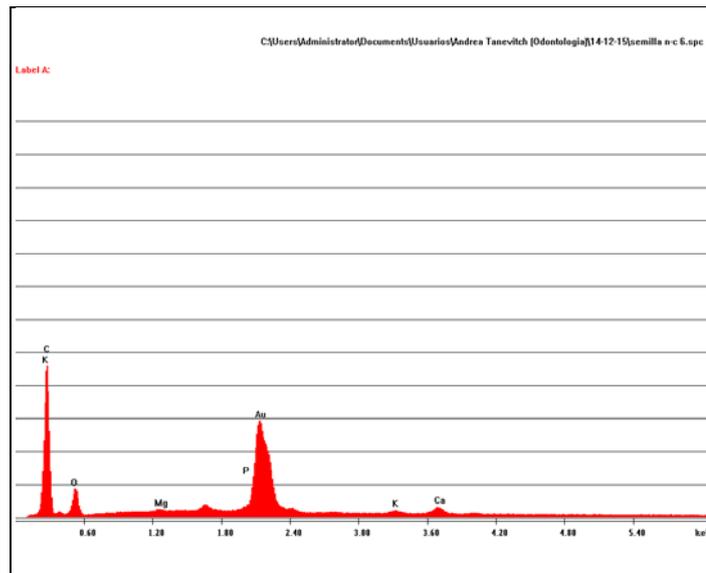


Figura 40. EDS de la semilla de sésamo en su interior

Se encontró diferente concentración (peso%) de Ca y P en la cubierta de la semilla y en su interior. En la cubierta, los valores promedio fueron Ca: $80,20 \pm 11,12$ siendo 85,89 el valor de la tendencia central y P: $15,95 \pm 9,10$, siendo la tendencia central 11,37 (Tabla 1). La relación Ca/P resultó $6,59 \pm 3,43$. En el interior de la semilla se encontró Ca: $42,56 \pm 1,85$; P: $46,07 \pm 3,18$ y la relación Ca/P: $0,92 \pm 0,10$ (Tabla 2). El magnesio se encontró en mayor proporción en el interior de la semilla que en la cubierta siendo su valor porcentual 11,36 y 3,93 respectivamente.

Tabla 1. Composición elemental de la semilla de sésamo en la cubierta. Valores expresados en peso%

	Ca	P	Ca/P	Mg
semilla 1	71	23,54	3,02	5,45
semilla 2	61,85	30,88	2,00	7,27
semilla 3	89	8,01	11,11	3,59
semilla 4	87,61	10,54	8,31	1,85
semilla 5	86,36	11,28	7,66	2,35
semilla c-8	85,43	11,47	7,45	3,1
MEDIANA	85,89	11,37	7,55	3,34
PROMEDIO	80,20	15,95	6,59	3,93
DE	11,12	9,10	3,43	2,05

La mayor concentración de calcio se localiza en la cubierta de la semilla.

Tabla 2. Composición elemental de la semilla de sésamo en el interior. Valores expresados en peso%

	Ca	P	Ca/P	Mg
semilla n-c 6	43,88	43,82	1,00	12,3
semilla n-7	41,25	48,32	0,85	10,43
PROMEDIO	42,56	46,07	0,92	11,36
DE	1,85	3,18	0,10	1,32

Al MEB la cubierta de la semilla muestra una cutícula delgada con forma de cotiledones (Figura 41). Por debajo pueden observarse células columnares correspondientes a la testa, dispuestas en empalizada, sin espacios intercelulares (Figura 42).

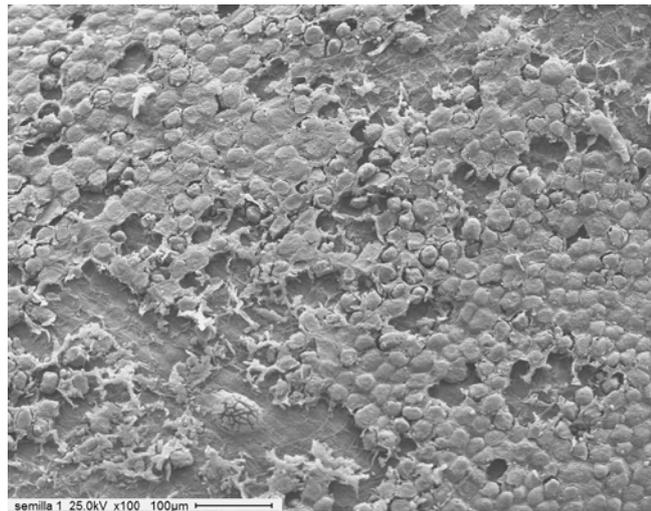


Figura 41. Micrografía de la superficie de la semilla de sésamo. Cubierta de la semilla de sésamo. MEB x 100

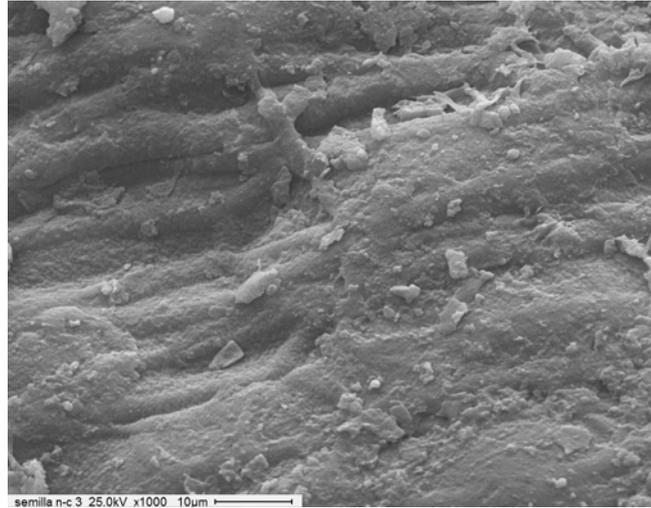


Figura 42. Micrografía de la superficie interna de la semilla de sésamo. Se observan células columnares. MEB x 1000

La determinación de elementos mediante ICP permitió identificar calcio y fósforo aunque la concentración en las distintas muestras fue semejante, el sésamo germinado presentó el mayor valor en ambos elementos. Los resultados obtenidos de cada muestra están expresados en la Cuadro 4. La relación Ca/P fue de 0,7.

Cuadro 4. Determinación de elementos del sésamo por ICP

Muestra	Concentración (mg de P/ g de muestra)	Concentración (mg de Ca/ g de muestra)
Semilla de sésamo seca	9,42	6,84
Sésamo germinado	9,83	7,49
Sésamo en agua destilada	9,24	6,84
Sésamo en solución fisiológica	9,73	7,39

Resultados para el objetivo: *Reconocer la acidez de la solución de sésamo y de la bebida gaseosa.*

En la escala colorimétrica utilizada, el pH de la solución de sésamo corresponde a 6 y el de la bebida corresponde a 3 (Figura 43).



Figura 43. Acidez de la solución de sésamo y la bebida gaseosa. Tiras colorimétricas de pH y la escala correspondiente

II. PRODUCCIÓN DE LESIONES DE EROSIÓN DEL ESMALTE DENTAL

Resultados para el objetivo: *Definir las condiciones de producción de las lesiones de erosión del esmalte dental superficial*

El esmalte expuesto a la bebida gaseosa durante 90 minutos mostró una dureza Vickers de 313,7 HV mientras que en el esmalte sano resultó de 421,7 HV. El porcentaje de disminución de la dureza representó un 25%.

Se seleccionó un tiempo de exposición de 90 minutos teniendo en cuenta los resultados informados por otros estudios. En un trabajo utilizando la misma bebida gaseosa (151), se determinó que la dureza del esmalte expuesto durante 180 minutos fue de 256,5 HV, mientras que en el esmalte sano fue de 342,8 HV. El porcentaje de disminución de la dureza del esmalte tratado resultó semejante al obtenido en nuestros ensayos. Otros autores, utilizando la misma bebida durante una hora de exposición, reportaron un porcentaje de dureza del esmalte del 92,6% en relación al sano y del 85,7% después de 3 h (81).

Además, para definir la producción de la erosión, se evaluó el aspecto morfológico y químico de una muestra sana y una tratada con la bebida mediante

MEB-EDS del LIMF. Las condiciones de observación fueron a bajo vacío con presión variable de 20 kV y un conteo de electrones de alrededor de 60 segundos. Se utilizó la función de escaneo lineal (Line- Scan) y se obtuvieron los espectros correspondientes.

La observación al MEB del esmalte sano incluido en polímero, reveló un aspecto homogéneo de la superficie externa (esmalte radial) (Figura 44). El análisis elemental por EDS de calcio y fósforo, mediante escaneo en línea (Line Scan) identificó espectros constantes en el esmalte radial que desaparecen donde comienza la resina (Figura 45).

La erosión producida por la exposición a la bebida aparece en las micrografías como una banda superficial irregular (Figura 46). El espesor medio de la zona desmineralizada fue de 9 μm , aunque resultó muy variable. Los espectros en línea mostraron una disminución en los picos de calcio y fósforo en la zona desmineralizada, correspondiente a los 10 a 16 μm aproximadamente (Figura 47).

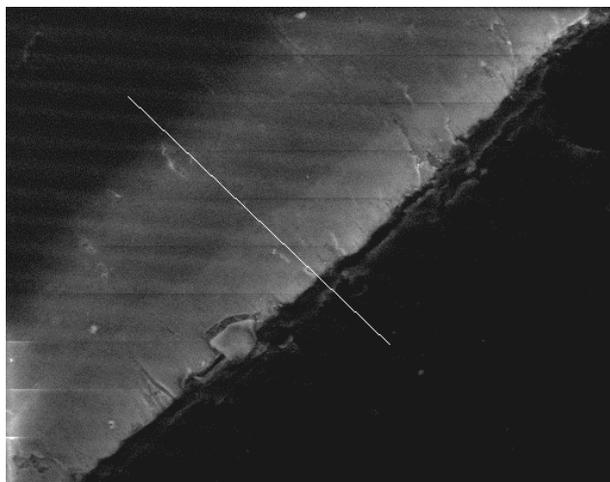


Figura 44. EDS Line Scan en esmalte sano. MEB x 2400

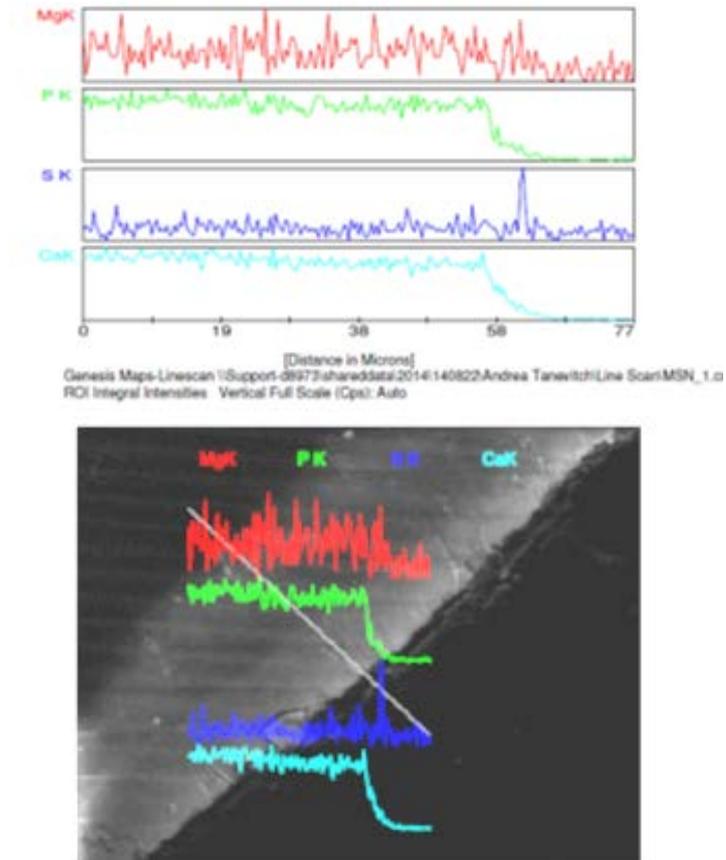


Figura 45. Espectros EDS del esmalte sano. De izquierda a derecha esmalte sano (de 0 a 58 micrones) hasta resina de inclusión (58 a 77 micrones).

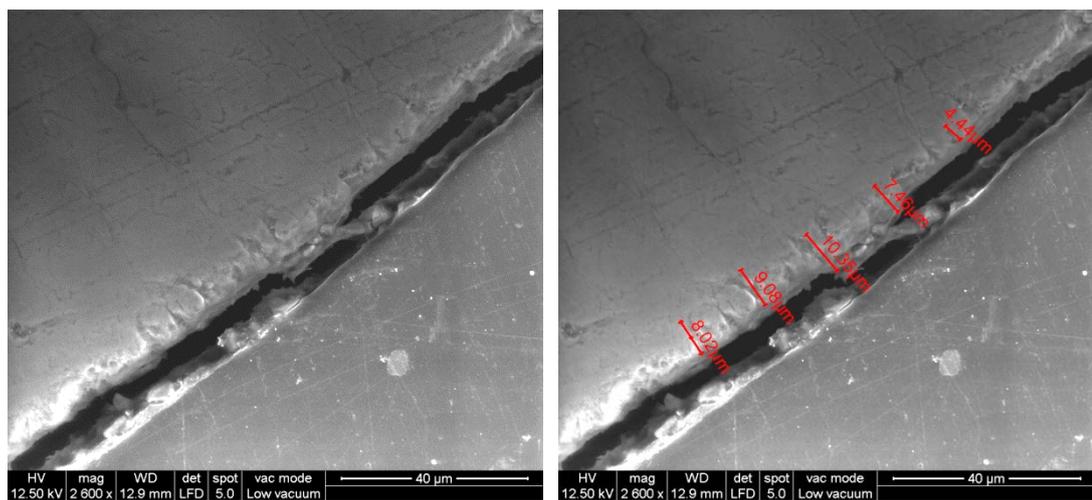


Figura 46. Micrografía del esmalte erosionado y medidas. MEB x 2600

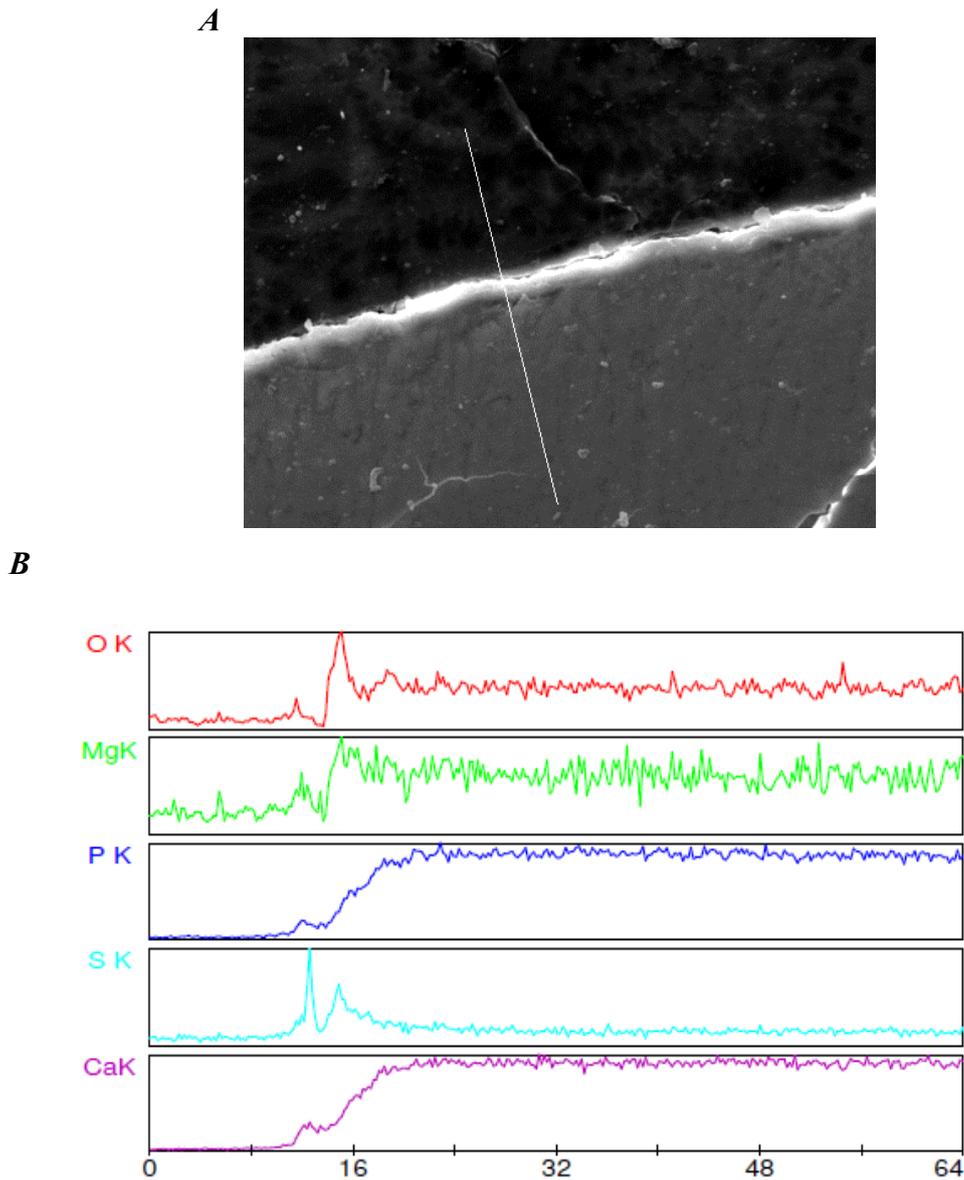


Figura 47. EDS Line del esmalte erosionado. **A** EDS Line Scan, arriba resina, abajo esmalte. **B** Espectros: de izquierda a derecha resina de inclusión (0 a 8 micrones) franja de esmalte desmineralizado (8 a 16 micrones) y esmalte sano (16 a 64 micrones).

Por lo expuesto, consideramos que la exposición durante 90 minutos del esmalte a la bebida gaseosa resultó un tiempo adecuado para crear una lesión de erosión en el esmalte dental.

III. RÉGIMEN CÍCLICO: SÉSAMO CICLADO EN SALIVA ARTIFICIAL

Resultados para el objetivo: *Explorar las variaciones producidas en el contenido mineral de las lesiones de erosión del esmalte dental expuesto a una solución de sésamo con régimen cíclico mediante el registro de microdureza.*

Se estudiaron las variaciones producidas en el contenido mineral de las lesiones de erosión del esmalte dental expuesto a una solución de sésamo con régimen cíclico. Se obtuvieron valores de microdureza Vickers en los grupos agua, saliva y sésamo y en sus respectivas mitades sanas.

El gráfico de barra muestra la comparación del comportamiento de las muestras de cada grupo (Figura 48). Los valores medios de microdureza Vickers y la desviación estándar del esmalte tratado de los distintos grupos se muestran en la Tabla 3. La dureza de las muestras SE resultó mayor en relación a los grupos A y S. No se encontró diferencia significativa ($p>0,05$) entre las muestras A y S (Figura 49).

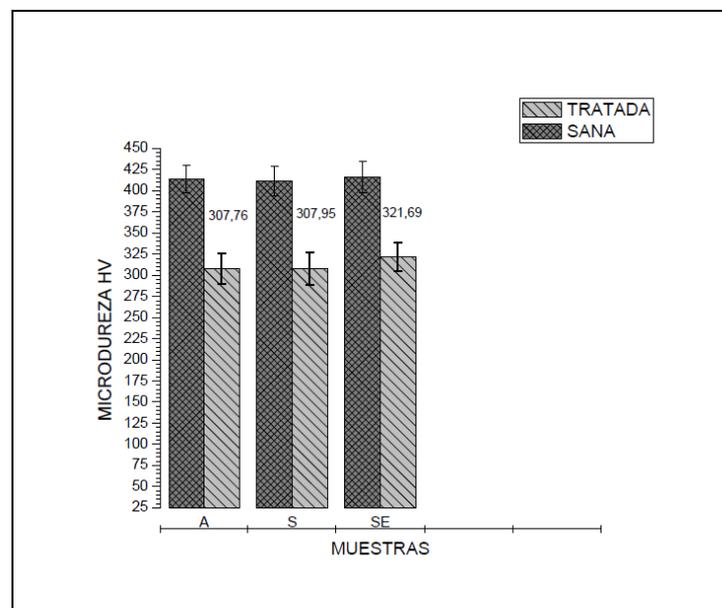


Figura 48. Microdureza de las muestras sanas y con tratamiento. A: grupo agua, S: grupo saliva artificial, SE: grupo sésamo

Tabla 3. Valores de microdureza (HV), desviación estándar (DE) y error estándar (EE) de muestras tratadas

Muestra	Tamaño	Media (HV)	DE	EE de la Media
Tratada A	6	307,76	18,40	3,36 (0)
Tratada S	6	307,95	18,81	3,43 (0)
Tratada SE	6	321,68	16,81	3,07 (1)

Los números distintos indican que la diferencia es significativa ($p < 0,05$)

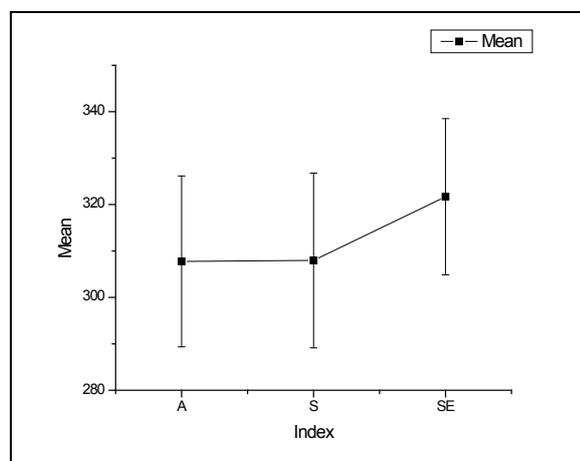


Figura 49. Valores promedio de microdureza (DE y Error) de muestras tratadas

La microdureza de las muestras sanas de todos los grupos (Tabla 4), no presentó diferencia significativa (Figura 50).

Tabla 4. Microdureza (HV), desviación estándar (DE) y error estándar (EE) de muestras sanas

Muestra	Tamaño	Registros	Media (HV)	DE	EE de la Media
Sana A	6	5	413,57	16,32	2,98 (0)
Sana S	6	5	411,32	17,85	3,25 (0)
Sana SE	6	5	416,44	18,65	3,40 (0)

Los números iguales indican que la diferencia no es significativa ($p > 0,05$)

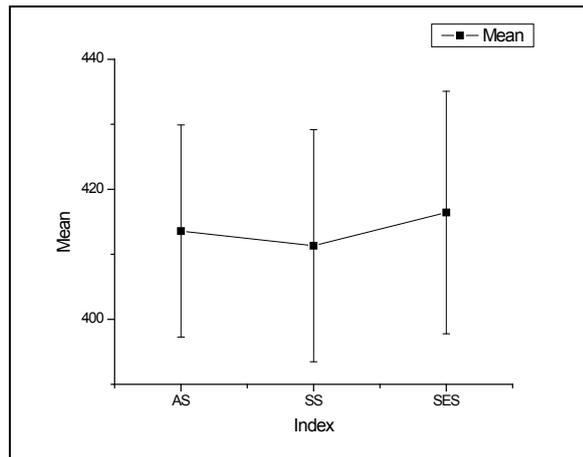


Figura 50. Valores medios de microdureza (DE y Error) de muestras sanas

El esmalte del grupo SE registró menor pérdida de dureza superficial en relación a los grupos A y S (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de pérdida mineral

	A	S	SE
%ΔHV	25,58	25,13	22,75

A: grupos agua, S: grupo saliva artificial, SE grupo sésamo

Resultados para el objetivo: *Observar la modificación topográfica, morfológica y elemental, producida en la microestructura de las lesiones de erosión del esmalte dental expuesto a una solución de sésamo con régimen cíclico.*

Se examinaron las modificaciones topográficas producidas en la microestructura de las lesiones de erosión del esmalte dental expuesto a una solución de sésamo ciclado con saliva artificial durante 5 días.

Los registros se realizaron sobre esmalte sin desgastar ni incluir en polímero. Se destinaron 2 mitades de una misma corona correspondientes a la superficie palatina (muestra P) y vestibular (muestra V). Después de crear la erosión, en una se aplicó el tratamiento con sésamo (muestra V) y en la otra saliva artificial (muestra P) durante

el mismo tiempo. Se midió antes, después de la desmineralización y después del tratamiento. La rugosidad inicial fue similar en (P) y (V) en un área de 5 μm , pero presentó mayor diferencia al aumentar el área de registro, presentando mayor rugosidad (P). Después de la desmineralización, la rugosidad aumentó más de 10 veces en los 5 μm y 15 veces en (V) en el área de 20 μm . Con el tratamiento de sésamo, la rugosidad disminuyó en todas las áreas. En cambio, en la tratada con saliva sólo se redujo en los 5 μm (Cuadro 5).

Cuadro 5. Valores de rugosidad superficial para las muestras tratadas con saliva y con sésamo ciclado 5 días

	SANO		DESMINERALIZADO		TRATADO	
	SS	SES	SD	SED	S	SE
	03/11/2014		28/11/2014		23/02/2015	
	Diente-P 5 μm	Diente-V 5 μm	Diente-P 5 μm	Diente-V 5 μm	Diente-P 5 μm	Diente-V 5 μm
Rq nm	9,2	8,645	98,8	110,675	74,85	74,6
Ra nm	7,4375	6,415	79,35	87,925	59,225	58,65
Rmax nm	61,725	79,575	589,75	602,25	473	524,75
	Diente-P 10 μm	Diente-V 10 μm	Diente-P 10 μm	Diente-V 10 μm	Diente-P 10 μm	Diente-V 10 μm
Rq nm	27,075	11,18	144	168,5	141,5	63,625
Ra nm	22,2	8,3575	115,5	135,75	115,05	49,6
Rmax nm	163,625	111,2	853,25	1019	822,25	414,25
	Diente-P 15 μm	Diente-V 15 μm	Diente-P 15 μm	Diente-V 15 μm	Diente-P 15 μm	Diente-15 μm
Rq nm	41,7	14,125	164,5	265	185,25	71,375
Ra nm	33,825	11,0125	134	211,5	150,25	54,175
Rmax nm	247,75	108,95	1052,5	1464,75	1078,5	554
	Diente-P 20 μm	Diente-V 20 μm	Diente-P 20 μm	Diente-V 20 μm	Diente-P 20 μm	Diente-V 20 μm
Rq nm	70,875	19,625	206,25	316,75	185,75	97,95
Ra nm	59,675	15,425	168	261,75	147,5	74,275
Rmax nm	369,75	155,75	1167,75	1796	1187,25	670,25

Rq nm Rugosidad. **Ra nm** Media aritmética. **Rmax nm** La diferencia máxima de altura. **Saliva**: SS esmalte sano. SD esmalte desmineralizado. S esmalte tratado con saliva. **Sésamo**: SES esmalte sano. SED esmalte desmineralizado. SE esmalte tratado con sésamo.

Las imágenes de AFM de las muestras (P) y (V) se convirtieron en proyecciones 3D de rugosidad superficial para el área de 20 μm . La topografía del esmalte sano es levemente irregular con surcos poco profundos (Figura 51 *A* y *D*). El esmalte sano de la muestra tratada con sésamo ciclado presentó elevaciones y depresiones suaves, con escasa rugosidad (Figura 51 *D*).

Después de la acción de la bebida, la erosión se presentó afectando al prisma. En la muestra (V), la acción del ácido produjo un patrón de grabado de tipo I, con áreas deprimidas en el corazón de los prismas y contornos elevados (Figura 51 *E*). En cambio, en la muestra (P), el ácido produjo un patrón invertido, presentando áreas redondeadas elevadas circundadas por depresiones profundas (Figura 51 *B*).

El tratamiento con saliva artificial produjo una reducción de las elevaciones y depresiones en relación al esmalte sano (Figura 51 *C*). Después del tratamiento con sésamo ciclado, el esmalte resultó en gran parte, con menor rugosidad (Figura 51 *F*).

De las mismas muestras (P) y (V) ya tratadas, se obtuvieron imágenes del MEB y espectros de EDS.

Al MEB se observó un depósito muy delgado de material cubriendo los prismas desmineralizados tanto en la muestra tratada con saliva como en la tratada con sésamo. La muestra (P) evidenció un depósito de aspecto granular que enmascara los contornos de los prismas (Figuras 52 y 53). En el espectro EDS de esta muestra se detectaron picos de calcio y fósforo (Figura 54).

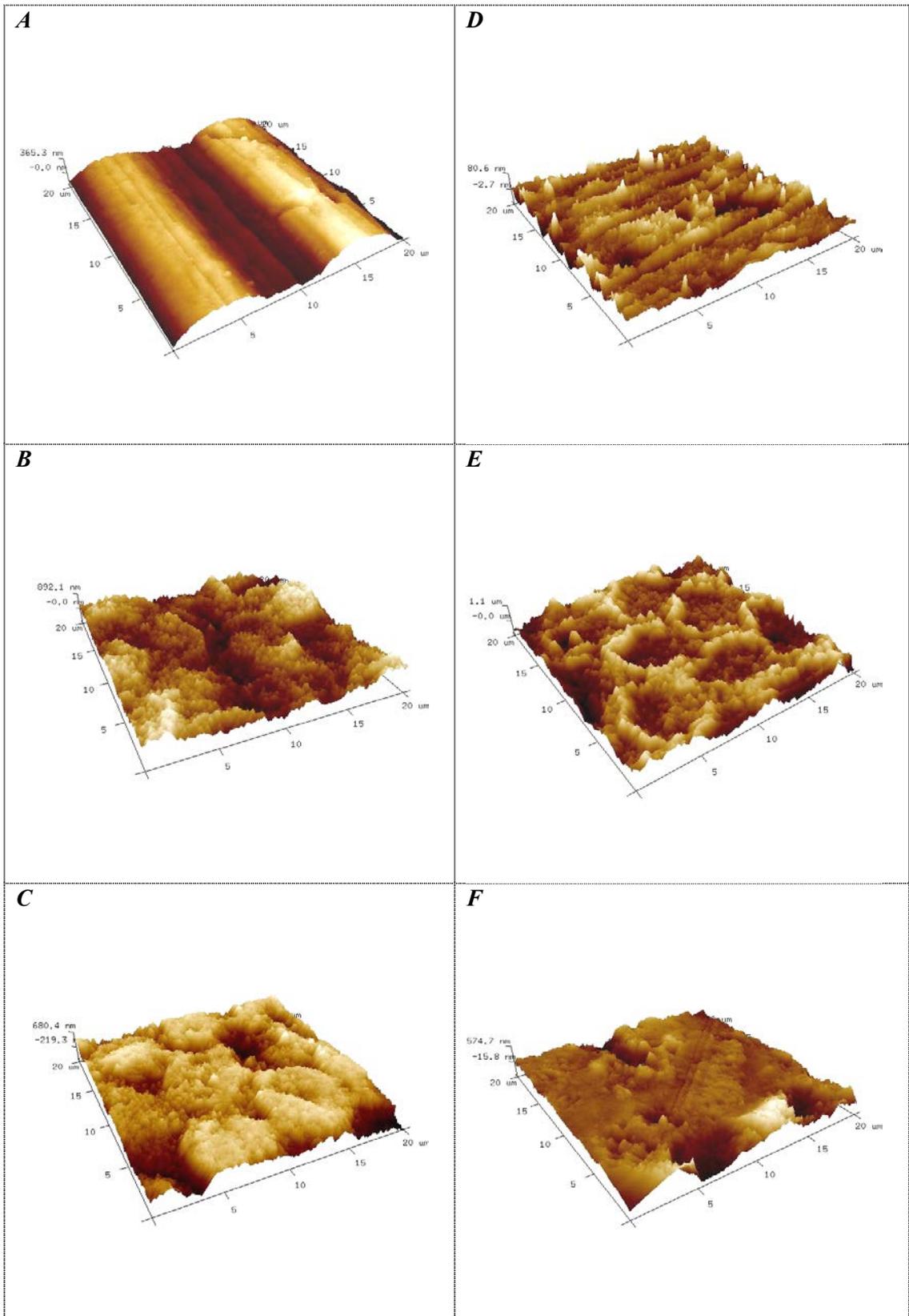


Figura 51. Imágenes de rugosidad superficial mediante AFM. *A* y *D* esmalte sano. *B* y *E* esmalte erosionado. *C* esmalte desmineralizado tratado con saliva artificial. *F* esmalte desmineralizado tratado con sésamo ciclado en saliva. *A*, *B* y *C* diente tratado con saliva artificial. *D*, *E* y *F* diente tratado con sésamo cíclico

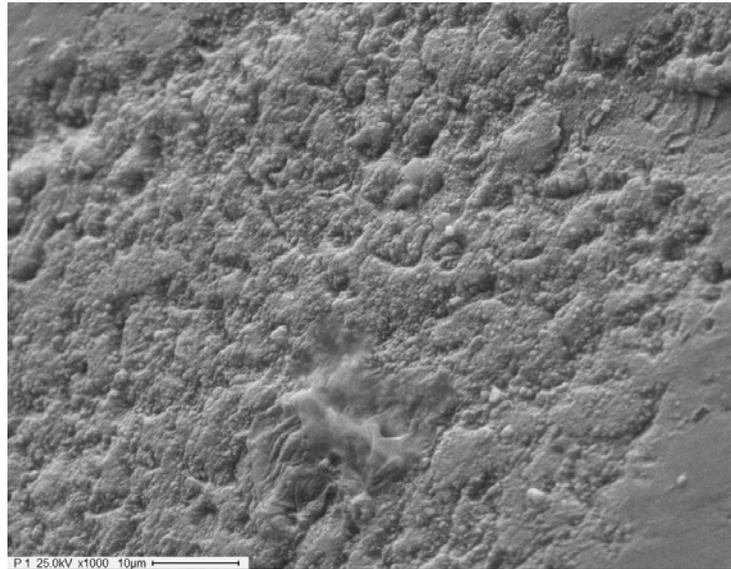


Figura 52. Micrografía del esmalte erosionado tratado con saliva artificial. Muestra (P). MEB x1000

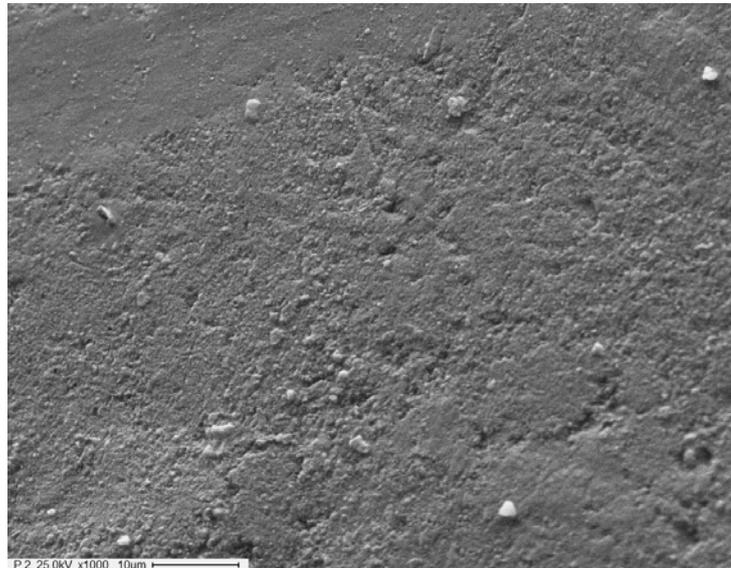


Figura 53. Micrografía del esmalte erosionado tratado con saliva artificial. Otra zona del esmalte de la muestra (P). MEB x 1000

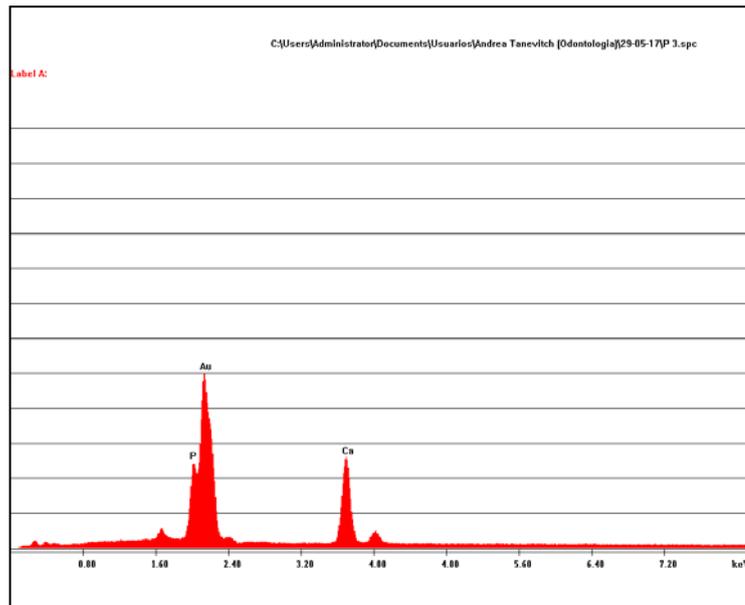


Figura 54. EDS del esmalte tratado con saliva. Muestra (P).

La micrografía de la muestra (V) tratada con sésamo ciclado, también mostró un depósito de espesor variable taponando los poros creados por la erosión (Figuras 55 y 56). La superficie presentó un aspecto más homogéneo que la tratada con saliva artificial. El EDS de (V) resultó semejante a la tratada con saliva artificial (Figura 57).

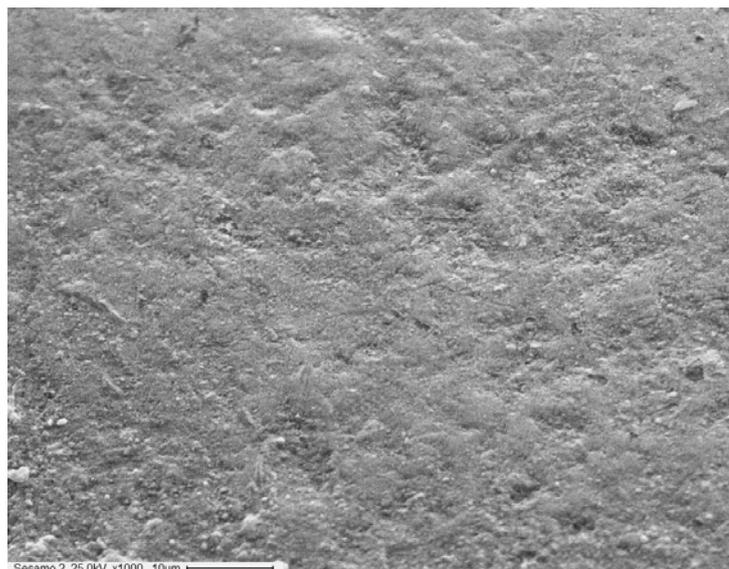


Figura 55. Micrografía del esmalte erosionado tratado con sésamo ciclado. Muestra (V). MEB x1000

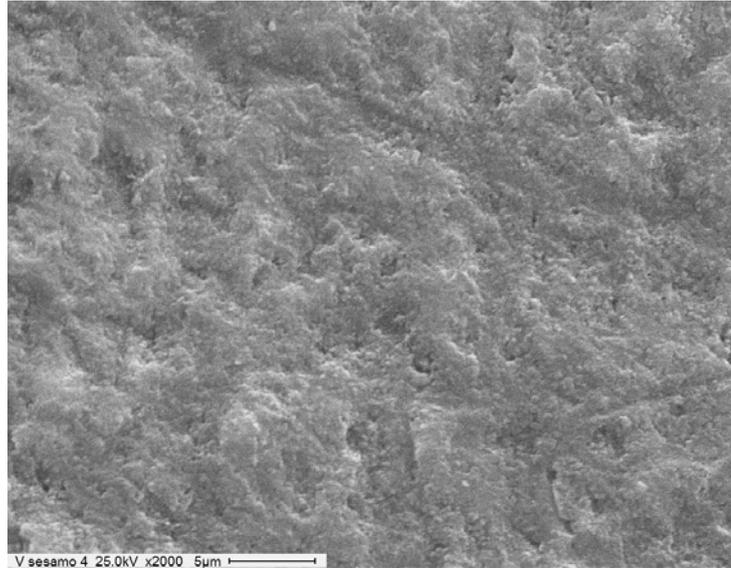


Figura 56. Micrografía del esmalte erosionado tratado con sésamo ciclado. Detalle de la muestra (V) a mayor aumento. MEB x 2000

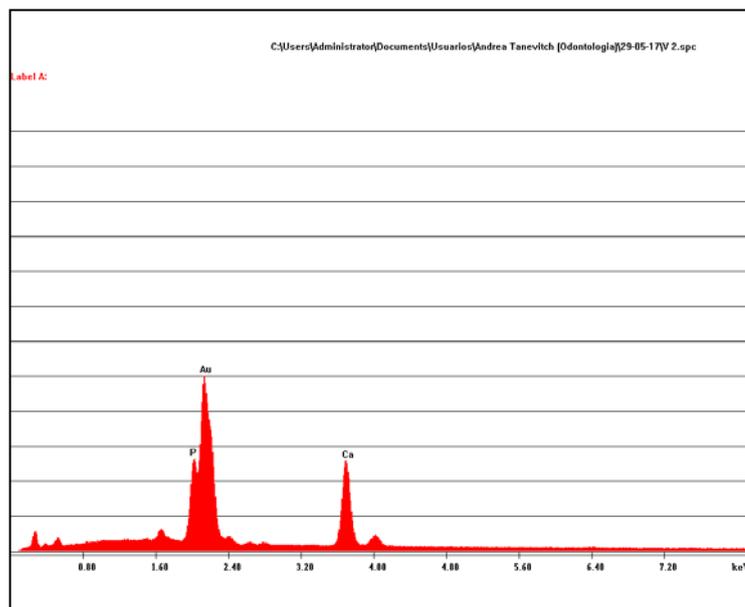


Figura 57. EDS del esmalte tratado con sésamo. Muestra (V).

Los valores relativos de calcio y fósforo y su relación (Ca/P) no presentaron diferencias (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis semicuantitativo del tratamiento saliva y sésamo ciclado. Valores expresados en peso relativo.

29/05/2017	Saliva Muestra P				Sésamo Muestra V			
	Ca	P	Ca/P			Ca	P	Ca/P
P1	56,96	43,04	1,32		V1	57,71	42,29	1,36
P2	56,75	43,25	1,31		V2	57,63	42,37	1,36
P3	59,31	40,69	1,45		V3	57,31	42,69	1,34
PROMEDIO	57,67	42,33	1,36			57,55	42,45	1,35
DE	1,42	1,42	0,08			0,21	0,21	0,01

Las secciones de esmalte sin incluir de una muestra tratada con sésamo ciclado se destinaron al análisis con XPS. Se determinaron las variaciones en la relación átomo% de C, O, Ca, P y N del esmalte sano, desmineralizado y tratado con sésamo ciclado (Tabla 7). El Ca y P disminuyeron en el esmalte desmineralizado y más aún en el tratado con sésamo. La relación Ca/P en el esmalte sano fue de 1,29; en el desmineralizado 1,28 y en el tratado con sésamo 0,99. El N y C aumentaron en el esmalte tratado con sésamo en relación al desmineralizado y al sano.

Tabla 7. Determinación atómica de elementos mediante XPS

	Átomos %		
	Esmalte sano	Esmalte erosionado	Esmalte Tratado con sésamo ciclado
C	35.4±0.4	56.9±0.1	64.1±0.1
O	40.7±0.3	25.66±0.06	21.51±0.06
Ca	11.4±0.1	8.35±0.02	2.29±0.07
P	8.77±0.07	6.51±0.03	2.30±0.02
Zn	0.75±0.1	0.07±0.01	0.11±0.01
N	1.95±0.04	2.34±0.04	9.64±0.05
Na	0.40±0.01	0.03±0.02	0.01±0.01
F	0.36±0.01	0.20±0.01	0.07±0.01
Mg	0.18±0.05	----	----

En el espectro total del esmalte sano aparecen picos para el carbono, calcio, fósforo, oxígeno y nitrógeno y en pequeña proporción zinc, flúor, sodio y magnesio (Figura 58). El espectro correspondiente a cada elemento presente en el esmalte sano se muestra en la Figura 59.

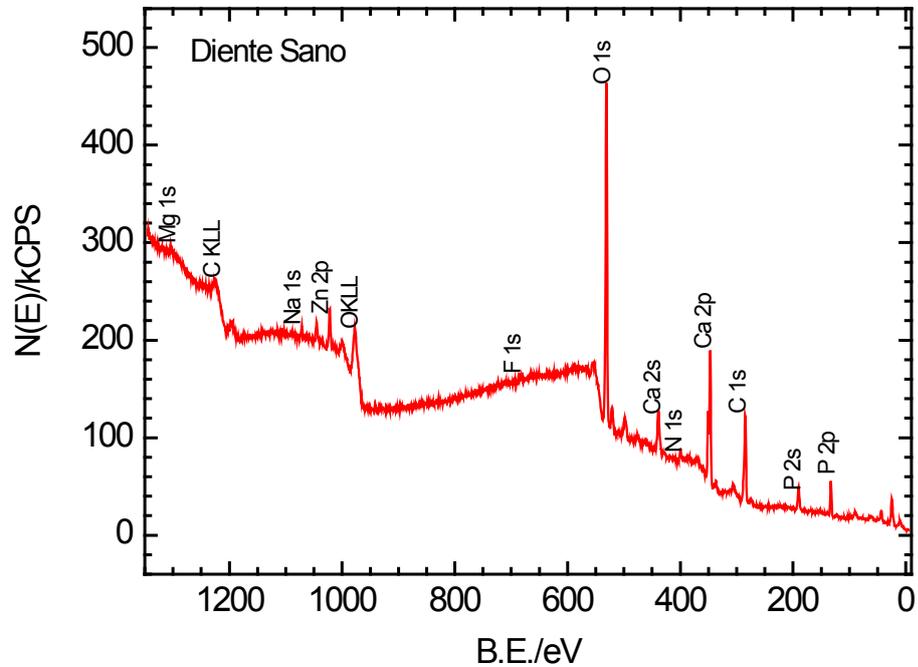


Figura 58. Espectro por XPS del esmalte sano. Mg: magnesio; C: carbono; Na: sodio; Zn: zinc; O: oxígeno; F: flúor; Ca: calcio; N: nitrógeno; P: fósforo

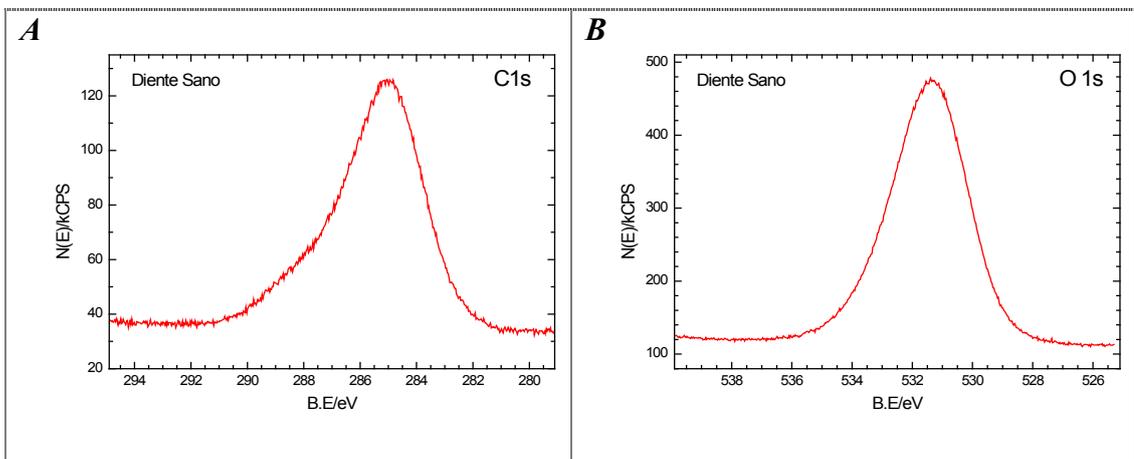


Figura 59. XPS del esmalte sano. **A** espectro del carbono. **B** espectro del oxígeno

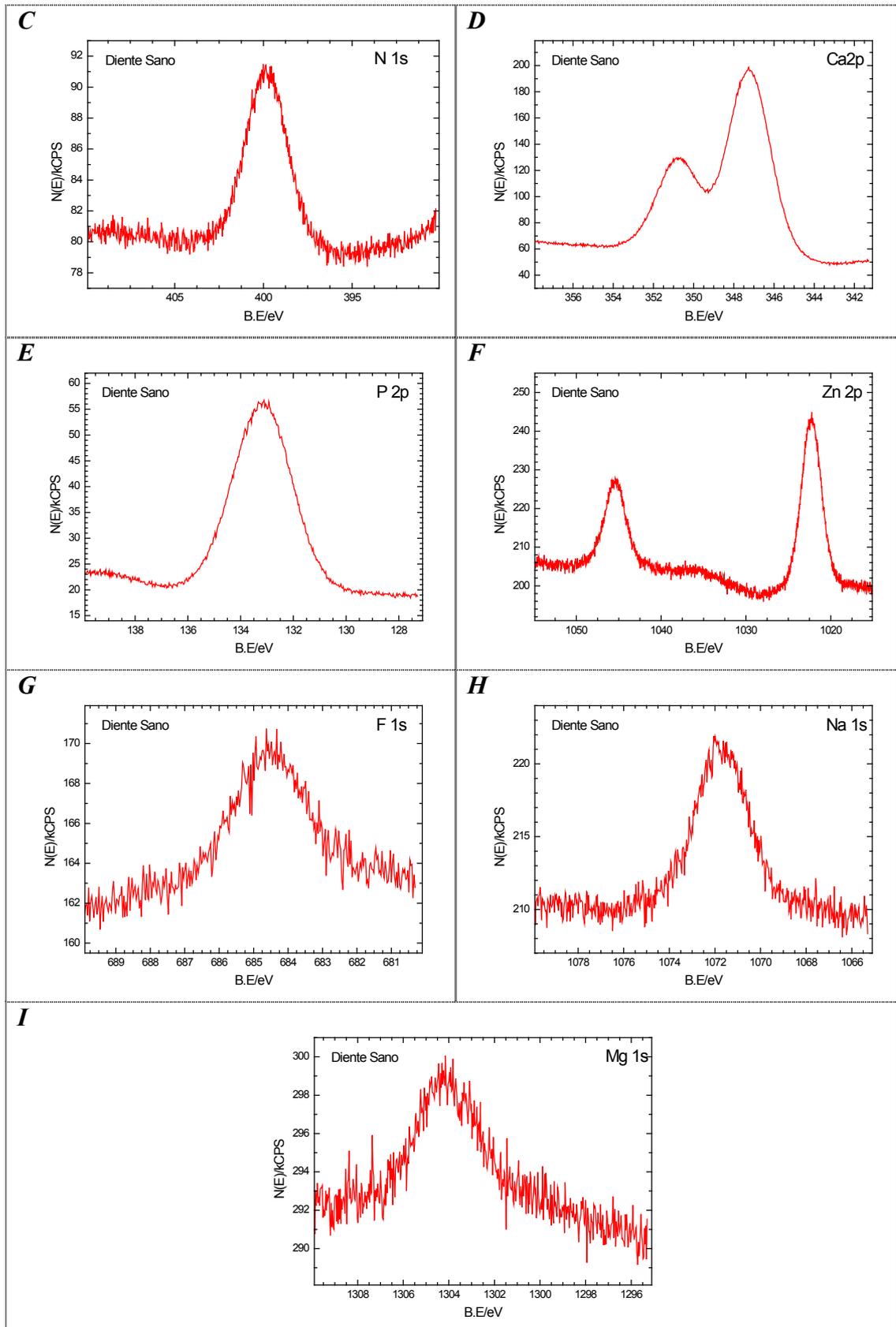


Figura 59 (continuación). **C** espectro del nitrógeno. **D** espectro del calcio. **E** espectro del fósforo. **F** espectro del zinc. **G** espectro del flúor. **H** espectro del sodio. **I** espectro del magnesio

En el esmalte desmineralizado se identifican los picos de los mismos elementos presentes en el esmalte sano, excepto el magnesio que desaparece (Figura 60). Los espectros de cada elemento se muestran en la Figura 61.

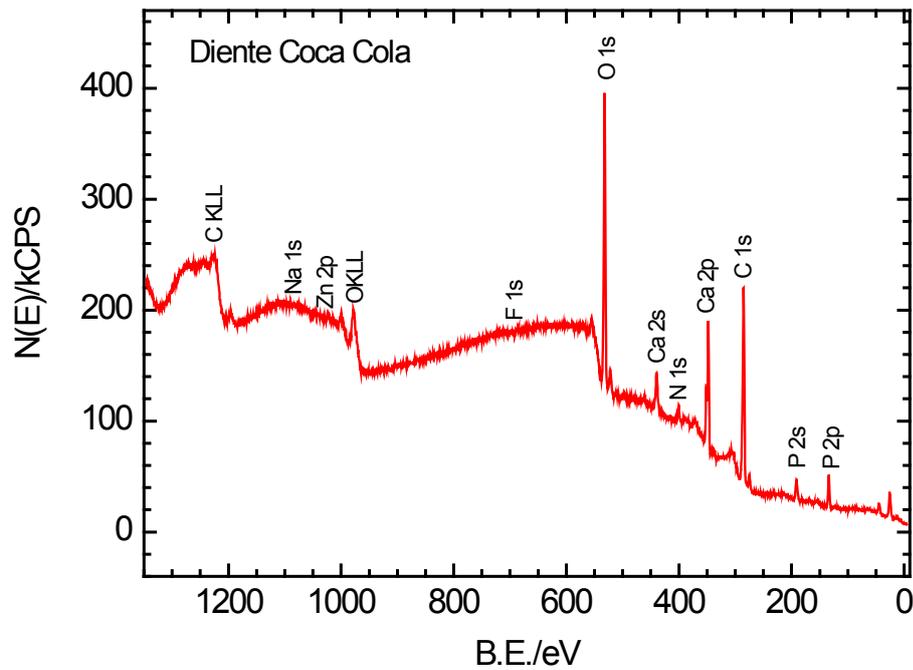


Figura 60. Espectro por XPS del esmalte desmineralizado. C: carbono; Na: sodio; Zn: zinc; O: oxígeno; F: flúor; Ca: calcio; N: nitrógeno; P: fósforo

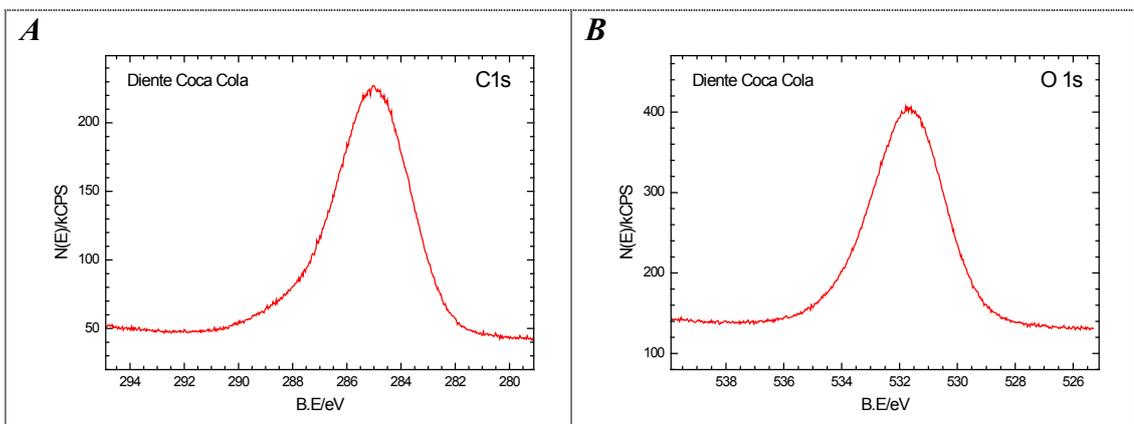


Figura 61. XPS del esmalte erosionado. **A** espectro del carbono. **B** espectro del oxígeno.

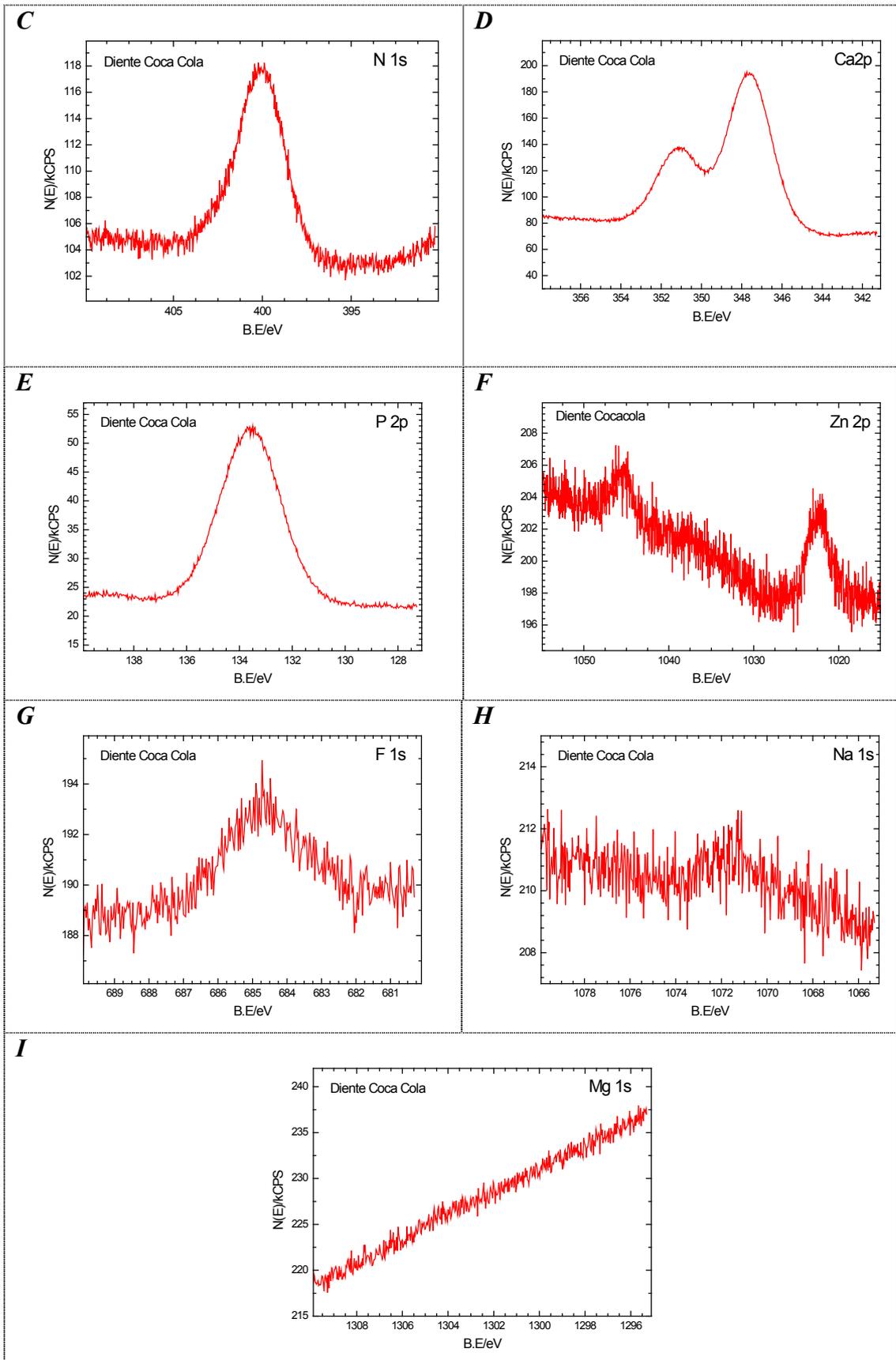


Figura 61 (continuación). **C** espectro del nitrógeno. **D** espectro del calcio. **E** espectro del fósforo. **F** espectro del zinc. **G** espectro del flúor. **H** espectro del sodio. **I** espectro del magnesio.

En el espectro total por XPS del esmalte tratado con sésamo ciclado en saliva artificial se observa una disminución del pico de calcio y aumento del carbono y nitrógeno (Figura 62). Los espectros de los elementos presentes están representados en la Figura 63.

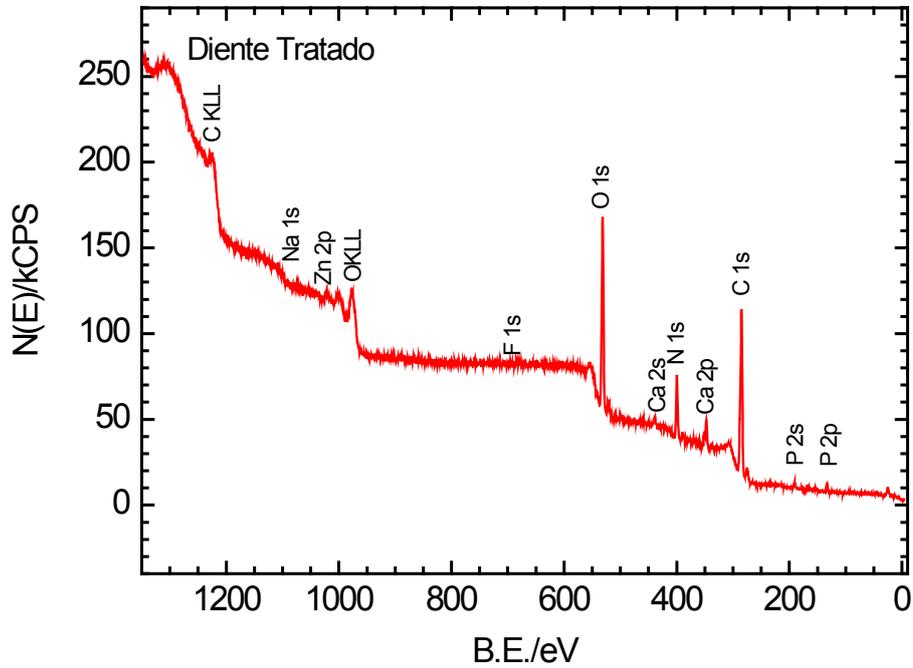


Figura 62. Espectro total por XPS del esmalte tratado con sésamo ciclado en saliva artificial. C: carbono; Na: sodio; Zn: zinc; O: oxígeno; F: flúor; Ca: calcio; N: nitrógeno; P: fósforo

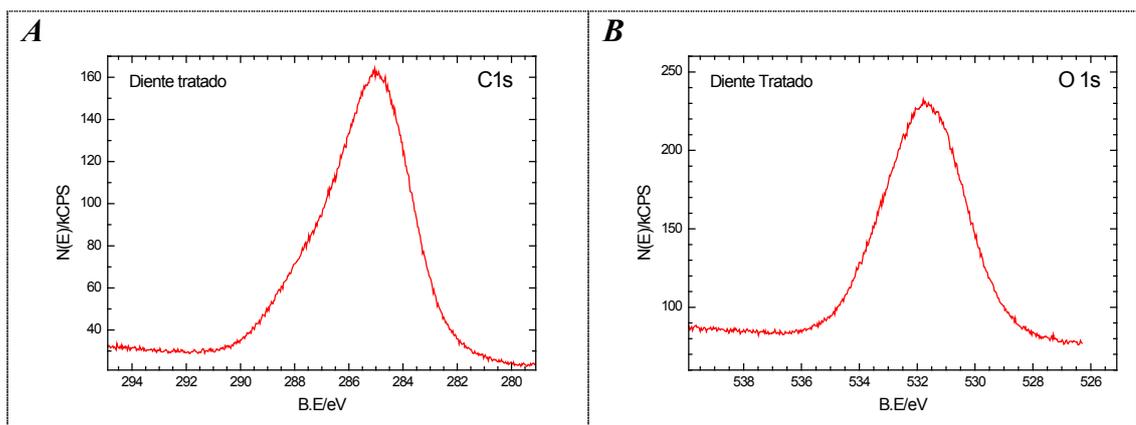


Figura 63. XPS del esmalte tratado con sésamo ciclado en saliva artificial. **A** espectro del carbono. **B** espectro del oxígeno

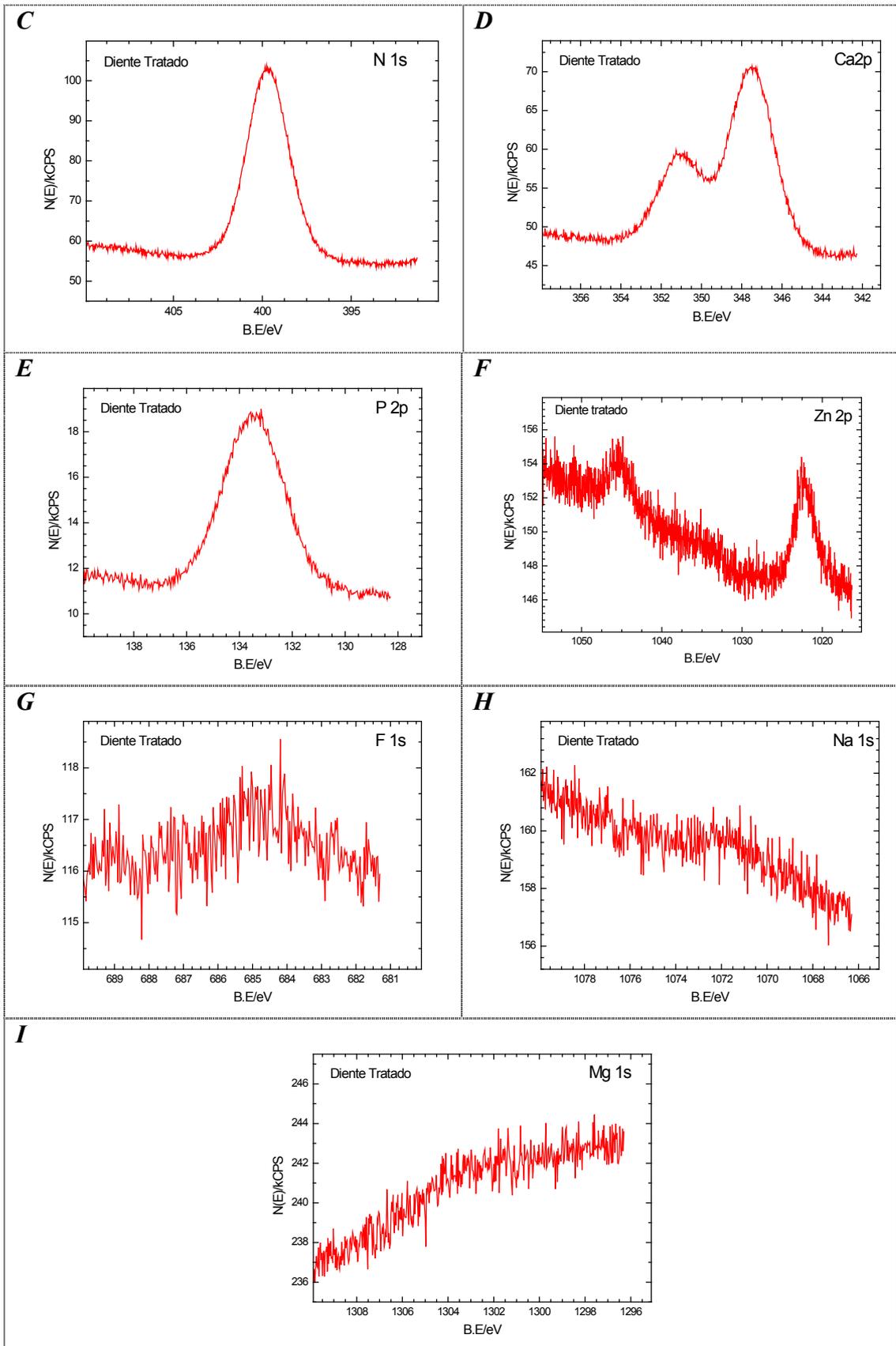


Figura 63 (continuación). **C** espectro del nitrógeno. **D** espectro del calcio. **E** espectro del fósforo. **F** espectro del zinc. **G** espectro del flúor. **H** espectro del sodio. **I** espectro del magnesio.

IV. RÉGIMEN EN CONDICIONES ESTÁTICAS: SÉSAMO 24 HORAS

Resultados del objetivo: *Establecer las variaciones en el contenido mineral en la capa más superficial de las de las lesiones de erosión, expuestas a una solución de sésamo en condiciones estáticas, mediante el registro de microdureza.*

Se registró la dureza H del esmalte sano en el total de muestras incluidas (n=20) y se descartaron aquellas cuyos valores se desviaban más de ± 1 GPa. La media obtenida para H en el esmalte sano fue $4,61 \pm 0,58$ GPa (n=17). En el esmalte erosionado H fue $0,06 \pm 0,09$ GPa. Finalmente, después del tratamiento, se consideró una muestra representativa de cada grupo resultando valores H de $0,09 \pm 0,01$ para la saliva artificial y $0,12 \pm 0,02$ para el sésamo (Tabla 8).

Tabla 8. Valores medios de dureza superficial

	HARDNESS “H”	MODULUS “Er”	CONTACT DEPTH “hc”
SANO	4,61±0,58	88,92±11,82	164,09±12,70
DESMINERALIZADO	0,06±0,09	10,70±4,57	1548,65±515,50
SALIVA	0,09±0,01	15,42±3,97	1294,24±129,14
SÉSAMO	0,12±0,02	17,47±2,33	1106,30±115,45

Dureza “H”, Módulo reducido “Er” y Profundidad de contacto “hc”.

En los gráficos de dispersión de las muestras del grupo saliva se observa que algunas muestras se alejan de la media (Figura 64). Lo mismo sucede en el grupo de muestras del tratamiento con sésamo (Figura 65).

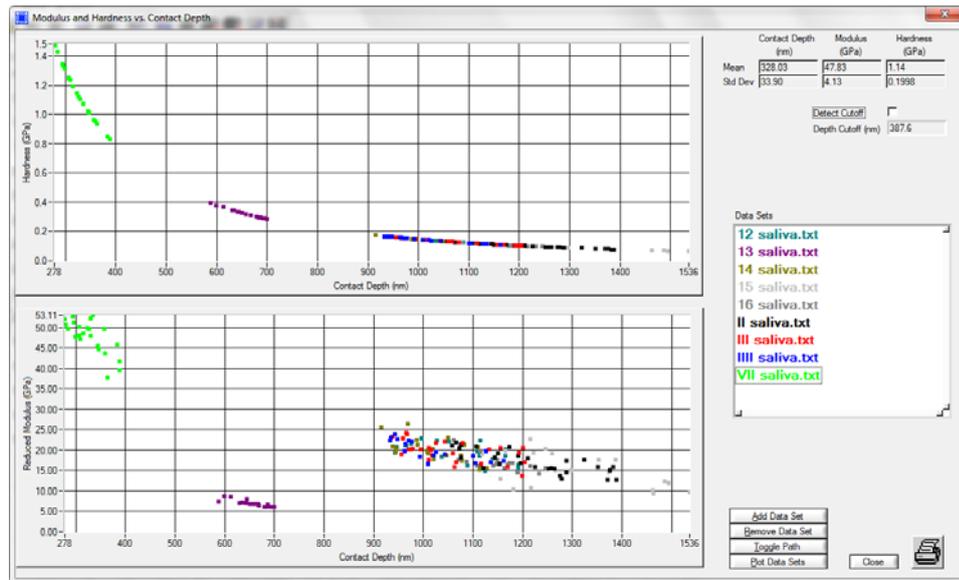


Figura 64. Muestras ensayadas del grupo saliva. Se observa claramente que las muestras 13 y VII se alejan del resto

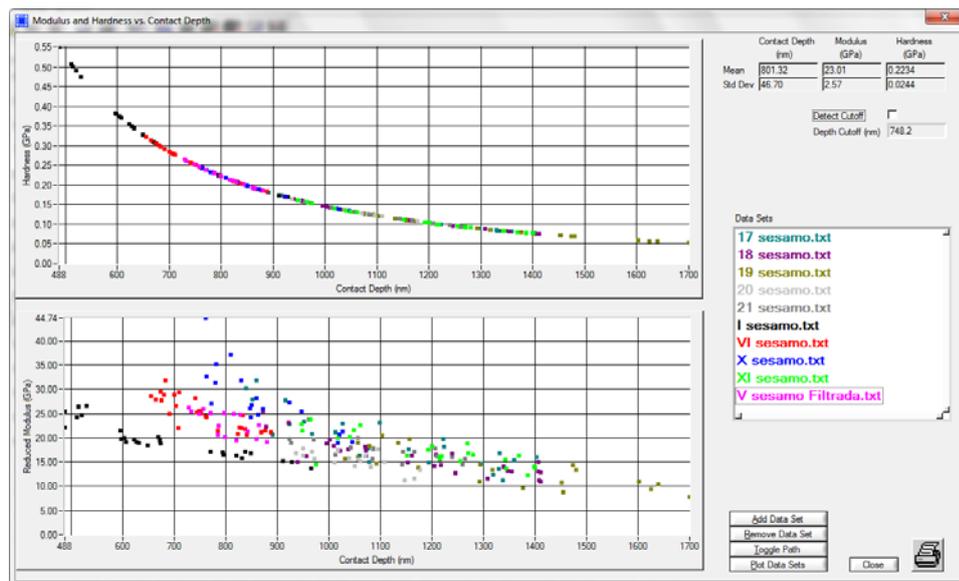
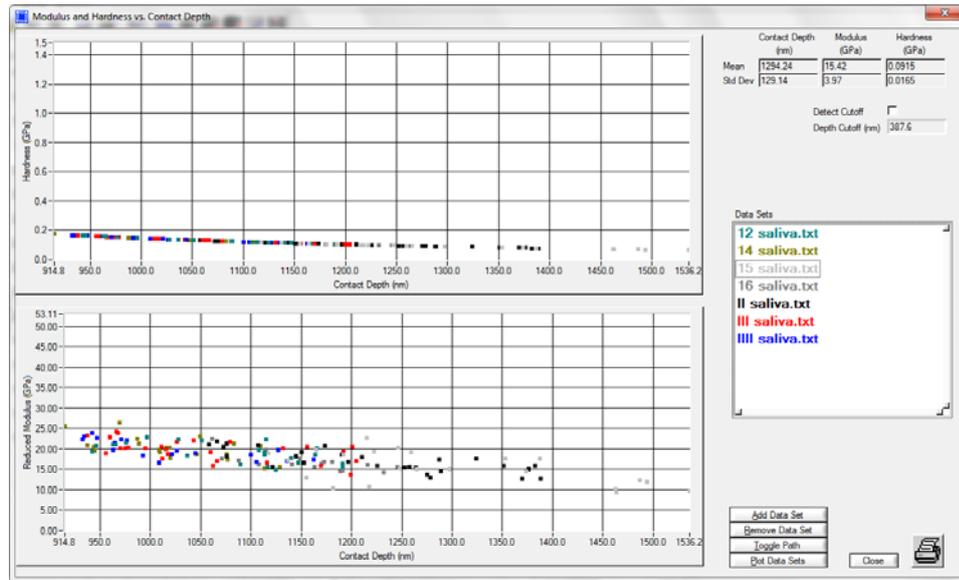


Figura 65. Muestras ensayadas del grupo sésamo. Las muestras I, V, VI y X se alejan de la media

Las muestras que se alejaron del resto fueron descartadas y se obtuvieron gráficos representativos de muestras para el tratamiento saliva y sésamo (Figura 66 A y B). Además se compararon las desviaciones de cada grupo (Figura 67 A y B).

A



B

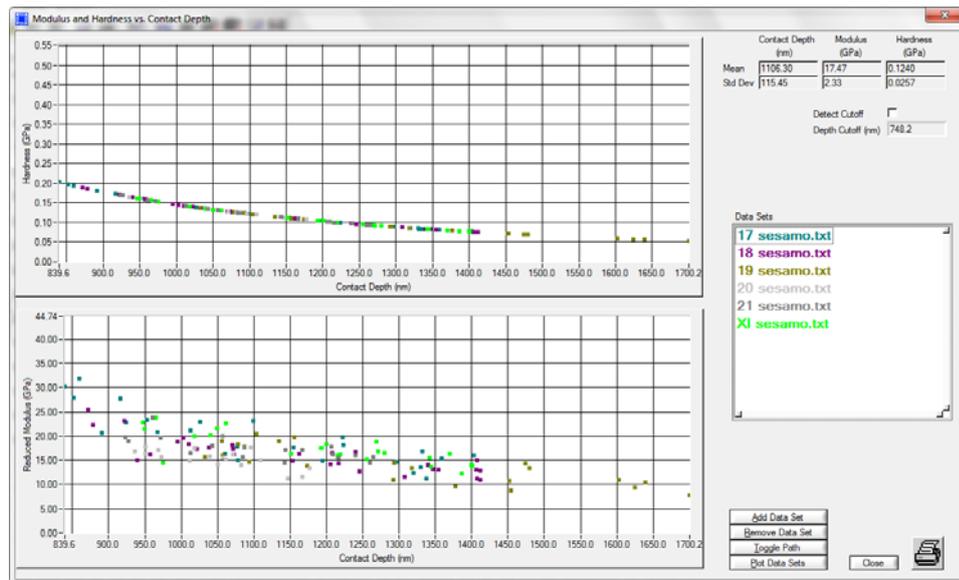
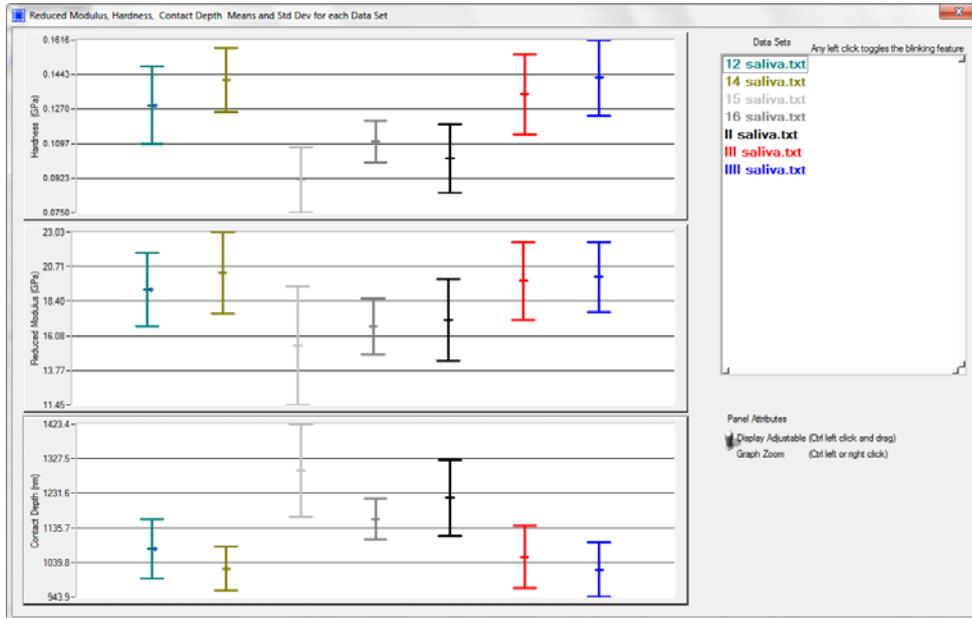


Figura 66. Muestras representativas de cada grupo. Ensayos del Triboindenter. **A** Muestras del grupo saliva artificial. **B** Muestras del grupo sésamo 24 h

A



B

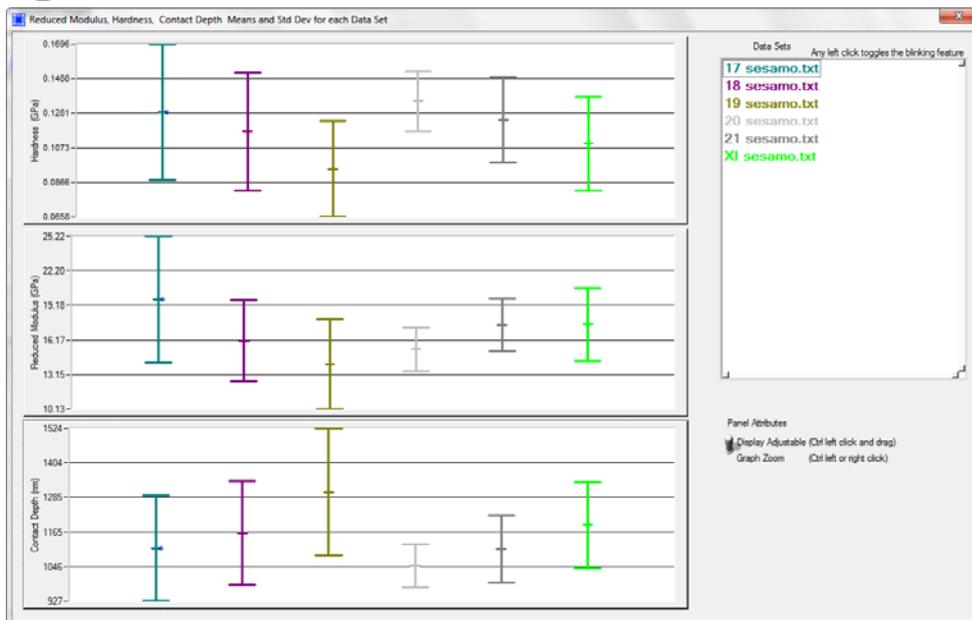


Figura 67. Desviación estándar de cada muestra en cada grupo. **A** Muestras del grupo saliva artificial. **B** Muestras del grupo sésamo 24 h

Considerando las muestras representativas de cada grupo, se encontró diferencia relativa en las propiedades mecánicas. Las muestras tratadas con sésamo presentaron un incremento en promedio del 14% en el Módulo reducido “Er” y de un 38% en Dureza “H” con respecto a las muestras tratadas con saliva (Figura 68). Sin embargo,

las gráficas comparativas muestran que la dispersión enmascara las propiedades mecánicas (Figura 69).

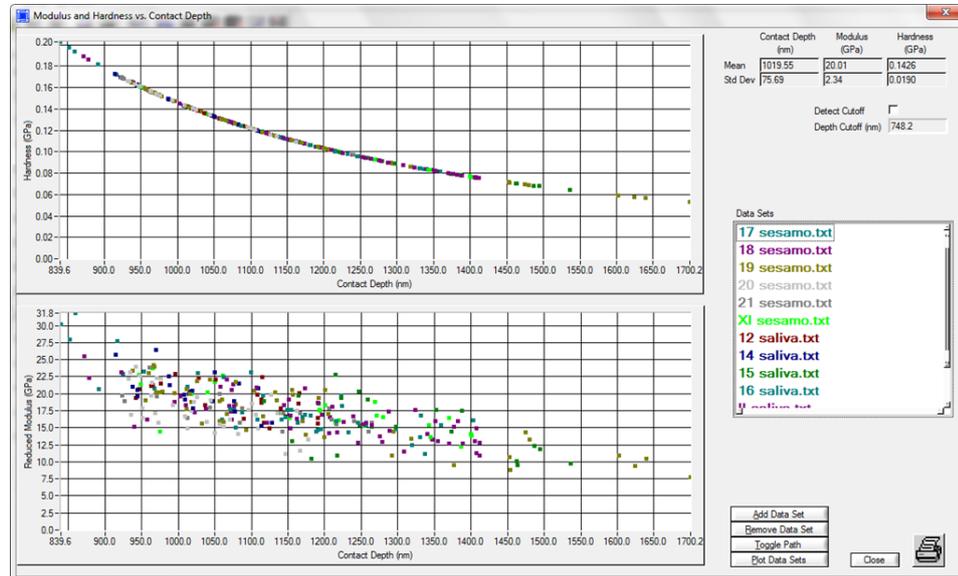


Figura 68. Análisis comparativo del grupo sésamo y saliva artificial

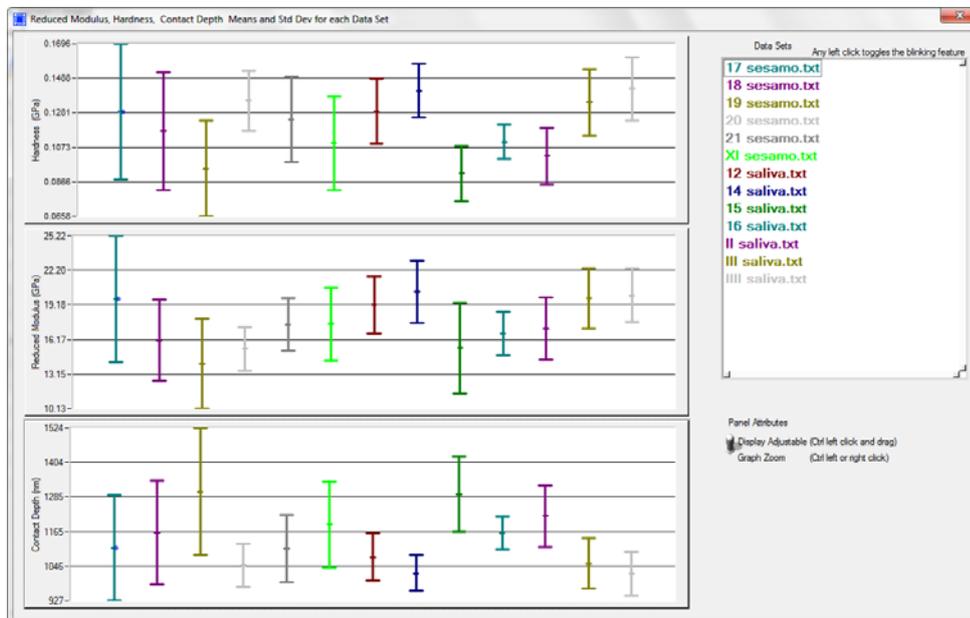


Figura 69. Comparación entre las muestras individuales del grupo sésamo y saliva y su desviación

Resultados del objetivo: *Observar las características morfológicas y topográficas de las lesiones de erosión expuestas a una solución de sésamo en condiciones estáticas, mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y fuerza atómica (AFM).*

La observación al MEB de la superficie libre del esmalte sano evidenció una superficie lisa, con pequeñas porosidades aisladas. Pueden aparecer surcos de escasa profundidad. El contorno de los prismas es poco visible (Figuras 70 y 71). A mayor aumento, en algunas zonas, se pueden distinguir pequeñas depresiones asociadas a la cabeza de los prismas (Figura 72).

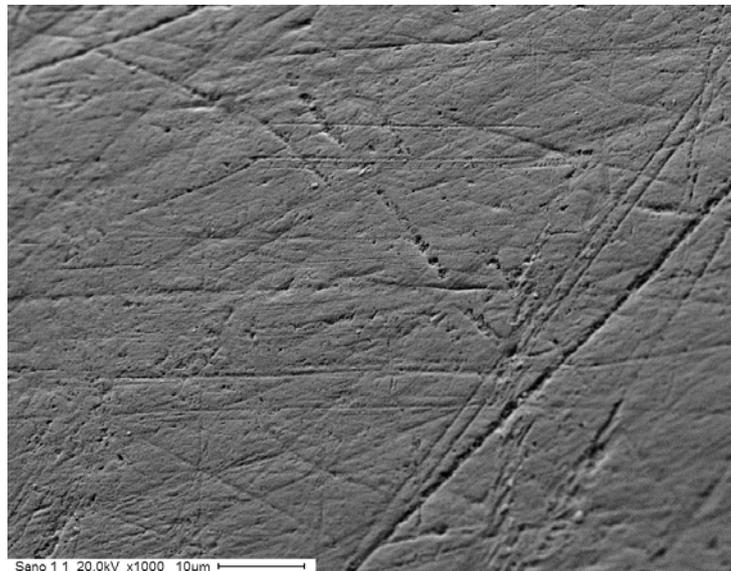


Figura 70. Micrografía del esmalte sano. Superficie intacta del esmalte. Se observan rayas y pequeños poros. MEB x 1000

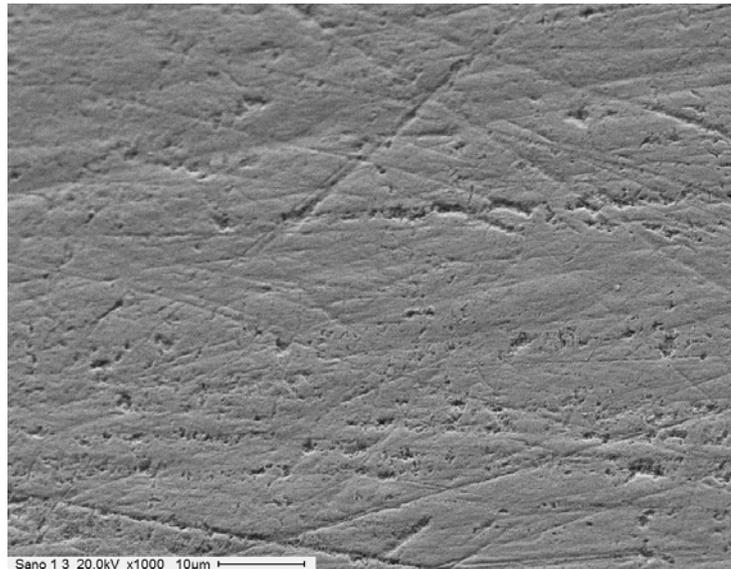


Figura 71. Micrografía del esmalte sano. Otra zona. MEB x 1000

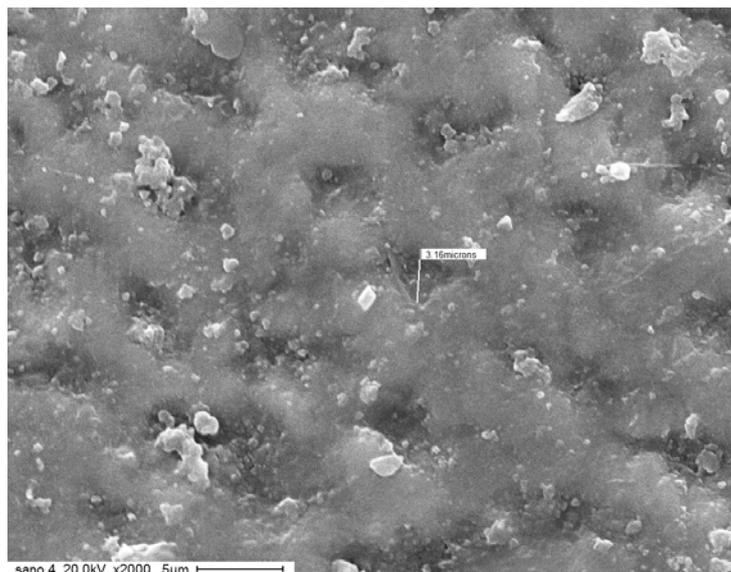


Figura 72. Micrografía de la superficie del esmalte sano. La línea señala el diámetro de un prisma (3,16 μm). MEB x 2000

La superficie del esmalte expuesto 90 minutos a la bebida gaseosa produjo zonas con distintos aspectos. Sólo algunas muestras presentaron una desmineralización irregular de los prismas (Figura 73). En general, se observó un aspecto de “panal de abejas” (Figuras 74 A y 75); cada prisma presentó una forma redondeada o poligonal, con depresiones que afectaron el centro de las varillas, mientras que los contornos permanecieron elevados. Sin embargo, algunas zonas presentaron un patrón de

grabado invertido, es decir, la periferia del prisma apareció afectada mientras que el centro quedó más elevado (Figura 74 *B*). En una misma muestra, se encontraron ambos patrones en distintas zonas. También, en una zona de una muestra, pudo detectarse el esmalte aprismático. En él, los cristales no configuran prismas, por lo que su superficie mostró un aspecto liso y homogéneo. Al carecer de prismas, la acción de los ácidos no reproduce los patrones de grabado conocidos. (Figura 76).

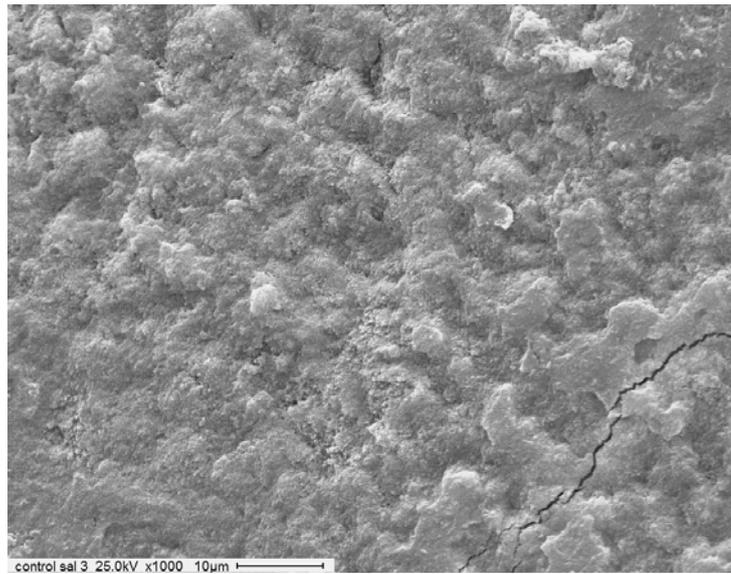


Figura 73. Micrografía del esmalte desmineralizado en un patrón irregular. Muestra del grupo saliva. MEB x 1000

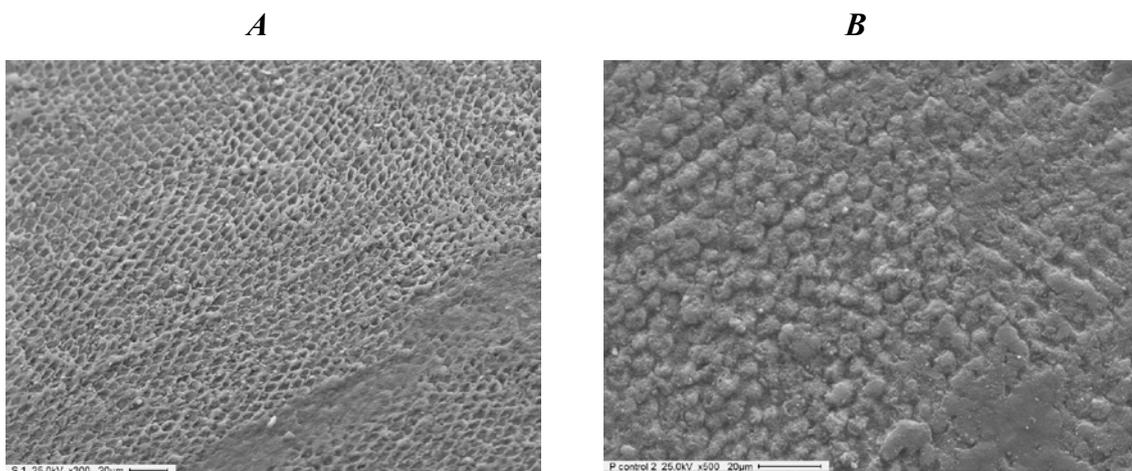


Figura 74. Micrografía del esmalte desmineralizado. *A* Patrón de desmineralización en forma de “panal de abejas”. Está afectado el centro del prisma MEB x 300. *B* La desmineralización afectó la periferia del prisma MEB x 500.

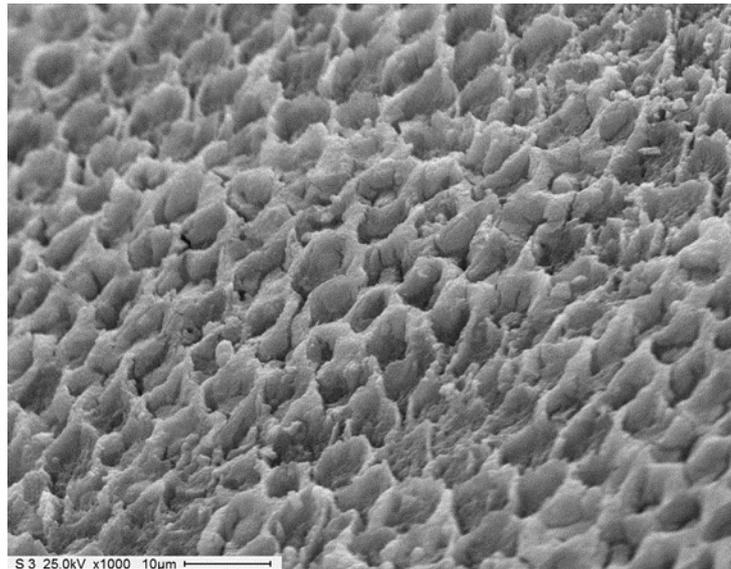


Figura 75. Micrografía del esmalte desmineralizado. Se observa pérdida de mineral en el centro del prisma. MEB x1000

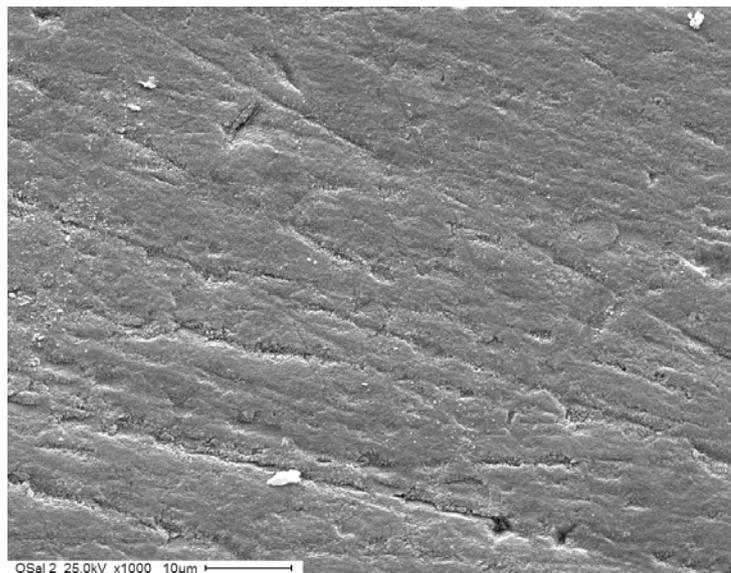


Figura 76. Micrografía del esmalte aprismático. No se observan prismas ni signos de erosión. Muestra del grupo saliva. MEB x1000

El tratamiento de inmersión en la solución de sésamo 24 h provocó una disminución de las depresiones creadas por la desmineralización del prisma. Un material depositado enmascara los contornos de los prismas (Figuras 77 y 78). A mayor magnificación se observaron algunos poros no cubiertos por el depósito (Figuras 79 y 80).

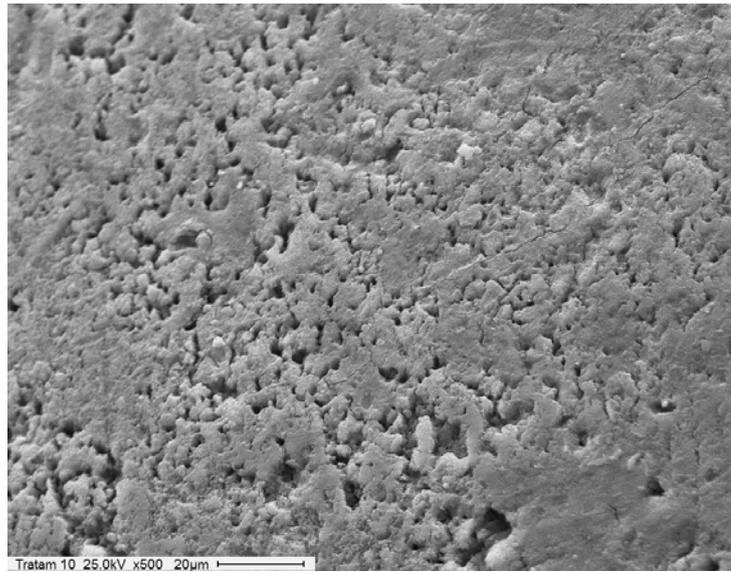


Figura 77. Micrografía del esmalte tratado con sésamo 24 h. Se observa taponamiento de los poros causados por la erosión. MEB x 500

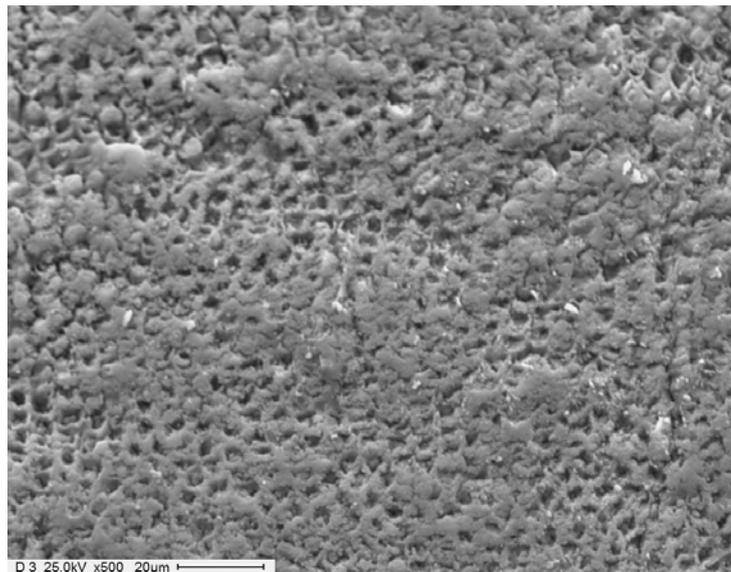


Figura 78. Micrografía del esmalte tratado con sésamo 24 h. MEB x 500

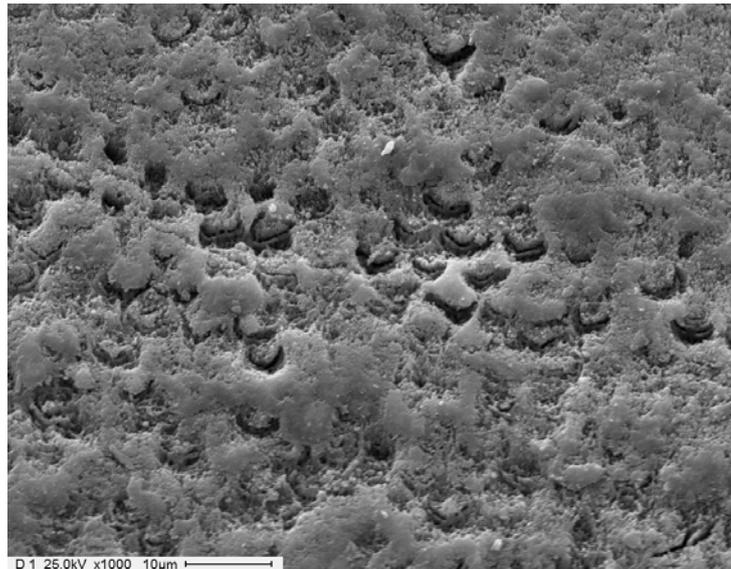


Figura 79. Micrografía del esmalte tratado con sésamo 24 h. MEB x 1000

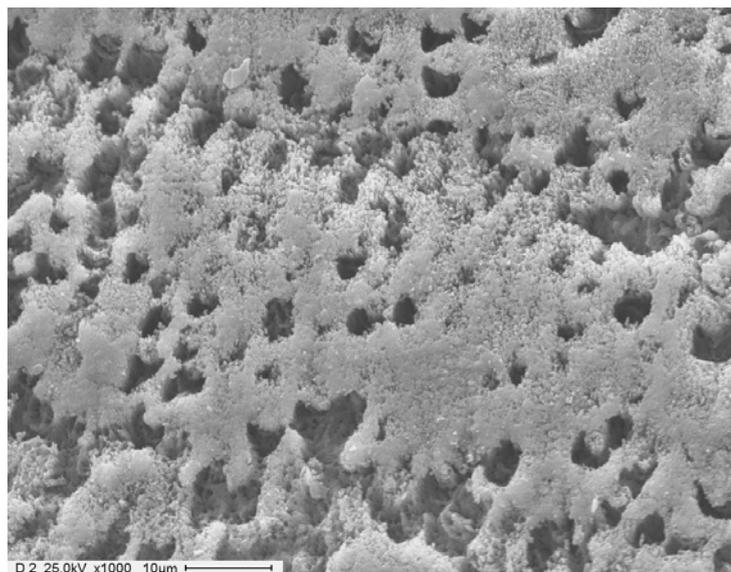


Figura 80. Micrografía del esmalte tratado con sésamo 24 h. El material depositado no es regular y persisten poros profundos. MEB x 1000

Existieron cambios morfológicos en la superficie cuando el esmalte desmineralizado se trató con sésamo. La micrografía electrónica del esmalte erosionado tratado con sésamo solo, a mayor magnificación, mostró la presencia de un material granular fino reconstituyendo las depresiones creadas por la erosión aunque su distribución no fue homogénea (Figura 81).

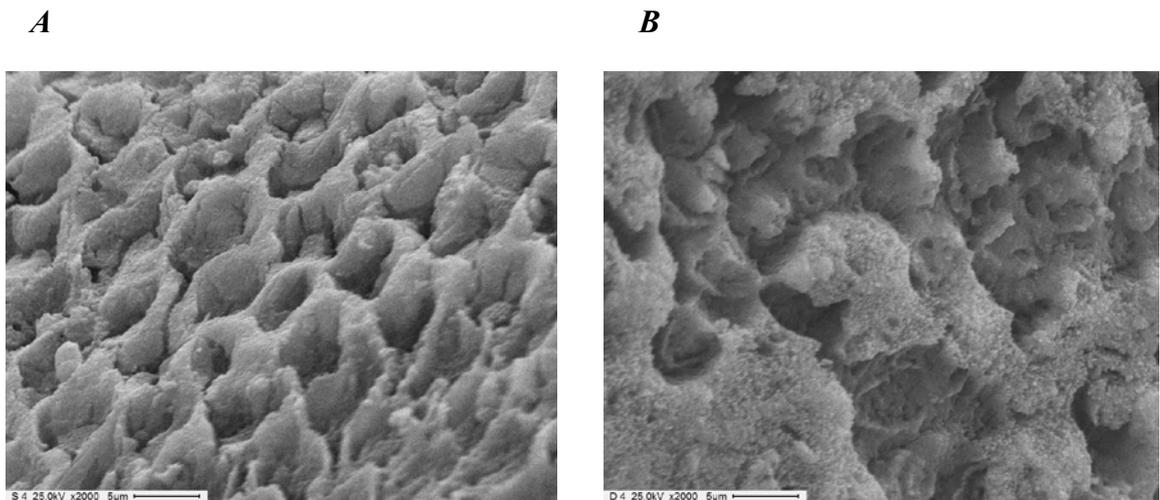


Figura 81. Micrografía del esmalte. *A* Erosionado. *B* Tratado con sésamo 24 h.
MEB X 2000

La saliva artificial provocó también el depósito de una capa delgada de material, de aspecto finamente granular, cubriendo la superficie de los poros; pueden distinguirse los contornos elevados de prismas desmineralizados (Figuras 82 y 83).

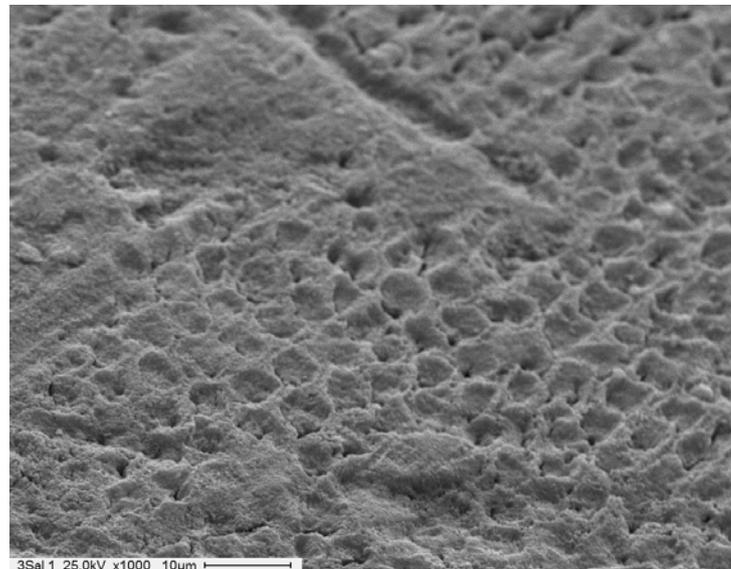


Figura 82. Micrografía del esmalte tratado con saliva artificial 24 h. Se observan los centros deprimidos de los prismas cubiertos por un material fino y homogéneo.
MEB x 1000

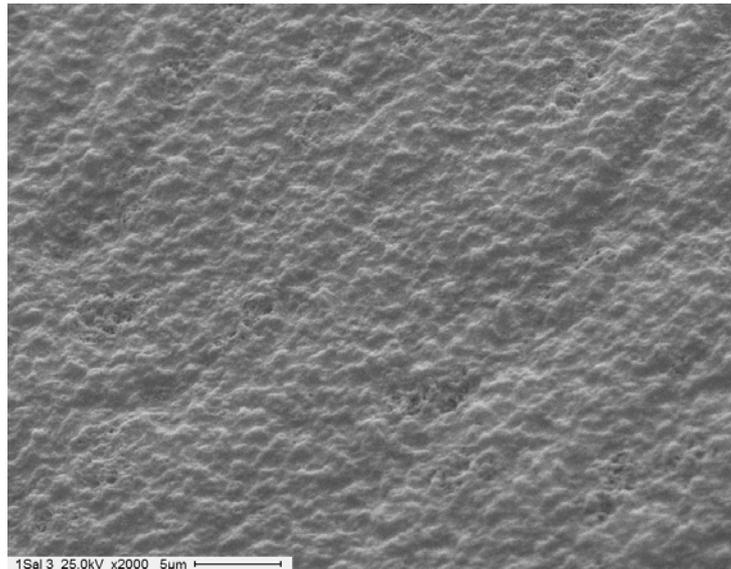


Figura 83. Micrografía del esmalte erosionado tratado con saliva artificial.
MEB x 2000

Se obtuvieron valores de rugosidad superficial mediante AFM, considerando distintas áreas en el esmalte sano y tratado.

Las imágenes correspondientes al área de 20 μm del esmalte sano mostraron pequeñas elevaciones y depresiones en forma lineal (Figuras 84 *A* y *D*). Después de la exposición a la bebida, se observó una topografía irregular donde el centro del prisma aparece deprimido con una marcada diferencia entre la altura máxima y mínima (Figuras 84 *B* y *E*). El tratamiento con sésamo disminuyó la rugosidad con relación al esmalte desmineralizado (Figuras 84 *C*), excepto en el área de 20 μm donde los valores fueron mayores al esmalte desmineralizado y al esmalte tratado con saliva artificial (Cuadro 6).

El esmalte expuesto a la saliva artificial mostró valores de rugosidad menores que el esmalte desmineralizado correspondiente (Cuadro 6). La variación de la rugosidad en esta muestra se observó al AFM (Figura 84 *E* y *F*).

Cuadro 6. Valores de rugosidad para el tratamiento con sésamo

	SANO		DESMINERALIZADO		SALIVA	SÉSAMO
	Diente-1 5 µm	Diente-2 5 µm	Diente-1 5 µm	Diente-2 5 µm	Diente-1 5 µm	Diente-2 5 µm
Rq (nm)	16,78	13,26	69,87	82,9	25,87	30,42
Ra (nm)	13,61	10,74	55,2	65,95	21,07	23,42
Rmax (nm)	105,82	86,63	415	484,5	140,25	219,25
	Diente-1 10 µm	Diente-2 10 µm	Diente-1 10 µm	Diente-2 10 µm	Diente-1 10 µm	Diente-2 10 µm
Rq (nm)	14,29	21,89	165,75	119,325	52,025	95,92
Ra (nm)	11,16	17,69	134	99,7	42,175	73,07
Rmax (nm)	122,01	142,13	913	624,5	300,5	628,75
	Diente-1 20 µm	Diente-2 20 µm	Diente-1 20 µm	Diente-2 20 µm	Diente-1 20 µm	Diente-2 20 µm
Rq (nm)	35,39	40,60	206	202	58,07	271
Ra (nm)	25,21	32,43	170,75	167	46,27	204
Rmax (nm)	247,75	246,30	1102,5	1137,75	392,75	2239

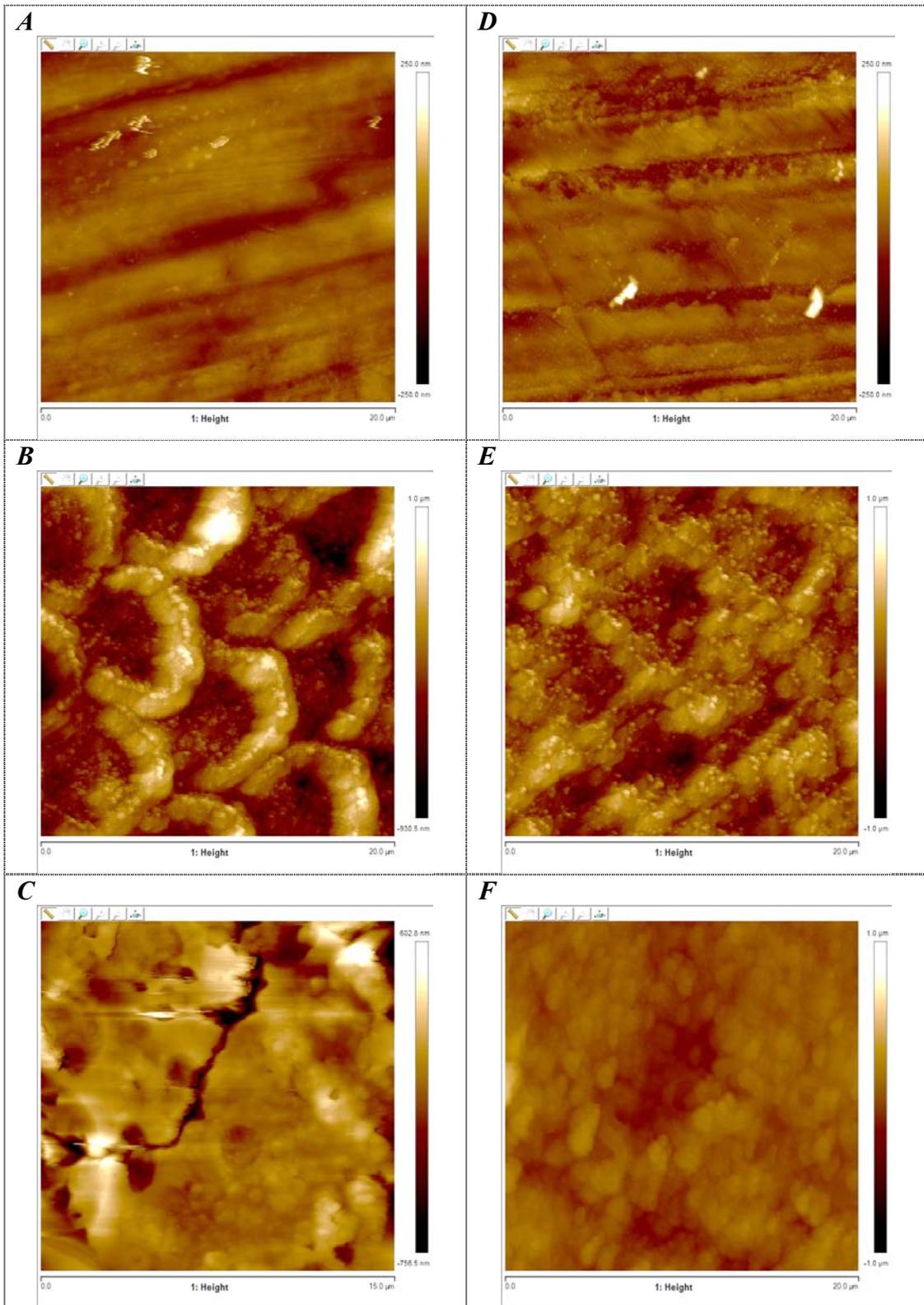


Figura 84. Imágenes de rugosidad superficial mediante AFM. *A* y *D* esmalte sano. *B* y *E* esmalte erosionado. *C* esmalte desmineralizado tratado con sésamo 24 h. *F* esmalte desmineralizado tratado con saliva 24 h. *A*, *B* y *C* diente tratado con sésamo. *D*, *E* y *F* diente tratado con saliva artificial

Surgió un inconveniente con la punta del microscopio de AFM al realizar la exploración de la muestra tratada con sésamo por lo que hubo que cambiar el modo continuo (tapping) por un modo contacto.

La proyección 3D de rugosidad obtenida el esmalte sano para el área de $5\ \mu\text{m}$ de la muestra tratada con sésamo 24 h, evidenció una superficie con irregularidades de escasa profundidad (Figura 85 *A*). Las intensidades entre picos y valles se acentúan cuando el esmalte fue erosionado por la bebida (Figura 85 *B*). Después de 24 h de inmersión en la solución de sésamo, la rugosidad disminuyó aunque resultó mayor que en el esmalte sano. La superficie del esmalte presentó aspecto de grumos (Figura 85 *C*).

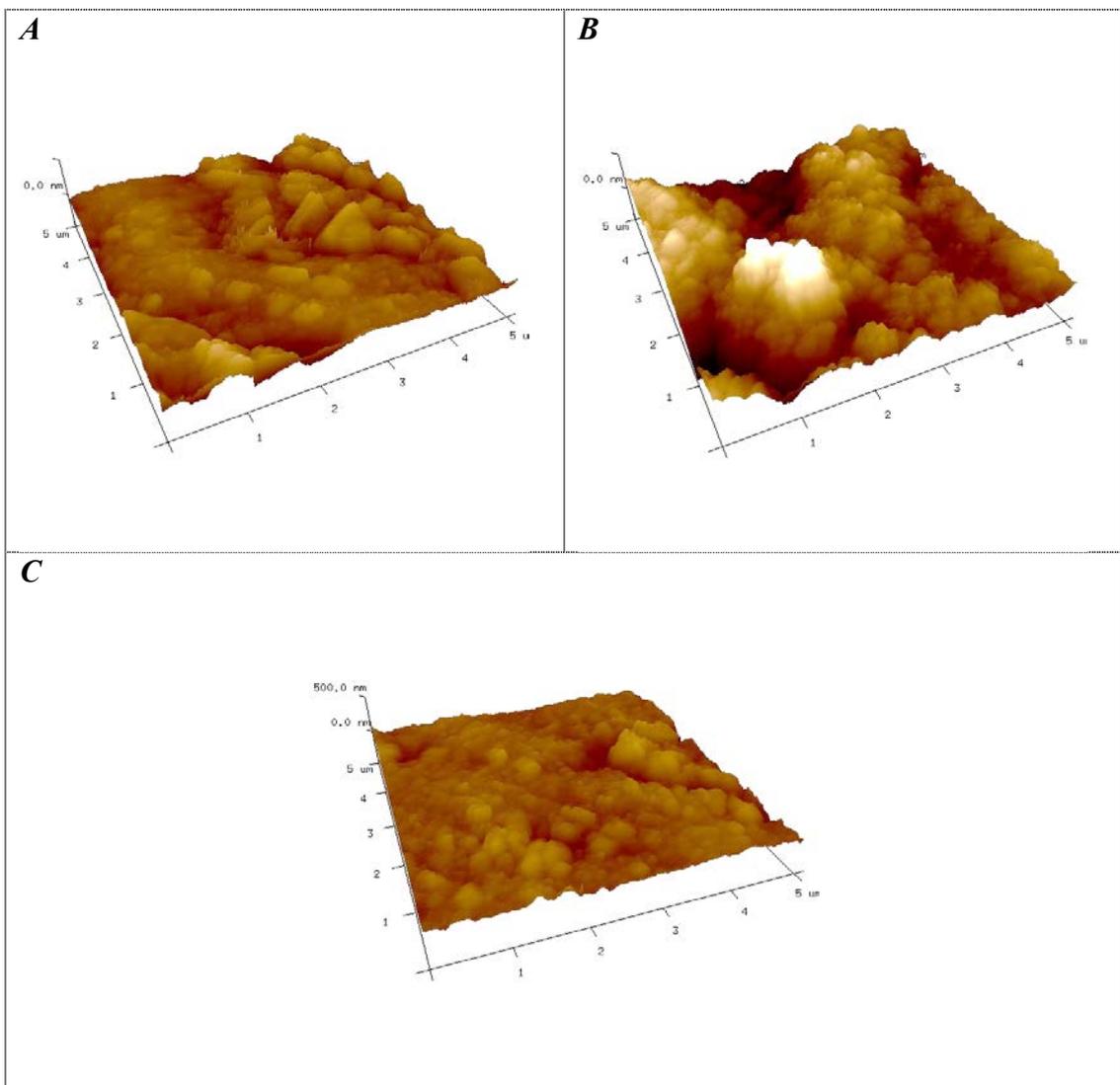


Figura 85. Proyección 3D al AFM. *A* esmalte sano. *B* esmalte erosionado. *C* esmalte tratado con sésamo 24 h

Resultados para el objetivo: *Analizar cuali y cuantitativamente la variación de los bioelementos calcio, fósforo y nitrógeno de las lesiones de erosión, expuestas a una solución de sésamo en condiciones estáticas, mediante espectrometría de energía dispersa (EDS) y espectrometría de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)*

Se determinaron los porcentajes relativos en peso% (wt%) de los elementos Ca y P en las muestras saliva y sésamo, en sus mitades desmineralizadas y en el grupo control sano. Se observó que el calcio disminuyó en el esmalte erosionado.

El valor medio de la relación Ca/P para el esmalte sano fue de $1,76 \pm 0,13$; para el esmalte tratado con sésamo 24 h fue $1,67 \pm 0,12$; para el esmalte desmineralizado del grupo sésamo fue $1,59 \pm 0,09$; para el esmalte tratado con saliva fue $1,54 \pm 0,08$ y el esmalte desmineralizado del grupo saliva $1,59 \pm 0,02$ (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis elemental de calcio, fósforo y su relación en el esmalte tratado con saliva y con sésamo

	SANO	SESAMO	DESMIN. SESAMO	SALIVA	DESMIN. SALIVA	Peso%
Ca	62,81±2,18	62,54±1,76	61,56±0,45	60,72±1,27	61,48±0,4	%
P	37,13±2,18	37,45±1,76	38,43±0,45	39,27±1,27	38,51±0,4	%
Ca/P	1,76±0,13	1,67±0,12	1,59±0,09	1,54±0,08	1,59±0,02	

En el gráfico de barra se observa que el esmalte tratado con sésamo presenta una recuperación de la relación Ca/P, en cambio, el tratado con saliva artificial fue el que presentó la menor relación (Figura 86).

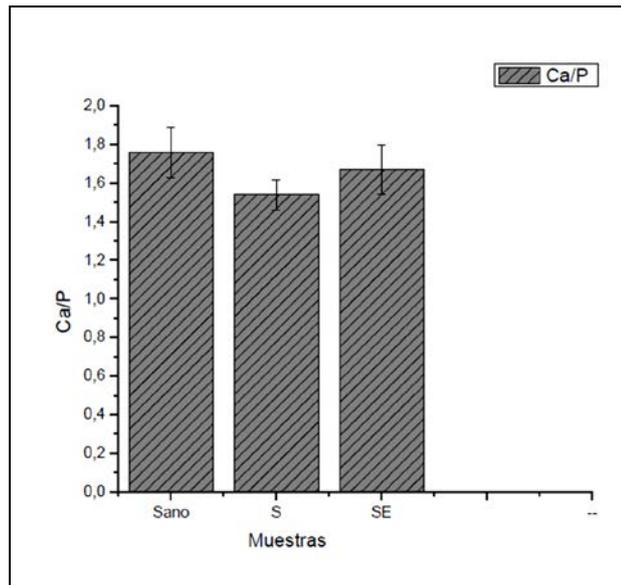


Figura 86. Relación Ca/P en el esmalte sano, tratado con saliva y tratado con sésamo
S: grupo saliva artificial; SE: grupo sésamo.

Se encontró diferencia significativa entre el grupo Sano/Saliva y Sésamo/Saliva. No se encontró diferencia entre el grupo Sano/Sésamo ($p > 0,05$) (Tabla 10).

El gráfico representativo de los valores Media, Desviación y Error confirma la recuperación de la relación Ca/P en las muestras tratadas con sésamo (Figura 87).

Tabla 10. Relación Ca/P de los grupos sano, saliva y sésamo

Ca/P	Número de medidas	Media	DE	EE de la Media
Sano	18	1,76 (1)	0,13	0,03
Saliva artificial	12	1,54 (0)	0,08	0,02
Sésamo	11	1,67 (1)	0,12	0,03

Los números distintos indican que la diferencia es significativa ($p < 0,05$)

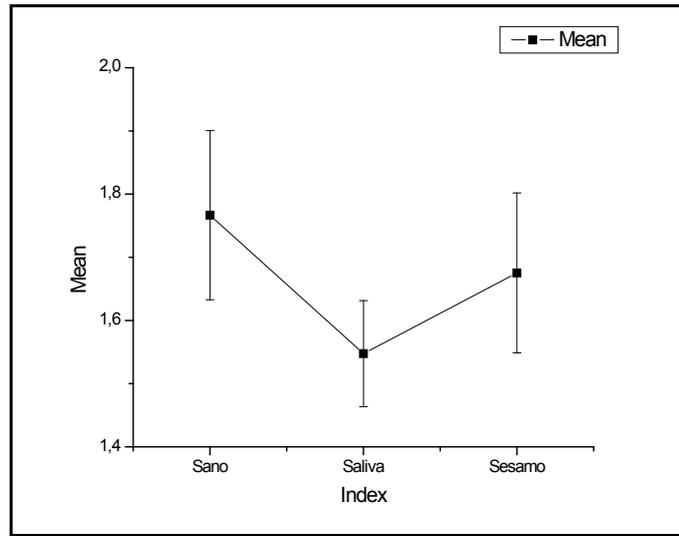


Figura 87. Representación gráfica de la Media Ca/P (desviación y error)

El espectro EDS representativo del esmalte sano mostró picos Ca y P por ser los elementos constitutivos más abundantes (Figura 88).

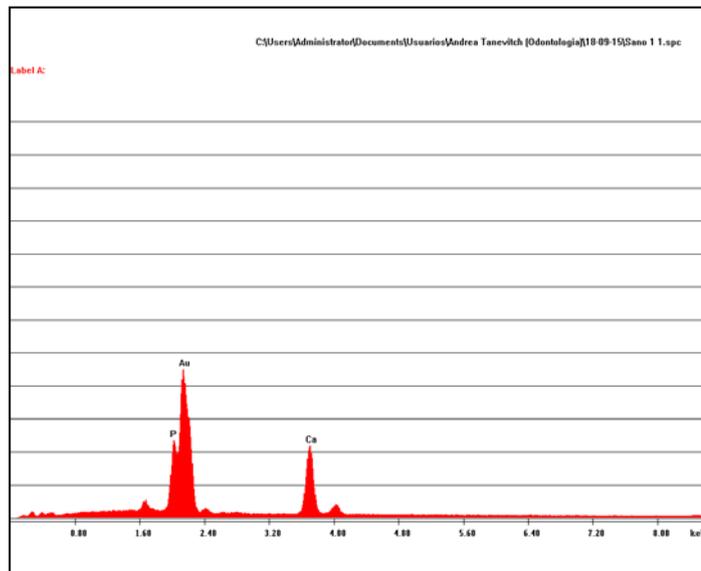


Figura 88. Espectro EDS representativo del esmalte sano

El EDS representativo del grupo tratado con sésamo 24 h mostró un pico de calcio más pronunciado que el fósforo (Figura 89).

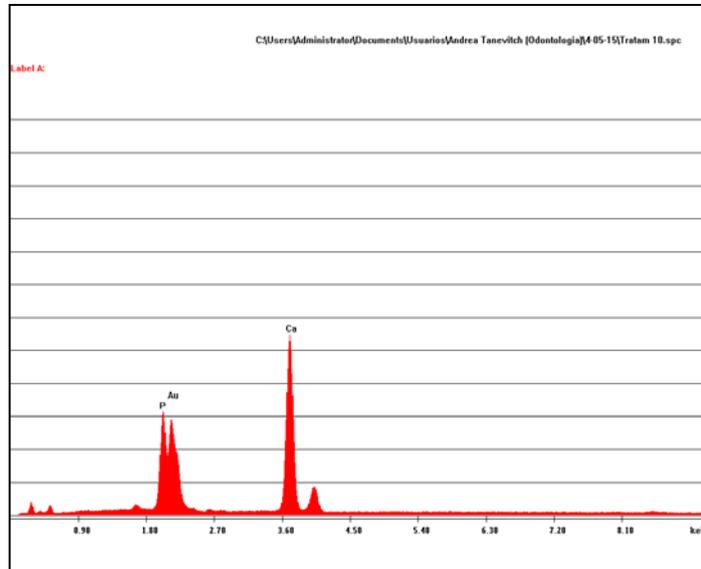


Figura 89. EDS del esmalte tratado con sésamo 24 h

El EDS representativo del grupo tratado con saliva 24 h también presentó un pico mayor de calcio pero la relación Ca/P fue menor que en el esmalte sano y en el tratado con sésamo 24 h (Figura 90).

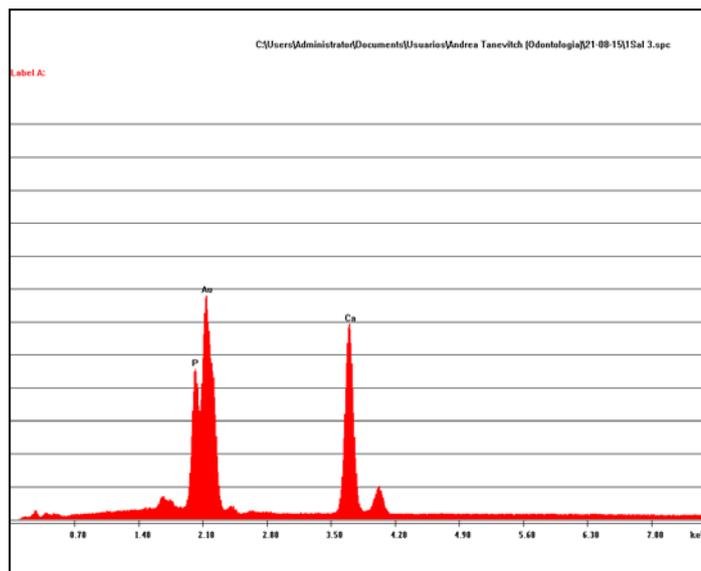
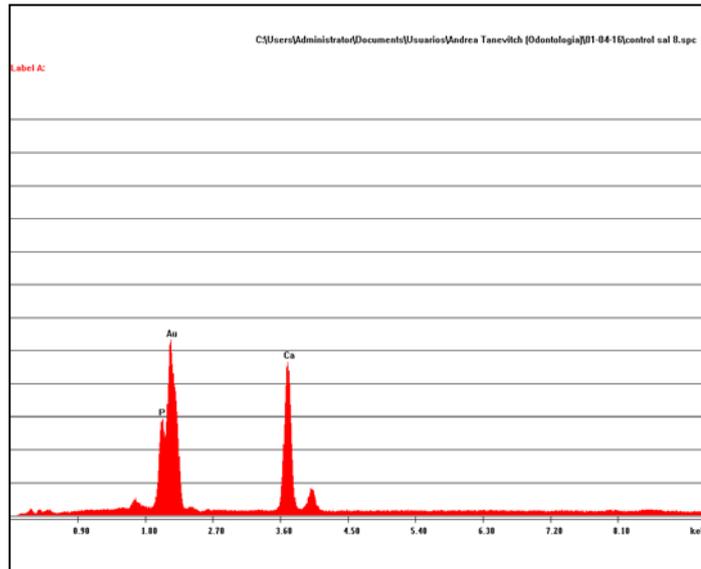


Figura 90. EDS del grupo saliva artificial

Una muestra desmineralizada del grupo saliva (M4) presentó esmalte aprismático. La relación Ca/P en esta zona fue 1,96; valores mayores a los determinados para el esmalte desmineralizado y sano. El esmalte aprismático se caracteriza por una orientación regular de los cristales de hidroxiapatita que no constituyen prismas y resulta más resistente al ataque ácido (Figura 91).

A



B

```

C:\Users\Administrator\Documents\Usuarios\Andrea Tanevitch
(Odontologia)\01-04-16\control sal 8.spc
Label :
Acquisition Time : 14:09:58      Date: 1-Apr-2016

kV : 25.00  Tilt: 0.00  Take-off:16.50  AmpT : 6.40
Detector Type: SDD Apollo X      Resolution:126.55  Lsec 40

EDAX ZAF Quantification (Standardless)
Element Normalized
SEC Table : Default

```

Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
P K	33.70	39.68	0.2283	0.9916	0.6737	1.0138
CaK	66.30	60.32	0.5216	1.0027	0.7847	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Bkgd Inte.	Inte. Error	P/B
P K	513.40	50.17	0.76	10.23
CaK	967.55	33.55	0.53	28.84

Figura 91. EDS del esmalte aprismático. *A* Espectro. *B* Semicuantificación

Se realizaron los espectros mediante XPS y la cuantificación átomo% del C, O, Ca, P, N, Zn, Na, F y S de la superficie del esmalte sano, erosionado y tratado con la

solución de sésamo 24 h o con saliva artificial. La relación Ca/P fue para el esmalte sano 1,41; desmineralizado 1,25; sésamo 0,99; saliva 1,33. El Ca y P disminuyeron en el esmalte tratado con sésamo, mientras que el N y C aumentaron en relación al sano, al desmineralizado y al tratado con saliva (Tabla 11). Además se observó una disminución relativa del oxígeno, flúor y sodio. La semilla de sésamo no es rica en sodio. El S presente en estas muestras no experimentó modificaciones.

Tabla 11. Cuantificación de elementos del tratamiento de sésamo 24 h mediante XPS

	Átomos %			
	Esmalte sano	Esmalte erosionado	Esmalte Tratado con sésamo	Esmalte Tratado con saliva
C	53.4 ± 0.3	32.3 ± 0.3	63.8 ± 0.1	46.36 ± 0.09
O	33.4 ± 0.4	42.4 ± .2	23.9 ± 0.1	41.03 ± 0.08
Ca	5.98 ± 0.05	12.8 ± 0.2	1.90 ± 0.04	6.06 ± 0.02
P	4.22 ± 0.06	10.18 ± 0.08	1.92 ± 0.04	4.53 ± 0.03
Zn	0.21 ± 0.03	0.43 ± 0.04	----	0.20 ± 0.02
N	1.74 ± 0.06	0.75 ± 0.07	7.99 ± 0.06	0.70 ± 0.03
Na	0.45 ± 0.03	0.56 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.32 ± 0.01
F	0.22 ± 0.03	0.58 ± 0.04	----	0.45 ± 0.02
S	0.39 ± 0.04	No se midió	0.34 ± 0.3	0.35 ± 0.08

En el espectro total por XPS del esmalte sano aparecen picos para el carbono, calcio, fósforo y oxígeno y en menor proporción sodio, zinc, nitrógeno y flúor (Figura 92). El espectro correspondiente a cada elemento presente en el esmalte sano está representado en la Figura 93.

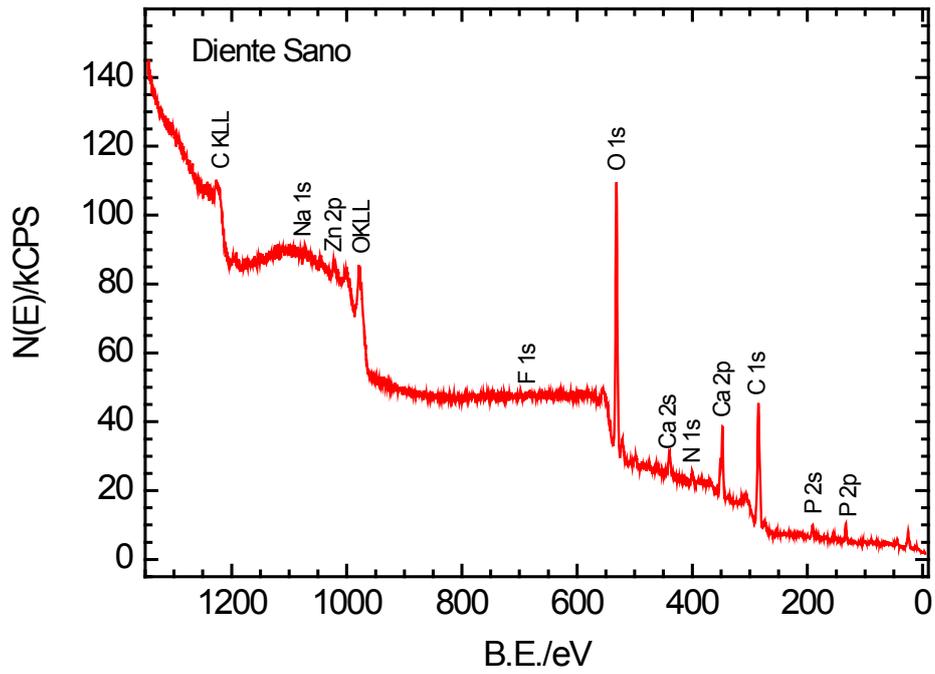


Figura 92. Espectro total por XPS del esmalte sano. C: carbono; Na: sodio; Zn: zinc; O: oxígeno; F: flúor; Ca: calcio; N: nitrógeno; P: fósforo

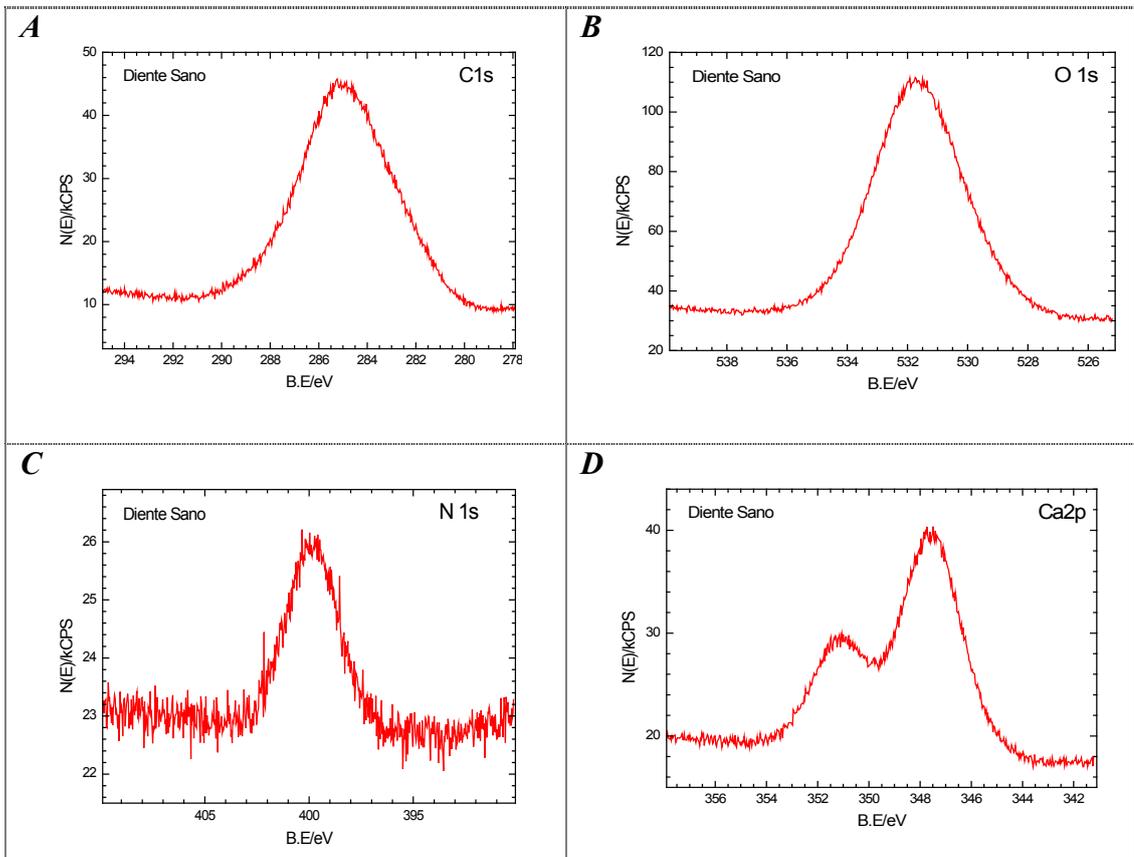


Figura 93. XPS del esmalte sano. **A** Espectro del carbono. **B** espectro del oxígeno. **C** espectro del nitrógeno. **D** espectro del calcio

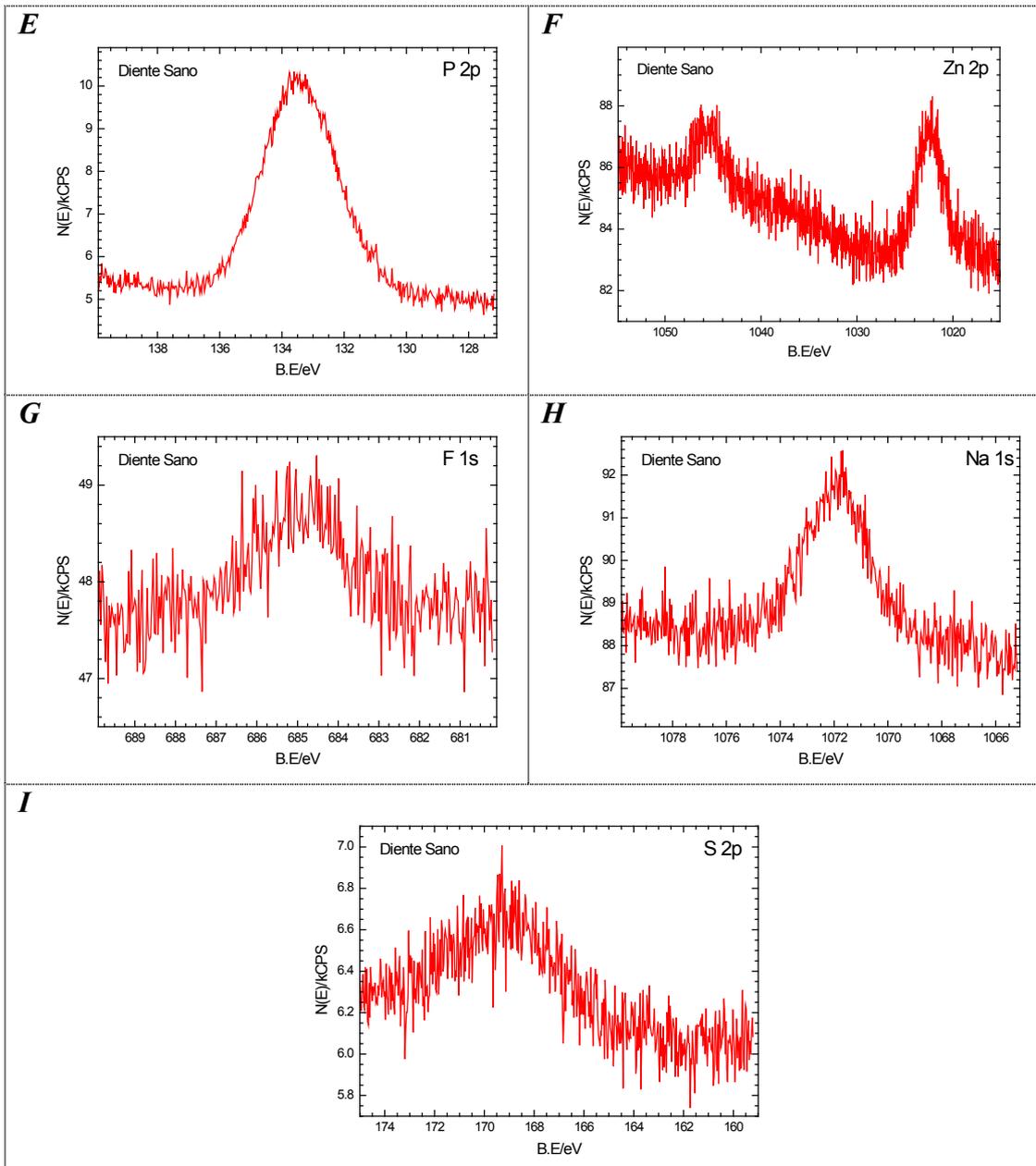


Figura 93 (continuación). *E* espectro del fósforo. *F* espectro del zinc. *G* espectro del flúor. *H* espectro del sodio. *I* espectro del azufre.

Después del tratamiento con la bebida se observaron los mismos elementos presentes en el esmalte sano excepto que no se registró el azufre (Figura 94). Se detectó un aumento del oxígeno y del zinc y una disminución del nitrógeno, y del carbono. Los espectros individuales del C, O, N, Ca, P, Zn, F y Na se representan en la Figura 95.

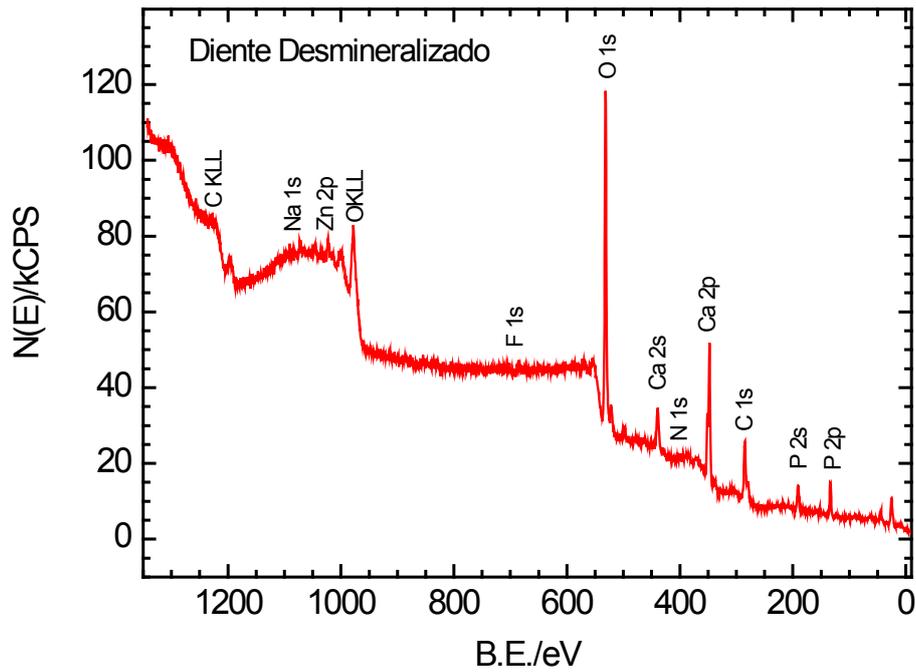


Figura 94: Espectro total por XPS del esmalte erosionado por la bebida. C: carbono; Na: sodio; Zn: zinc; O: oxígeno; F: flúor; Ca: calcio; N: nitrógeno; P: fósforo

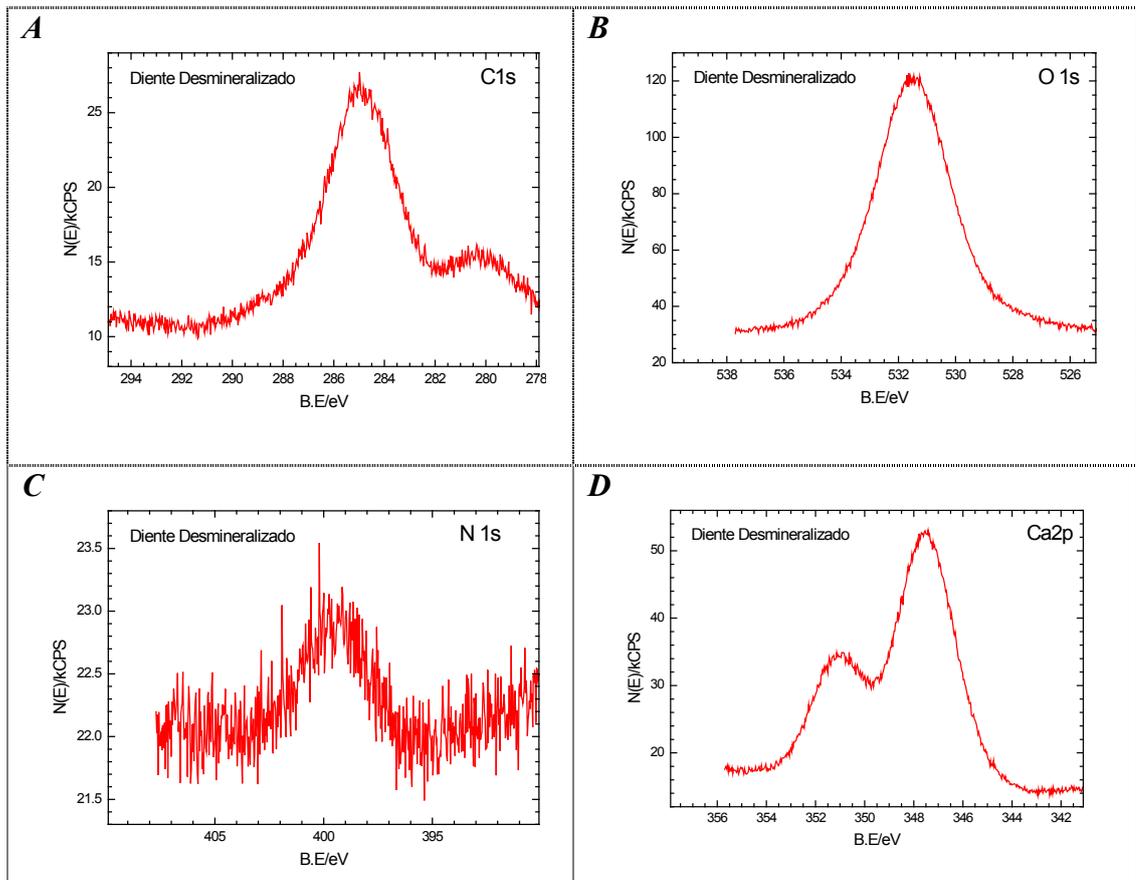


Figura 95. XPS del esmalte erosionado. **A** espectro del carbono. **B** espectro del oxígeno. **C** espectro del nitrógeno. **D** espectro del calcio.

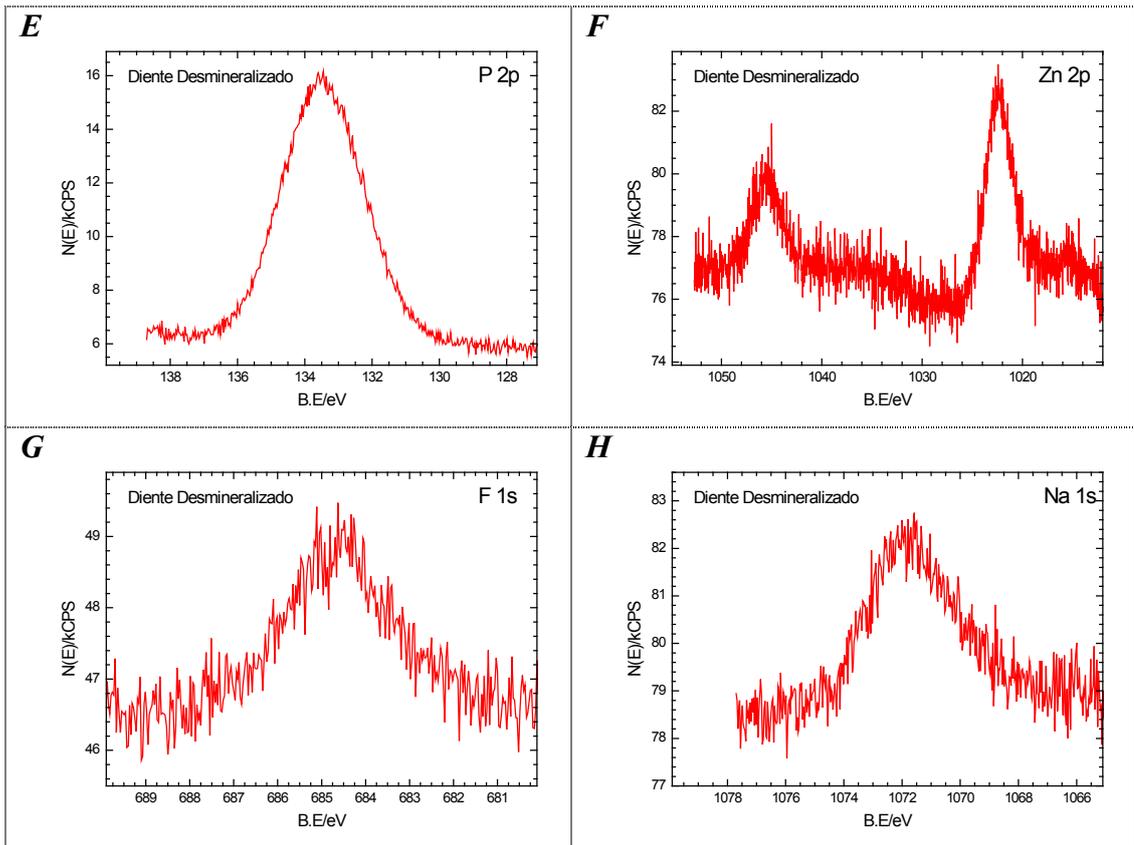


Figura 95 (continuación). **E** espectro del fósforo **F** espectro del zinc. **G** espectro del flúor. **H** espectro del sodio

En el XPS del esmalte tratado con la solución de sésamo durante 24 h se encontró un aumento en los picos de carbono y nitrógeno mientras que descendieron el calcio y el fósforo con relación al esmalte erosionado. El espectro total por XPS del esmalte tratado con sésamo se representa en la Figura 96 y el correspondiente a cada elemento en la Figura 97. Se pudo observar una disminución del oxígeno, zinc, flúor y sodio (Figura 97 B, F, G y H).

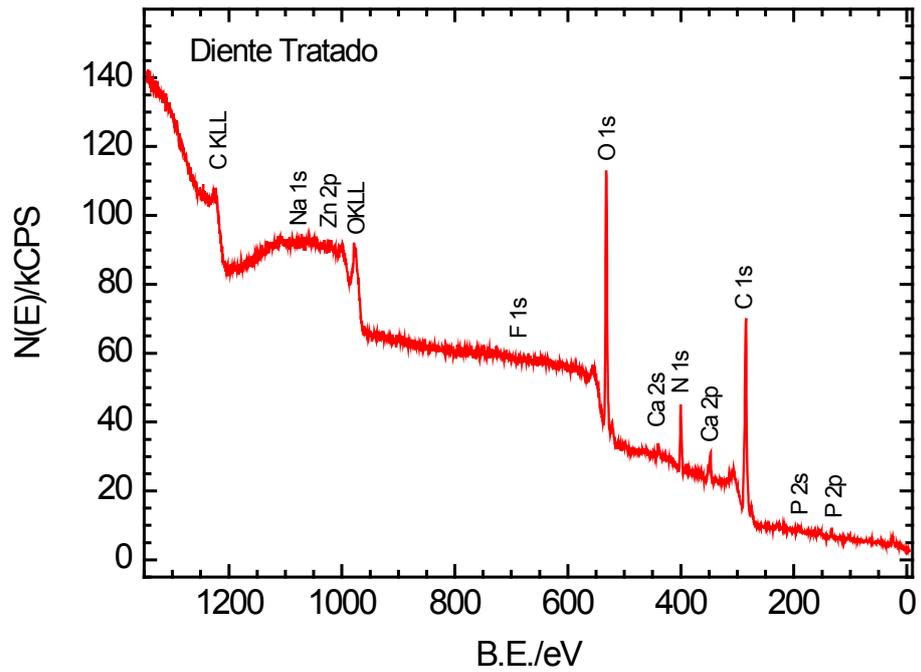


Figura 96. Espectro total por XPS del esmalte tratado con sésamo 24 h.

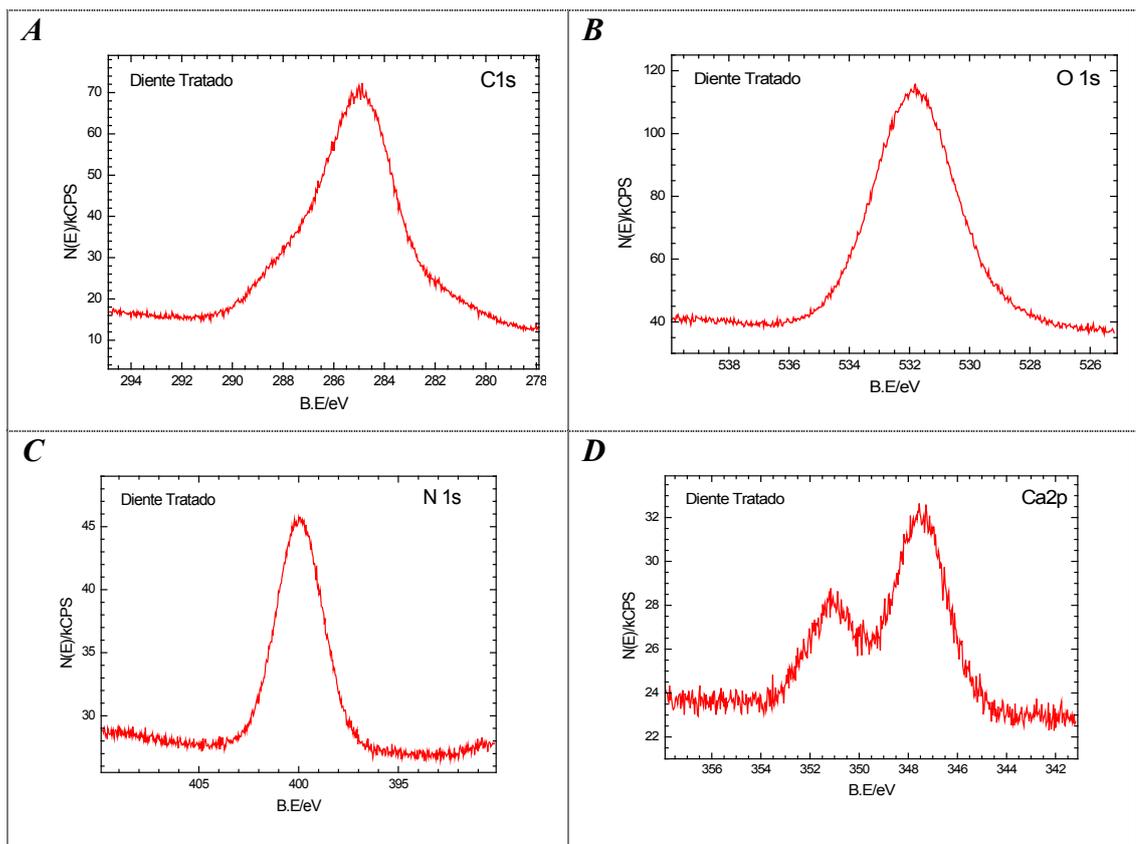


Figura 97. XPS del esmalte erosionado. **A** espectro del carbono. **B** espectro del oxígeno. **C** espectro del nitrógeno. **D** espectro del calcio.

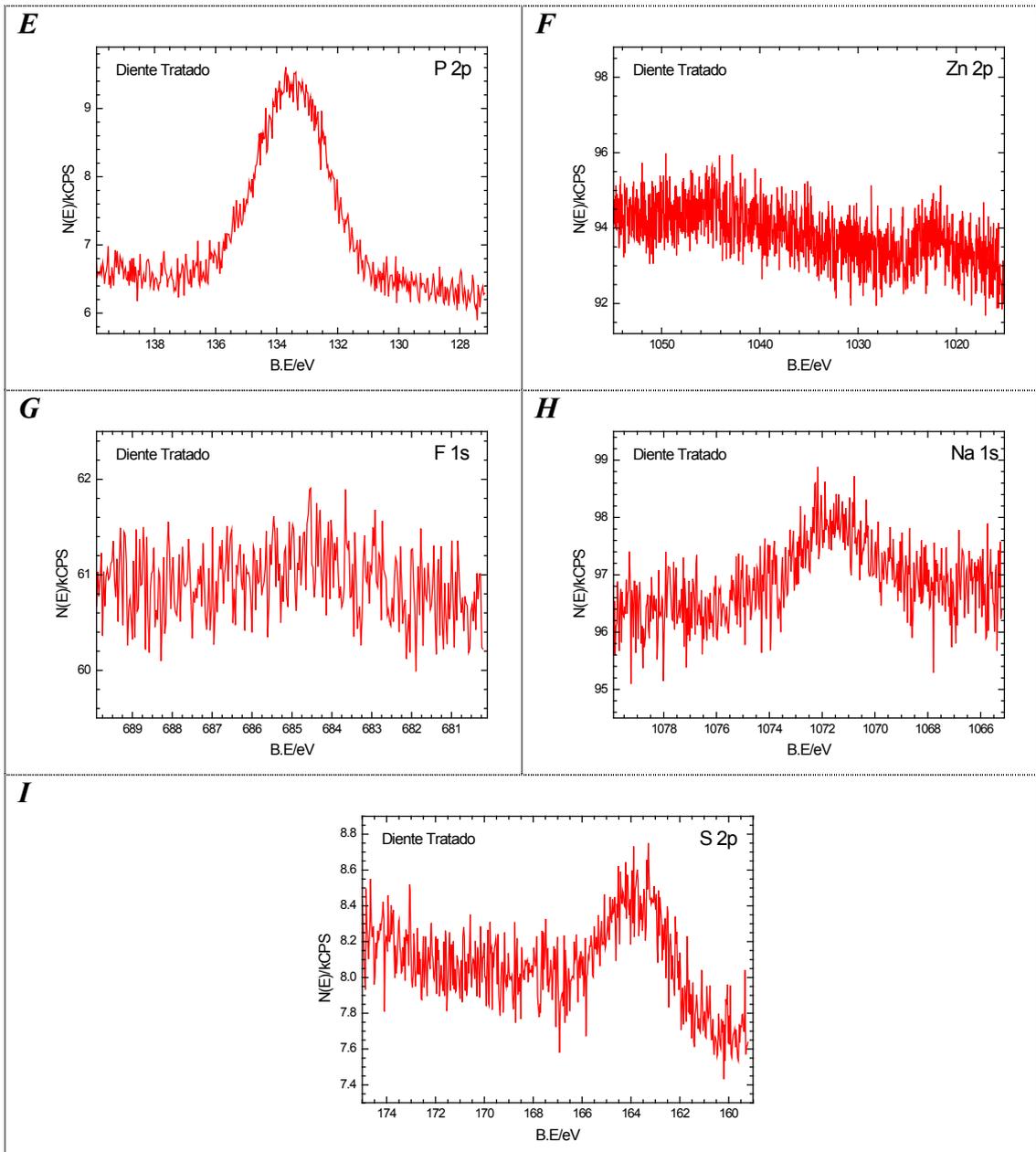


Figura 97 (continuación). **E** espectro del fósforo. **F** espectro del zinc. **G** espectro del flúor. **H** espectro del sodio. **I** espectro del azufre.

El esmalte tratado con saliva artificial durante 24 h, analizado mediante XPS, mostró picos pronunciados de calcio y fósforo, carbono, oxígeno y azufre, mientras que los picos de zinc y sodio disminuyeron en relación al esmalte erosionado (Figura 98). El nitrógeno no varió en relación a la erosión. El espectro por XPS correspondiente a cada elemento en la Figura 99.

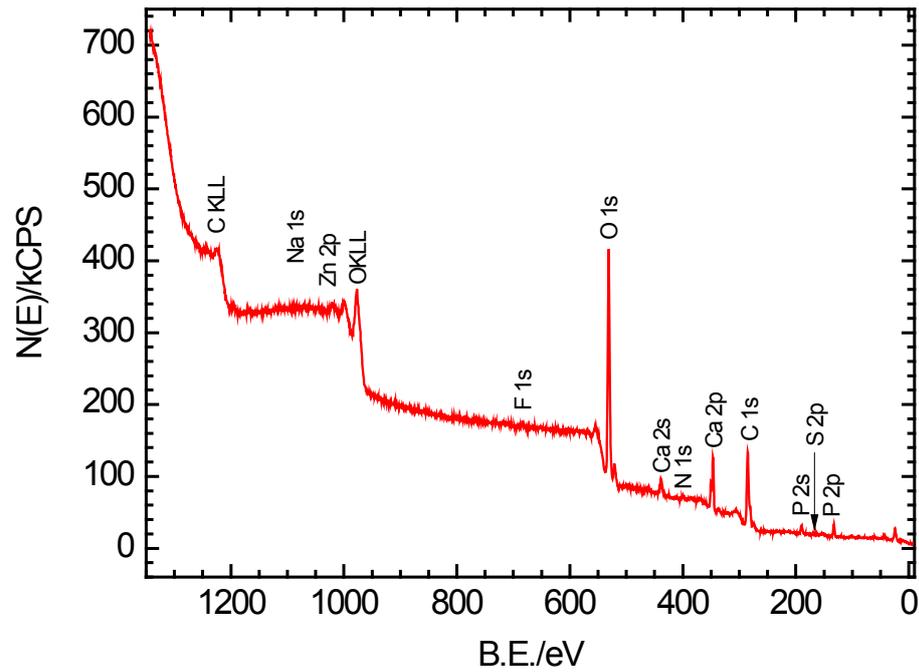


Figura 98. Espectro total por XPS del esmalte tratado con saliva artificial 24 h. C: carbono; Na: sodio; Zn: zinc; O: oxígeno; F: flúor; Ca: calcio; N: nitrógeno; P: fósforo

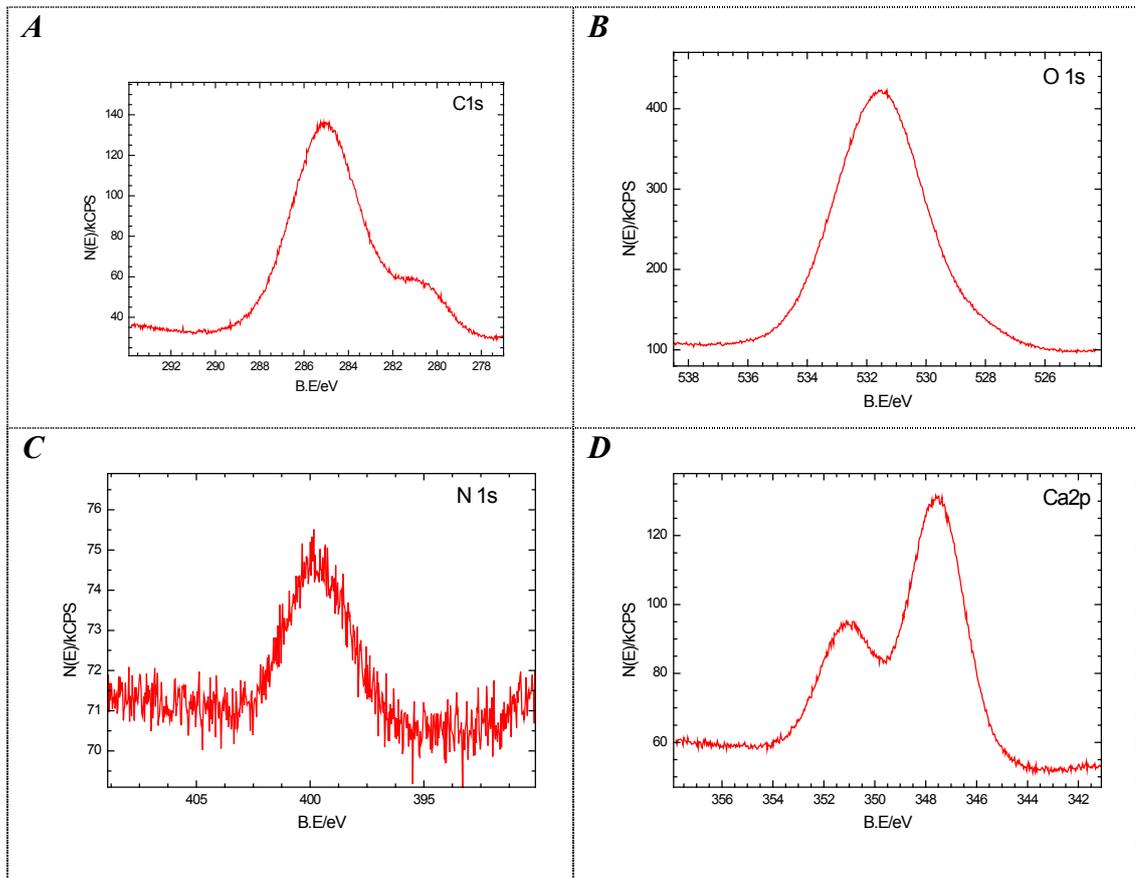


Figura 99. XPS del esmalte tratado con saliva artificial 24 h. **A** espectro del carbono. **B** espectro del oxígeno. **C** espectro del nitrógeno. **D** espectro del calcio

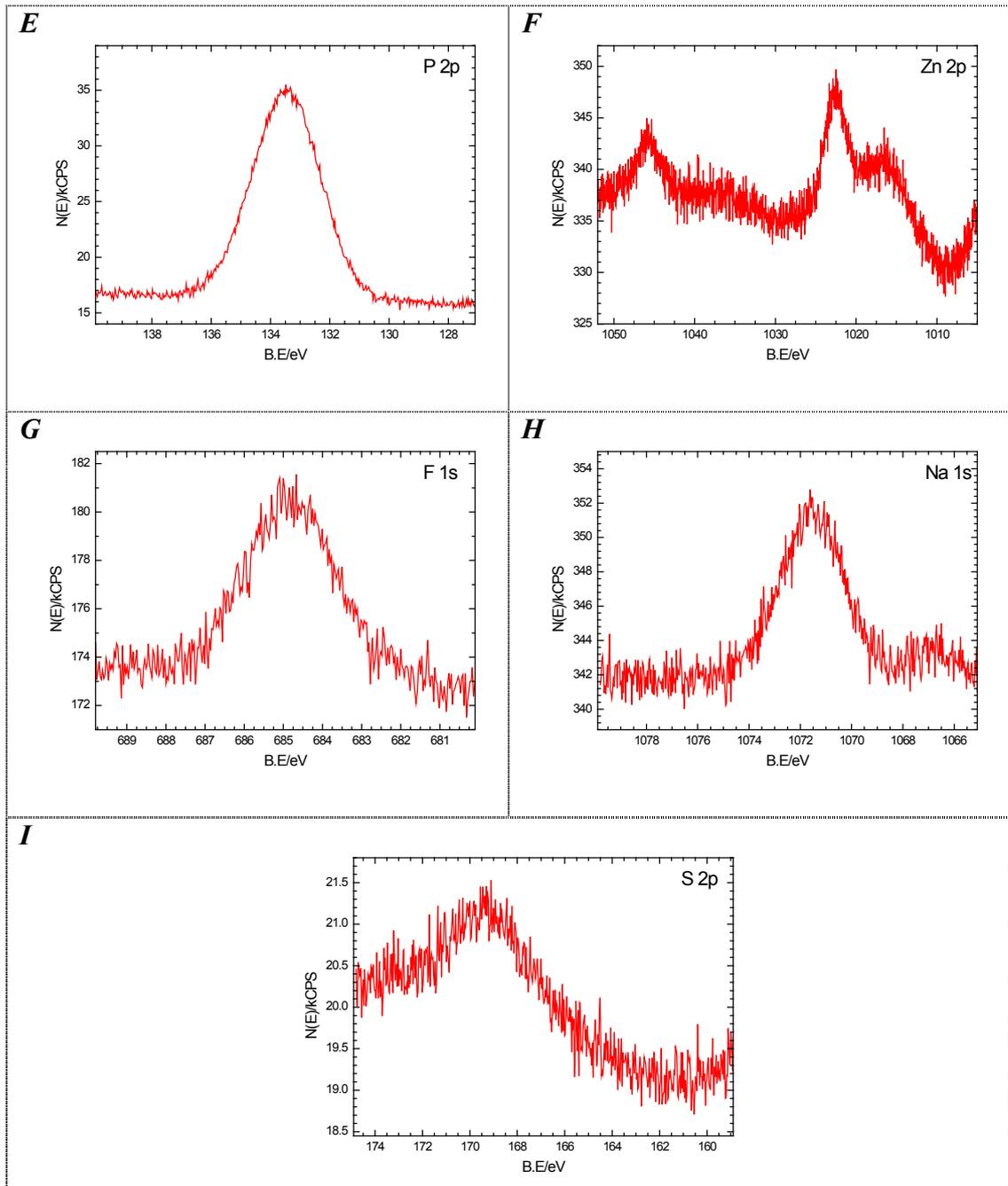


Figura 99 (continuación). **E** espectro del fósforo. **F** espectro del zinc. **G** espectro del flúor. **H** espectro del sodio. **I** espectro del azufre.

Se realizó la comparación entre las muestras tratadas con régimen ciclado y estático mediante la representación gráfica de los elementos determinados en el esmalte sano, desmineralizado y tratado con sésamo (Figura 100) y los valores obtenidos del cociente Sésamo/Sano para el C, O, N, Ca y P se expresan en la Tabla 12.

El C y N aumentan, los otros disminuyen. Por lo tanto C y N tienen que “pegarse” a la superficie del diente. Se determinó una mayor proporción de calcio en el régimen estático. La relación Ca/N entre sano y tratado independientemente del método es semejante, siendo los valores de 0,04 para el régimen ciclado y 0,07 para el estático y la relación Ca/C resultó mayor en el régimen estático siendo de 0,27 mientras que en el ciclado fue de 0,11. Posiblemente las cadenas carbonadas de los componentes de la saliva artificial contribuyeron al aumento del carbono superficial.

La profundidad del análisis de XPS es de 5 nm (50 Ångström) por lo que, al tratar el diente, no se observa el diente en sí, sino una capa de “sésamo” que se deposita encima, por eso aumenta C y N (proteínas) y disminuye el resto (comparando con el sano).

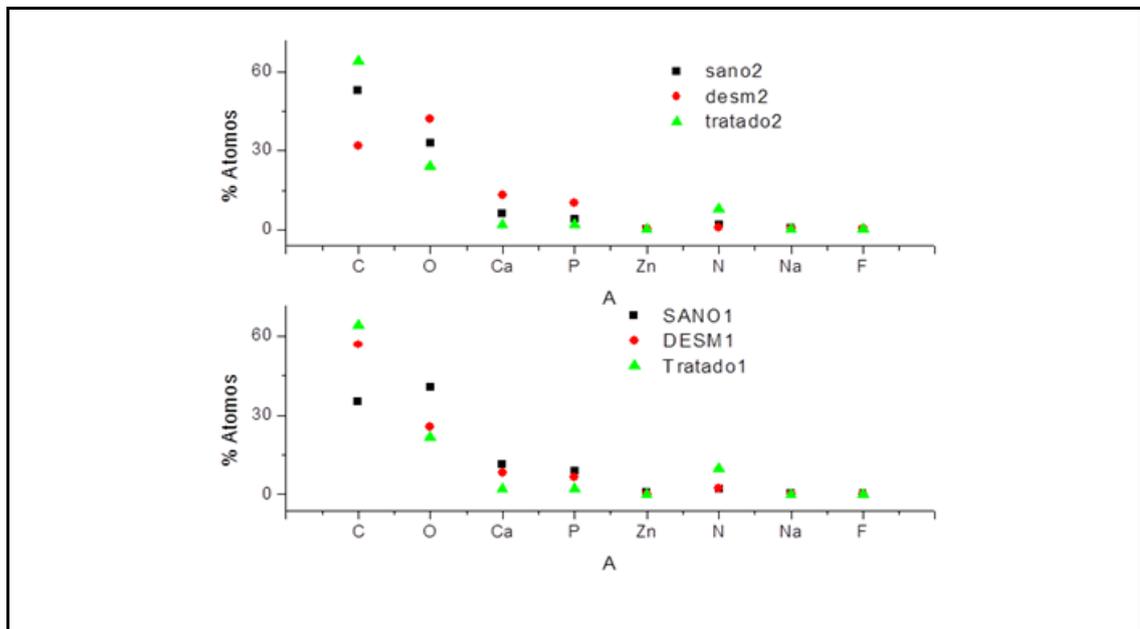


Figura 100. Comparación del tratamiento de sésamo con dos regímenes
1: Sésamo ciclado en saliva artificial. 2: Sésamo 24 h

Tabla 12. Relación entre muestra sana y tratada con sésamo mediante dos regímenes (% átomo tratado/ % átomo sano)

	1. Régimen ciclado	2. Régimen estático
C	1,82	1,18
N	4,9	4,6
O	0,51	0,72
Ca	0,21	0,33
P	0,26	0,48

Resultados del objetivo: Interpretar las variaciones de la estructura química de las lesiones de erosión expuestas a una solución de sésamo en condiciones estáticas, mediante difracción de *r*-X (DRX) y espectrometría infrarroja (FTIR).

En la espectrometría infrarroja se observó una banda a 1084 cm^{-1} asociada a los grupos fosfatos en el esmalte sano. Luego de la desmineralización se detectó la presencia de bandas entre 1350 y 1560 cm^{-1} asignadas a diferentes grupos carbonato/carboxilatos (Figura 101). Los fosfatos (1085 cm^{-1}) de la hidroxiapatita están presentes siempre. En la muestra tratada con sésamo, la zona de bandas de 1350 a 1500 cm^{-1} pueden ser carboxilatos, pero como el sésamo (ácidos carboxílicos, metionina) tienen las bandas de absorción de IR en la misma zona, es difícil la asignación luego de realizar el tratamiento con sésamo. El aumento de la banda a 1180 cm^{-1} podría ser originado por una mayor proporción de grupos CH_2 a causa del sésamo (162).

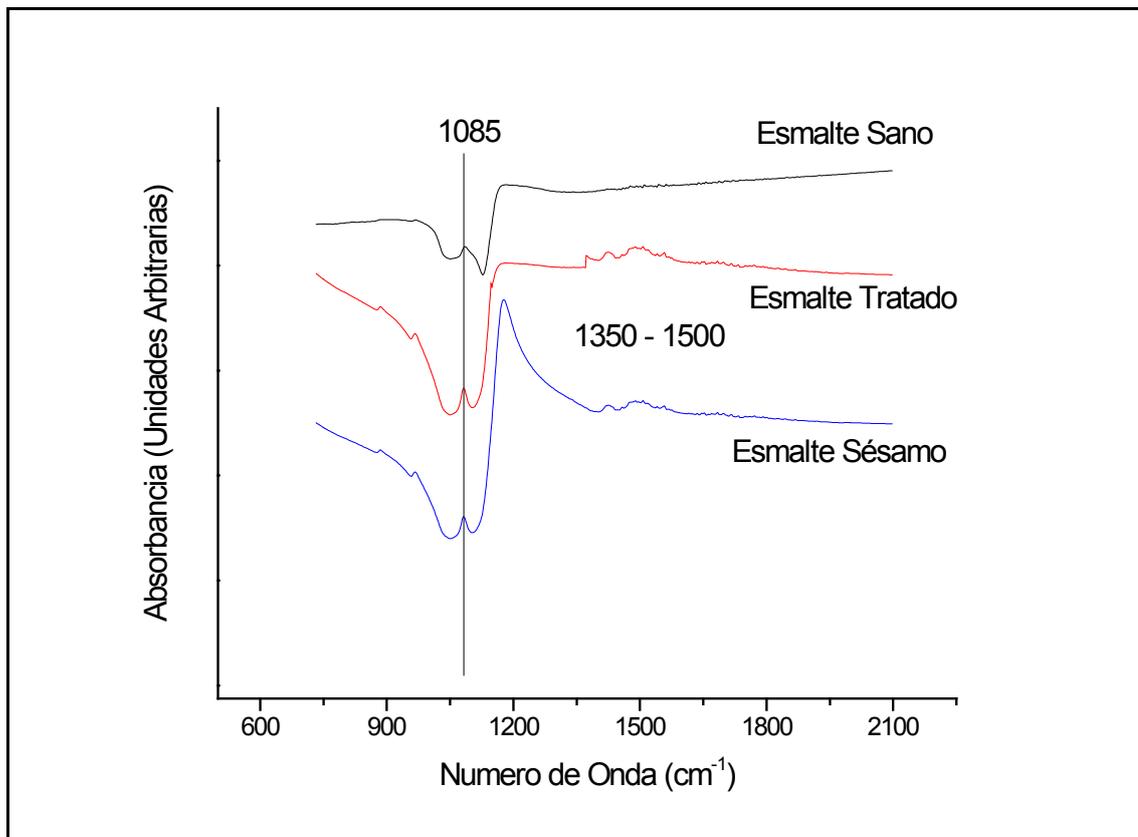


Figura 101. Espectrometría Infrarroja

El diagrama de rayos X se ilustra en la Figura 102, y su análisis se representa en la Cuadro 7. Los picos en $2\theta = 21.9, 26.4, 32.7, 34.7$ y 44.3° están asociados a hidroxiapatita y fosfato de calcio. Como puede verse, el pico a 21.9° , plano (200) de la hidroxiapatita, en el esmalte tratado con la bebida gaseosa, desaparece.

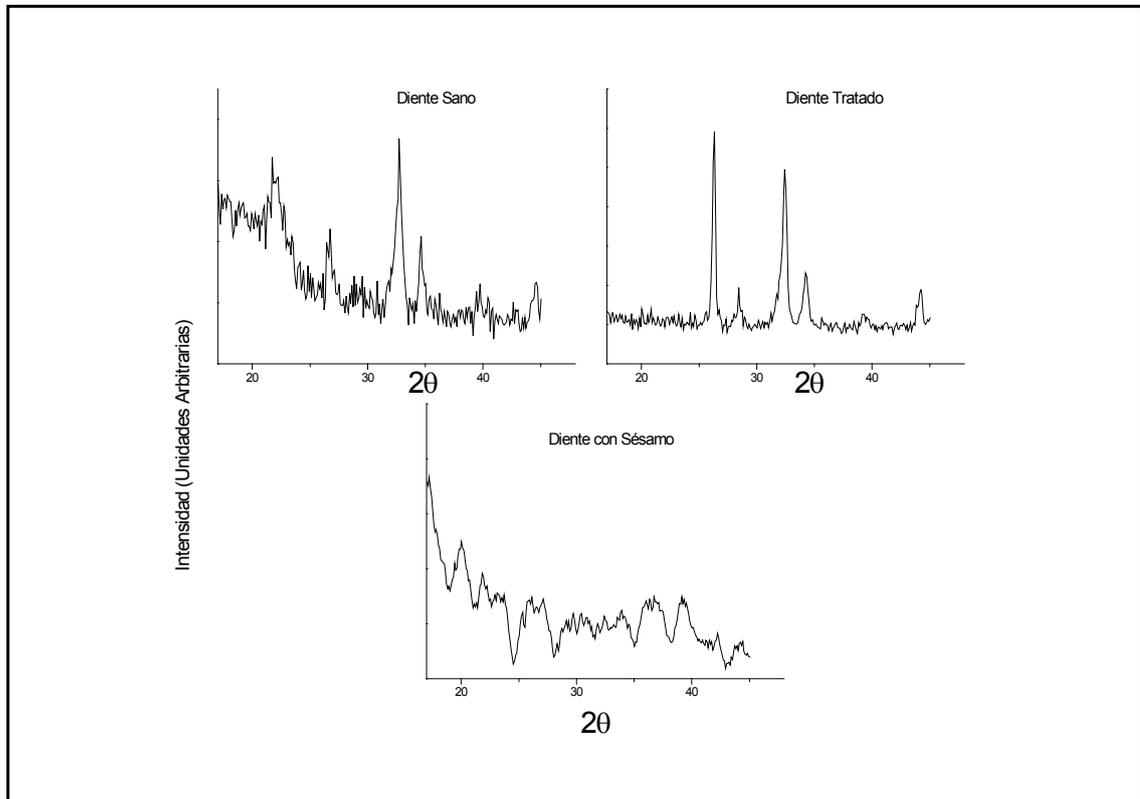


Figura 102. Difractograma por rayos X

Cuadro 7. Análisis de Rayos X

	2θ (°)
Esmalte Sano	21.9 26.4 32.7 34.7 44.3
Esmalte Tratado	26.3 32.7 34.6 44.3
Esmalte Sésamo	20.0 21.8? es amorfo

En el estudio DRX, el sésamo origina una estructura amorfa por tanto, el diagrama de rayos X es difícil de analizar. Según Adewuyi *et al.*(163) la semilla de sésamo tiene una cristalina que no supera el 28% resultado que coincide con de DRX obtenido.

Resultados del objetivo: *Determinar las variaciones de porosidad de las lesiones de erosión expuestas a una solución de sésamo en condiciones estáticas, mediante el análisis de superficie específica.*

El análisis estructural denotó que hay un aumento de todos los parámetros en el esmalte erosionado después de la acción de la bebida, lo cual está asociado a una mayor porosidad. Se observó un cambio en el tipo de Histéresis; mientras que en el esmalte sano, la Tipo E es asociada a cuellos pequeños y estrechos, en el esmalte erosionado la curva se corresponde con una Tipo H, que puede asociarse a poros pequeños con hendiduras. En Cuadro 8 se detalla el análisis estructural.

Asimismo, el análisis SBET señala que al incorporar el sésamo al esmalte, aumenta la superficie específica del diente y el volumen y tamaño de poro disminuyen. Es interesante notar que el tipo de Histéresis es B que se asocia a estructuras de láminas paralelas.

Cuadro 8. Análisis Estructural. Análisis Superficie Específica / Porosidad

	Superficie Específica (m²/g)	Volumen de Poro (cm³/g)	Tamaño de Poro (Å)	OBSERVACIONES
Esmalte Sano	1,34	0,0017	51	Isoterma Tipo II Histéresis Tipo E
Esmalte Erosionado	1,67	0,0073	181	Isoterma Tipo I Histéresis Tipo H
Esmalte Sésamo	1,88	0,0020	45	Isoterma Tipo II Histéresis Tipo B

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN

En este estudio realizamos la descripción de los aspectos mecánicos, morfológicos, topográficos y químicos, producidos por los bioelementos de una solución de sésamo sobre lesiones de erosión del esmalte dental, considerando dos regímenes de exposición.

Utilizamos un régimen cíclico, que consistió en la exposición del esmalte erosionado a la solución de sésamo alternando con la conservación en saliva artificial. Se creó una lesión superficial de erosión y se aplicó la solución en intervalos regulares, un lapso de tiempo determinado. El diseño fue adaptado de Hedge y Moany (99). Estos autores evaluaron cuantitativamente el potencial de remineralización de la pasta de caseín fosfato- fosfato amorfo de calcio (CPP-ACP) mediante un estudio longitudinal, a diferencia de nuestro trabajo que fue de tipo transversal. Difiere también, del modelo de pH cíclico, donde se alternan procesos de remineralización y desmineralización (164- 166). Estos experimentos de combinación, están diseñados para imitar la dinámica de pérdida y ganancia de minerales involucrada en la formación de caries (165). No obstante, existen publicaciones que informan sobre la eficacia de distintos productos remineralizantes sobre el esmalte dental, utilizando otros modelos experimentales in vitro, donde el producto fue aplicado durante minutos (99- 101) o días (13).

Además, se evaluó el efecto de la solución de sésamo “per se” en condiciones estáticas. En este régimen, se procedió a la inmersión de las muestras en la solución de sésamo durante 24 h. Este tiempo permitió el uso de la solución en óptimas condiciones, pues después de 48 h comienza a oxidarse y necesita ser renovada. Se ha demostrado con ultrasonido, que la superficie reblandecida del esmalte se estabiliza después de 6 h de remineralización en saliva artificial y no presenta diferencia estadística con la inmersión durante 24 h (94). Si bien este tiempo tiene escasa relevancia clínica, pues el medio bucal varía de acuerdo a períodos más cortos, resultó de utilidad para evaluar el efecto del sésamo sobre el esmalte erosionado.

Asimismo se evaluaron parámetros de la composición de la semilla y la solución obtenida en relación al contenido de minerales y el pH. La cantidad de calcio y fósforo en la semilla de sésamo activado fue mayor que en la semilla seca, y en todas las muestras, la cantidad de fósforo fue mayor que el calcio (Ca: 6,84 y P: 9,83 mg/g de muestra). Estos resultados se contraponen con lo informado por otros trabajos donde, el contenido de calcio fue mayor que el fósforo (Ca: 1,03%, y P: 516 mg/100g del total de materia seca) (118) o, el contenido de calcio y fósforo fue semejante (Ca 4,21 y P 4,45 mg/g⁻¹) (16). El sésamo es cultivado en distintos países y en cada región la especie puede tener características de composición variables (167) como la semilla procedente de Sudán (118) o de India (16). En nuestro país se cultiva en una vasta zona del centro norte aunque la zona más favorable es la región chaqueña (168). La mayor proporción de minerales se encuentra en la cáscara de la semilla encontrándose una relación Ca/P de 6,59, mientras que en el interior fue de 0,9. Estos resultados acuerdan con lo expresado por Pathak *et al.* (16). En esta especie, se identificó magnesio aunque no se detectó sodio. Otros estudios coinciden con un bajo contenido de sodio de la semilla (169). El pH de la solución de sésamo obtenida fue levemente acidulada (pH 6 en la escala colorimétrica).

Los ensayos de microdureza Vickers se realizaron de acuerdo a lo recomendado por Gutierrez-Salazar y Reyes-Gasga (170). Estos autores consideran que, en los estudios de tejidos duros dentarios, el indentador Vickers es más útil que Knoop. La forma cuadrada se conserva mejor durante las indentaciones y el alargamiento de las diagonales puede detectarse fácilmente. En la superficie externa y próxima al límite con la dentina estas deformaciones resultan más frecuentes y conducen a errores en la medición de la dureza.

La carga empleada (50gf/10'') resultó adecuada para la correcta visualización de la impronta. La microdureza es una medida de la integridad estructural de (casi) la lesión entera, es decir, es una medida combinada de la presencia de la capa superficial, su grado de mineralización y grosor, la extensión de la desmineralización y la distribución de minerales en subsuperficie (171).

Para evaluación de la solución de sésamo ciclada en saliva artificial, se trabajó con grupos independientes. La dureza del esmalte sano no presentó diferencia

significativa entre los grupos. El valor medio registrado en la zona media hacia oclusal, fue de $415 \pm 17,61$ HV. Esto difiere de los valores más bajos ($343,82 \pm 13,92$ HV) informados por Rirattanapong *et al.* (106). Sin embargo, los resultados concuerdan con Gutiérrez-Salazar y Reyes-Gasga (170) que indican que la microdureza del área oclusal del esmalte varía entre 359 HV a 424 HV, encontrándose que desciende en la zona cervical (227 HV a 342 HV). Además, Braly *et al.* (35) han demostrado que existe diferencia en la microdureza de la zona externa del esmalte y la interna. Posibles fuentes de estas variaciones son cambios en la composición química local, en la microestructura y en la orientación de los prismas. En dientes humanos, el tercio más externo de la superficie del esmalte está ocupado por esmalte radial, mientras que los 2/3 internos por bandas de Hunter Schreger (172). El esmalte radial y las bandas constituyen tipos de esmalte (173) que se caracterizan por presentar una organización definida de los prismas y distinto comportamiento mecánico (174). Para evitar que los ensayos de microdureza abarcaran áreas con distintos tipos de esmalte, realizamos secciones longitudinales de los dientes, asegurando las indentaciones sobre un volumen homogéneo de tejido (esmalte radial).

Donassollo *et al.* (175), utilizando dureza Knoop, obtuvieron valores de esmalte sano permanente de $341 \pm 32,8$ HK. Chuenarrom *et al.* (160) compararon ambos instrumentos y encontraron valores semejantes de dureza Knoop (315,7 - 354,1 HK), y Vickers (316,0 – 328,4 HV) en el esmalte. Sin embargo, los resultados obtenidos por Chicot *et al.* (176) comparando la dureza Knoop y Vickers en materiales cerámicos demuestran que, en general, para valores de dureza más altos, el número Knoop es menor que el Vickers y que este comportamiento se revierte cuando los valores de dureza son bajos. El esmalte dental se considera un material cerámico por la organización de los cristales en la trama proteica, lo que podría explicar la diferencia en los números de dureza Vickers y Knoop reportados por los distintos trabajos.

La exposición de las muestras a la acción de una bebida gaseosa produjo una lesión superficial desmineralizada de erosión (177). La dureza superficial obtenida fue de $307,76 \pm 18,4$ HV significando una disminución del 25,58 % con relación al tejido sano. Valores de microdureza similares (310,31 HV) se encontraron

desmineralizando el esmalte con agua clorada 24 h, siendo el porcentaje de reducción de 9,76% en relación al valor sano inicial (106). Los diferentes tiempos de exposición empleados y su efecto están relacionados con el tipo de ácido, su concentración y el pH del medio; pero además con la respuesta de cada diente a la desmineralización.

La bebida contiene ácido fosfórico 0,51 mg/ml (71), un acidulante que hace descender su pH a 3 en la escala colorimétrica. Esto coincide con el rango de valores de pH (2,40 a 3,20) de bebidas gaseosas de distintos sabores informado por otros autores (70, 78, 85). El ácido fosfórico difunde al interior del prisma y produce la liberación de iones calcio causando a disolución de la hidroxiapatita. Zafar y Ahmed (56) evaluaron el efecto del grabado con ácido fosfórico al 37% sobre las propiedades mecánicas de los tejidos duros del diente y concluyeron que la dureza del esmalte se reduce significativamente (de 4,21 GPa a 1,15 GPa) después de 120 segundos.

Considerando estudios previos (70, 79, 81, 151) en relación a los distintos tiempos de acción de bebidas carbonatadas y la erosión del esmalte, la exposición durante 90 minutos utilizada en este trabajo, resultó adecuada para provocar la lesión de erosión reproducible y medible. No se tuvo en cuenta el efecto buffer de la saliva, a diferencia de los modelos donde la desmineralización se realiza a intervalos regulares (164). La pérdida de minerales en volumen y la profundidad de la lesión son menores cuando se utilizan exposiciones cortas, a intervalos regulares, al medio ácido y se conservan en saliva entre ciclos (164).

También, el esmalte erosionado fue expuesto a la solución de sésamo bajo condiciones estáticas, sin intervención de la saliva artificial para describir su efecto “per se”. Se utilizó un tiempo de inmersión de 24 h de acuerdo al trabajo de Vono Ribeiro *et al.* (178). El registro de dureza se realizó con el equipo Triboindenter Hysitron que permitió determinar las variaciones de las propiedades mecánicas de la capa más superficial del esmalte. La dureza obtenida en el esmalte sano, fue de $4,61 \pm 0,58$ GPa. Este valor se encuentra dentro del rango informado por Cuy *et al.* (179) el cual varía de 2,7 a 6,4 GPa. Otros autores reportaron valores similares de dureza de 4,48 GPa (81) y 4,21 GPa (56) para el esmalte sano.

La reducción de la dureza, después de la exposición de 90 minutos a la bebida gaseosa, fue drástica disminuyendo de 4,61 GPa a 0,06 GPa, mientras que el módulo reducido del esmalte sano fue de $88,92 \pm 11,8$ y disminuyó a $10,70 \pm 4,57$, produciendo una capa superficial completamente blanda de unos $1548,65 \pm 515,5$ nm. Esto demuestra una importante pérdida de mineral en la capa superficial del esmalte. En cambio, Devlin *et al.* (81), compararon la erosión del esmalte con una gaseosa en diferentes tiempos de exposición y demostraron que después de 1h de inmersión, la dureza (GPa) fue del 92,6% en relación a la inicial, mientras que después de 2 h fue del 93,25%, después de 3 h del 85,7% y después de 15 h del 80,3%. Estos porcentajes resultaron muy cercanos al esmalte sano, por lo que no se corresponden con los obtenidos en nuestro trabajo donde la reducción de la dureza en la capa superficial fue contundente (Tabla 8). Posibles factores responsables de estas diferencias están relacionados con una composición variable de los dientes humanos, debido a influencias genéticas, condiciones de desarrollo (dieta, exposición al flúor) y edad (maduración pos eruptiva), formas y medios de conservación de las piezas antes del experimento. Estas diferencias provocan amplias variaciones en su respuesta a los desafíos ácidos (165). Asimismo, influye la forma de preparar la muestra, el área de esmalte considerada y el tipo de diente utilizado (160) como así también, el tipo de indentador y la carga.

Tanto en el régimen cíclico como en condiciones estáticas la solución de sésamo produjo una recuperación parcial de la dureza superficial mayor a la obtenida por la saliva artificial. La semilla de sésamo contiene distintos componentes que podrían estar involucrados en este fenómeno. El proceso de germinación activa fitasas endógenas que transforman el fitato en derivados solubles liberando fósforo y calcio favoreciendo su depósito sobre el esmalte. Sin embargo, otros mecanismos de acción son posibles. Amaechi *et al.* (113) informaron que la teobromina en presencia de un medio formador de apatita actúa reforzando el potencial de re mineralización del medio. Lo propio sostienen Mirkarimi *et al.* (13) con relación al ácido gálico contenido en la semilla de uva, que facilita la deposición mineral en las capas superficiales del esmalte, actuando como un andamiaje para la nucleación de fluoruro de calcio. Por lo tanto, algunos componentes orgánicos de la semilla de sésamo, podrían ser también responsables de la recuperación de la microdureza (114).

Sin embargo, al igual que lo expresado por otros autores, no se restauraron los valores de dureza del esmalte sano (81, 94, 180).

La morfología de la superficie del esmalte sano al MEB mostró un aspecto uniforme, con leves irregularidades. La acción de la bebida aumentó la porosidad. El prisma se disuelve de manera diferencial mostrando al MEB distintos patrones, según esté afectado el centro o la periferia. Los factores que contribuyen a la disolución preferencial del esmalte, estarían relacionados con puntos de entrada estructurales (como las estrías de Retzius o las estriaciones del prisma, las diazonas) y con los cambios de dirección de los prismas que implica el consiguiente cambio en la orientación de los cristales (55). El abrupto cambio de orientación de los cristales en la periferia del prisma afecta la distribución de la materia orgánica haciendo a estas zonas más permeables. Cuando la pérdida de mineral afecta el corazón del prisma se forma un patrón en “panal de abeja” (55) que fue confirmado en nuestro trabajo (Figuras 74 A y 75). Tyler (54) sostiene que esto es válido para ácidos minerales u orgánicos diluidos con un ataque prolongado, pues si el ácido actúa un tiempo breve, se disuelve la periferia del prisma. Este autor considera además que las condiciones estáticas de acción del ácido favorecen la supervivencia de la periferia del prisma ya sea por la acumulación de productos de reacción como por las mayores concentraciones de ciertos elementos o material orgánico. No obstante, en este estudio, también reconocimos un patrón indefinido de disolución (55). Además, una muestra presentó esmalte aprismático cuya superficie resultó inalterable ante la acción de la bebida tal como fue comprobado por otros trabajos (181- 183) (Figura 76).

La rugosidad (R_q) del esmalte sano, aumentó de 16,78 nm a 69,87 nm después de la inmersión en la bebida. El ácido fosfórico contenido en la bebida utilizada, causó una superficie más rugosa, tal como fue demostrado por Poggio *et al.* (184). A diferencia de éstos que desgastaron y pulieron la superficie del esmalte para remover las variaciones topográficas naturales, en nuestro estudio se preservó la superficie del esmalte intacta al iniciar el experimento, por lo que la rugosidad inicial del esmalte sano fue variable y su respuesta ante la acción de la bebida también. En AFM se observó el mismo patrón de desmineralización que al MEB (Figuras 51 E y 84 B).

Además, mediante AFM, la superficie del esmalte tratada con sésamo ciclado en saliva artificial, evidenció una reducción de la rugosidad del esmalte erosionado. La superficie apareció más regular, uniforme y menos porosa. Este aspecto fue comprobado al MEB. En condiciones estáticas el sésamo también causó la modificación de la morfología del esmalte erosionado aunque persistieron algunos poros profundos, resultando una superficie con más rugosidad en comparación con la saliva. En estas condiciones, el material depositado sobre la superficie no permitió operar el microscopio AFM en la modalidad “tapping” por lo que los resultados deben considerarse con reservas. En ambos casos se observó un material denso de aspecto grumoso cubriendo los prismas siendo la distribución más regular en el esmalte ciclado en saliva artificial. Esta capa difiere del aspecto globular mostrado por el depósito de caseína- fosfato y fosfato amorfo de calcio sobre el esmalte dental (185).

La composición elemental del esmalte sano (peso%) fue análoga a la descrita por otros autores (42). La relación Ca/P ($1,73 \pm 0,13$) resultó menor que la hallada en otros trabajos donde fue de aproximadamente 2,0 (99, 186). No obstante, también se reportaron ratios Ca/P cercanos a 1 (uno) en el esmalte de dientes permanentes (187). La hidroxiapatita pura presenta una ratio Ca/P de 1,67 y la discrepancia en los valores obtenidos en los distintos estudios estaría relacionada con la presencia de otros compuestos cálcicos o elementos que actuarían modificando su relación de estequiometría (187).

La desmineralización con la bebida provocó una disminución de la relación Ca/ P observándose pérdida de calcio. Después de la acción de la solución de sésamo 24 h, se encontró un aumento de la relación Ca/P semejante a la obtenida con el CPP- ACP (99). Sin embargo, resultó menor que la provocada por remineralizantes conteniendo flúor (188). En este trabajo no se pudo establecer una diferencia en la relación Ca/P entre el esmalte tratado con sésamo ciclado en saliva artificial mediante EDS. Debemos continuar investigando en este sentido.

La relación Ca/P estudiada en semilla de sésamo germinado fue de 0,7. Karlinsey *et al.* (92) encontraron una mayor remineralización de lesiones de erosión tratadas

con soluciones simuladas de saliva artificial con una relación Ca/ P de 0,3 que con una de 1,6. Una explicación de esto puede deberse al intercambio isomorfo de fosfato con el carbonato en la red de esmalte, que se disuelve fácilmente durante el ataque de ácido. Dado que el calcio puede coordinar con muchas especies vecinas dependiendo de sus ambientes (por ejemplo, la coordinación puede exceder de 10), podría ser que los niveles relativamente más altos de fosfato puedan ser necesarios para ayudar a estabilizar los constituyentes de calcio supervivientes que permanecen en el esmalte erosionado (92).

Mediante el análisis químico por XPS se detectó que la capa superficial presentaba mayor proporción de nitrógeno que calcio y fósforo. Por debajo de esta capa se encontraba el esmalte erosionado. En general, las semillas contienen distintas proteínas que funcionan como reservas y también proteínas metabólicamente activas, como las enzimas proteicas. Las proteínas de almacenamiento generalmente se presentan en orgánulos bien definidos llamados cuerpos de proteínas o granos de aleurona. Estos cuerpos se han encontrado en numerosas semillas como oleaginosas y los cereales. Tienen un alto contenido de nitrógeno y de prolina, y menor cantidad de lisina, triptofano y metionina (189). Otros autores (190) estudiaron los cotiledones, endospermo y capa de semilla de sésamo negro crudo madurado para detectar los componentes mediante FT-IR/ART identificando lípidos y proteínas en el cotiledón y endosperma, mientras que los espectros de la capa de la semilla mostraron apenas bandas de lípidos o proteínas. También se observaron bandas correspondientes a carbohidratos en la región $1200-950\text{ cm}^{-1}$ para todas las partes de la semilla

La solución de sésamo que hemos utilizado se obtuvo de semillas que iniciaron la germinación. Las primeras señales de crecimiento están dadas por la aparición de la radícula y después el hipocotíleo o plúmula. La extensión del eje embrionario, o sea todo el embrión excepto los cotiledones, se debe principalmente a la imbibición del agua y al inicio de formación de nuevo tejido. Esta primera actividad de crecimiento se da aun antes de que emerja la radícula y es resultado de la elongación de las células al mismo tiempo que se produce la división celular. Durante la imbibición se inicia un metabolismo muy activo (respiración y síntesis de proteínas) que está asociado con la acción enzimática. Todo este proceso comprende cambios químicos

muy complejos: degradación de ciertos compuestos presentes en las semillas, el transporte de materiales de una parte de la semilla a otra, principalmente del endospermo al embrión o de los cotiledones a las partes en crecimiento, y por último la síntesis de nuevos materiales a partir de los que fueron degradados. En este momento, la síntesis de proteínas y de polipéptidos permite el crecimiento del eje embrionario que requiere de una respiración activa en la cual se utilizan las reservas de carbohidratos, lípidos y proteínas que estaban almacenados. Generalmente el eje embrionario tiene suficientes reservas para satisfacer sus necesidades inmediatas, pero pronto es necesario usar las reservas almacenadas en el endospermo que comienza a disolverse. Las paredes celulares se degradan, las reservas en forma de proteínas se hidrolizan para formar aminoácidos y el almidón también se hidroliza para formar azúcares reducidos, que serán transportados al embrión. Todo este proceso se lleva a cabo mediante las enzimas secretadas por la capa de aleurona que rodea al endospermo (191). Postulamos que este mecanismo de la germinación aumentaría la disponibilidad de compuestos nitrogenados capaces de adherirse al esmalte dental.

En el análisis por FTIR del esmalte sano se detecta una banda a 1084 cm^{-1} asociada a los grupos fosfatos en el esmalte sano, coincidiendo con lo reportado por Lodoño (192) donde las bandas más fuertes de los grupos fosfatos (PO_4^{3-}) están en las regiones 1100 a 1000 cm^{-1} . Los grupos PO_4^{3-} (1085 cm^{-1}) de la hidroxiapatita están presentes siempre sugiriendo que conservan su identidad y no se ven afectados por los tratamientos (193). Después de la exposición a la bebida, aparecen bandas entre 1350 y 1560 cm^{-1} correspondientes a diferentes grupos carbonato/carboxilatos que pueden tener su origen al quedar expuestos por el ataque ácido. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Kim *et al.* (194), quienes observaron la formación de bandas a 872 cm^{-1} ($\nu_2\text{ CO}_3$) y a $1405, 1450\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_3\text{ CO}_3$) asignadas a la sustitución de carbonato para el ion fosfato. Estos autores asimismo, señalan que los iones carbonatos causan distorsiones en la estructura de la hidroxiapatita lo cual podría estar asociado a los cambios morfológicos y estructurales observados. Además, encontraron un desplazamiento del pico de PO_4^{3-} a un número de onda mayor después de la erosión provocada por una bebida cola durante 30 minutos, lo que indica que la longitud del enlace P-O se redujo debido a la erosión.

El espectro FTIR para el esmalte tratado con la solución de sésamo 24 h también muestra bandas en la zona 1350 a 1500 cm^{-1} que pueden ser atribuidas a distintos grupos. Estudios relacionados con el análisis de compuestos fenólicos y flavonoides en el propóleo indicaron que las señales en las bandas 1450-1455 cm^{-1} corresponden a la vibración de flexión C-H de grupos CH_2 y C- H_3 de flavonoides y anillos aromáticos, 1380 cm^{-1} a la vibración de flexión C-H del grupo CH_3 de flavonoides, 1274 cm^{-1} O-H y C-CO de hidrocarburos y 1088 cm^{-1} vibración C-C y C-OH de flavonoides y grupo alcohólicos secundarios (195). Estos resultados coinciden con un estudio de flavonoides extraídos de plantas medicinales en el cual la banda a 1457 cm^{-1} podría estar relacionada con CH_3 , CH_2 , flavonoides y anillos aromáticos, donde las vibraciones serían la vibración de flexión (δ) de C-H y la vibración de estiramiento de los aromáticos. En ese mismo trabajo, consideraron que la banda a 1252 cm^{-1} sería debido a la vibración del grupo C-O de los polioles, como los hidroxiflavonoides y una banda a 1086 cm^{-1} estaría relacionada con alcoholes secundarios y/o con un grupo éster de estiramiento C – O (196).

La semilla de sésamo contiene lignanos (un tipo de compuestos fenólicos) como el sesamol que fueron detectados en el aceite de sésamo mediante FTIR por Mirghani *et al.* (197) encontrando que los picos 1504 cm^{-1} correspondían a fenoles, 1489- 1471 cm^{-1} a CH_2 , 1397 cm^{-1} a metilos, 1274 cm^{-1} al OH de fenólicos, 1185 cm^{-1} C-H de aromáticos. Varios estudios informaron sobre el rol de diferentes polifenoles en la remineralización del esmalte. Mirkarimi *et al.* (13) trataron caries artificiales con polifenoles extraídos de la semilla de uva, se encontraron estructuras esféricas parecidas a un racimo que podrían actuar como andamiaje para la iniciación del proceso de re mineralización. Cheng *et al.* (9) y Cheng y ten Cate (116) indicaron que el extracto de *Galla chinensis* contiene distintos componentes polifenólicos, que actuarían como una barrera previniendo el depósito de iones calcio en la superficie del esmalte dañado, pero permitirían la transmisión de más iones calcio al cuerpo de la lesión.

En nuestros ensayos, no realizamos la extracción y separación de los componentes orgánicos, para determinar el rol de los polifenoles del sésamo en la remineralización de lesiones de erosión y poder evitar el solapamiento de los espectros de infrarrojo. Sin bien, la capa orgánica de sésamo depositada sobre el esmalte no evidenció

presencia de iones calcio, por debajo de ella se advirtió una recuperación de la relación calcio/ fósforo que indica difusión de iones en la subsuperficie. En cambio, la saliva artificial mostró mayor concentración atómica de calcio en la superficie que en la subsuperficie. Esto posiblemente se deba a la concentración de este elemento y el contenido de hidroxipropilmetilcelulosa en la fórmula. Este último, por sus características de aglutinante o viscosizante de suspensiones y emulsiones actuaría reteniendo iones en su superficie (198).

Con relación al análisis de DRX se evidenció un patrón correspondiente a la hidroxiapatita y fosfatos de calcio que se corresponde con lo comunicado por otros estudios aunque no se encontró silicato de calcio hidratado (199). La estructura del tipo “panal de abejas” formada por la desmineralización, podría estar asociada a la desaparición del plano 200 de la HA, a la vez que la menor altura de los picos representa una disminución de la estructura cristalina. La acción del sésamo provoca una estructura amorfa.

El proceso de erosión fue comprobado además, por los análisis de superficie específica y de porosidad cuyos valores aumentan luego de la acción de la bebida. En este mismo sentido, el estudio de la isoterma permite determinar un cambio en la estructura de los poros que confirman la erosión interna del tejido. Los valores de superficie específica y volumen de poro hallados en nuestro experimento se asemejan a los reportados por Nguyen *et al.* (200) utilizando ácido fosfórico al 37% durante 30 segundos, mientras que el tamaño de poro se correspondió con el encontrado para el grabado por 60 segundos. Estos autores estudiaron la variaciones de porosidad producidas por el grabado con ácido fosfórico, mediante isotermas de adsorción de gas krypton a temperatura constante. Si bien la bebida gaseosa empleada posee una concentración de ácido fosfórico de 0,03%, su efecto desmineralizante está condicionado por el prolongado tiempo de acción. Otros autores confirmaron que el ácido cítrico al 0,3% durante 120 minutos resultó en una erosión má extensa y profunda que la provocada por una concentración al 1% durante 30 minutos (92).

Después del tratamiento con la solución de sésamo 24 h se observó una disminución general de la porosidad aunque aumentó la superficie específica en relación al esmalte erosionado. El esmalte sano presenta un ciclo de histéresis tipo E

con poros de cuerpos grandes y cuellos pequeños y estrechos, en cambio, la histéresis tipo B del esmalte tratado con sésamo es característica de poros formados por láminas paralelas. Esto explica la mayor superficie específica, pues ésta, más aumenta cuando la morfología de la partícula se aleja de la equidimensionalidad (147).

El esmalte conservado en saliva artificial no mostró una recuperación de las propiedades mecánicas, aunque se determinaron modificaciones del aspecto morfológico al MEB y AFM. Se observó una capa homogénea delgada cubriendo los prismas con una reducción de la rugosidad. Esta capa está asociada al contenido de hidroxipropilmetilcelulosa, un polímero espesante y adherente muy frecuente en las fórmulas de sustitutos de saliva y lágrimas. Este compuesto es de la familia de la carboximetilcelulosa, de la cual se sabe, tiene la capacidad de formar complejos con iones calcio y /o fosfatos inhibiendo su disponibilidad para la remineralización, a la vez que el aumento de su viscosidad actúa disminuyendo la velocidad de difusión de iones dentro de la solución (91, 93).

Devlin *et al.* (81) utilizaron un producto comercial de saliva artificial (Salivart[®]) para remineralizar esmalte expuesto a una bebida cola, observando que la dureza del esmalte aumentaba parcialmente un 18% en relación al esmalte desmineralizado. El contenido de calcio, fosfato de potasio y otras sales minerales de esa saliva pudieron intervenir en la remineralización del esmalte. La saliva artificial empleada en nuestro estudio contiene diversos minerales y, además 2 ppm de flúor, sin embargo, su aplicación durante 5 días o 24 h no mostró un efecto de recuperación en las propiedades mecánicas del esmalte desmineralizado. Una posible explicación se encontraría en que este producto no contiene fósforo en su composición para la formación de fosfatos de calcio.

Sin embargo, se debe enfatizar que la saliva artificial no puede modelar los procesos de desmineralización y remineralización como sucede en el ambiente intraoral, puesto que intervienen varios factores biológicos relacionados. Wang *et al.* (201) sostienen que, en general, la saliva natural podría ofrecer una mayor protección que la saliva artificial debido a la capacidad de formar una película que restringe la difusión de ácido y el transporte de iones dentro y fuera de la superficie del esmalte

Debemos tener en cuenta que, además de las limitaciones propias, este estudio *in vitro*, no reproduce las condiciones clínicas de la cavidad oral en relación a la saliva y la película adquirida depositada sobre el esmalte dental. Por lo tanto, los resultados sólo deben interpretarse como una predicción del potencial erosivo de una bebida gaseosa (78) así como del efecto remineralizante de la solución empleada.

CONCLUSIONES

La caracterización de la microestructura del esmalte erosionado expuesto a la solución de sésamo germinado, mediante distintos métodos de estudio, permitió obtener información de los aspectos mecánicos, morfológicos, químicos, cristalinos y de porosidad de la superficie y la subsuperficie. Esto contribuyó a la comprensión en profundidad de los fenómenos involucrados en la desmineralización y remineralización del esmalte dental.

La semilla de sésamo contiene minerales, entre ellos calcio y fósforo, además de compuestos orgánicos, con capacidad de interactuar con la superficie del esmalte erosionado.

Bajo las condiciones experimentales de este trabajo, la exposición del esmalte dental a una bebida gaseosa durante 90 minutos, generó una capa superficial desmineralizada, circunscripta al esmalte radial, compatible con una lesión de erosión dental. Asimismo, las modificaciones microestructurales producidas pudieron ser descriptas y caracterizadas desde distintos aspectos, químico, mecánico y morfológico, utilizando distintos métodos de estudio.

Si bien la bebida utilizada contiene un muy pequeño porcentaje de ácido fosfórico, el bajo pH y el prolongado tiempo de exposición, contribuyeron para crear una lesión de erosión con una grave desmineralización, con una marcada disminución del módulo elástico reducido, abertura de poros resultado de la pérdida de iones calcio y fosfato en el centro de la varilla, un aumento de la rugosidad, disminución de la cristalinidad y desplazamiento de grupos químicos.

Estas modificaciones estructurales y ultraestructurales del prisma, afectan la integridad superficial del tejido adamantino, comprometiendo su función biomecánica y haciéndolo más vulnerable.

La superficie del esmalte erosionado expuesto a la solución de sésamo germinado, ciclado en saliva artificial, mostró un endurecimiento mayor que el producido por la

saliva artificial. Sin embargo, el valor de microdureza final obtenido estuvo alejado del esmalte sano. Por lo tanto, la re-mineralización no restaura las propiedades superficiales tal como se presentan en el esmalte sano. Se demostró también que la solución de sésamo por sí misma produce modificaciones morfológicas, topográficas, químicas y mecánicas sobre la superficie del esmalte erosionado aunque su aspecto morfológico resulta más liso y homogéneo cuando se combina con saliva artificial.

De acuerdo a las hipótesis planteadas determinamos que la solución obtenida de la semilla de sésamo germinado, presentó una relación calcio fósforo menor que la hidroxiapatita, aunque la semilla contiene una relación mayor en su cobertura. El pH de esta solución resultó semejante al del medio bucal.

En ambos regímenes se produjo una recuperación de la dureza. Se demostró un aumento de la relación Ca/P en el esmalte erosionado después de la exposición al sésamo en condiciones estáticas. Las lesiones de erosión expuestas a la solución de sésamo 24 h presentaron mayor proporción de calcio y fósforo que las expuestas a la saliva artificial.

Además, al microscopio electrónico de barrido se observó un depósito superficial taponando los poros de la erosión. El análisis químico de este material demostró su origen orgánico y su estructura amorfa. Por debajo de éste, las características químicas respondieron a las de la hidroxiapatita.

La rugosidad del esmalte erosionado disminuyó después del tratamiento con el sésamo ciclado en saliva artificial 5 días, aunque no resultó tan evidente al aplicar el sésamo durante 24 h, posiblemente por la naturaleza de la capa depositada. La porosidad del esmalte erosionado disminuyó después del tratamiento con sésamo 24 horas y a la vez, la forma del poro cambió.

Los elementos inorgánicos de la saliva artificial como el calcio y flúor no tuvieron capacidad de difundirse hacia la lesión de erosión. Su componente orgánico creó una capa superficial adherente y delgada. La formulación de saliva artificial utilizada en este trabajo resulta más adecuada para la lubricación de la mucosa oral.

Este experimento “in vitro” no reproduce los múltiples factores del medio bucal por lo que las modificaciones microestructurales de la superficie del esmalte no representan su comportamiento “in situ”. Para poder predecir el potencial remineralizante de la semilla de sésamo se requiere continuar con nuevos estudios.

Concluimos que los componentes orgánicos e inorgánicos de la semilla de sésamo están involucrados en las transformaciones de las propiedades mecánicas, químicas y morfológicas de la superficie del esmalte erosionado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Twetman S. The evidence base for professional and self-care prevention - caries, erosion and sensitivity. *BMC Oral Health*. 2015; 15(Suppl 1): S4.
2. Raphael S, Blinkhorn A. Is there a place for Tooth Mousse® in the prevention and treatment of early dental caries? A systematic review. *BMC Oral Health*. 2015;(15): 113.
3. Swarup JS, Rao A. Enamel surface remineralization: Using synthetic nanohydroxyapatite. *Contemp Clin Dent*. 2012 Oct; 3(4): 433-6.
4. Buzalaf MA, Hannas A, Magalhães A, Rios D, Honório H, Delbem A. Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci*. 2012 Sep-Oct; 20(5): 493-502.
5. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12: 564-582.
6. Cury Jaime. Uso del flúor. En: Baratieri LN. *Operatoria Dental. Procedimientos preventivos y restauradores* San Pablo: Quintessence; 1993. pp. 43-58
7. Reynolds E. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J. Dent. Res*. 1997 sep.; 76(9): 1587-95.
8. Llana C, Fomer L, Baca P. Anticariogenicity of casein phosphopeptide- amorphous calcium phosphate: a review of the literature. *J. Comtemp. Dent. Pract*. 2009 mayo; 10 (3): 1-9.
9. Cheng L, Li Jiyao, He Libang, Zhou Xuedong. Natural products and caries prevention. *Caries Res*. 2015; 49(Suppl 1): 38-45.
10. Cross KJ, Huq NL, Reynolds EC. Casein phosphopeptides in oral health- chemistry and clinical applications. *Curr. Pharm. Des*. 2007; 13(8): 793-800.
11. Barrancos Mooney J, Frydman J. *Histología dentaria*. En: Barrancos Mooney J y Barrancos P. *Operatoria Dental. Integración clínica*. 4th ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2006. pp. 261-66.
12. Thompson DJ, Phillips PH. Dietary Fluoride and Oat Hul Effects on enamel solubility. *Journal of Dental Research*. 1966 May; 45(3): 845-847.
13. Mirkarimi M, Eskandarion S, Bargrizan M, Delazar A, Kharazifard MJ. Remineralization of artificial caries in primary teeth by grape seed extract: an in vitro study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2013; 7(4): 206-10.
14. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural Products in Caries Research: Current (Limited) Knowledge, Challenges and Future Perspective. *Caries Res*. 2011; (45): 243-263.
15. Tunde-Akintunde TY, Oke MO, Akintunde BO. Sesame Seed. In Akpan U, editor. *Oilseeds. Rijeka: In Tech; [Online]*. 2012 [consultado 29/09/2015]; pp. 81-98.

Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/oilseeds/sesameseed>.

16. Pathak N, Rai AK, Kumari R, Bhat KV. Value addition in sesame: A perspective on bioactive components for enhancing utility and profitability. *Pharmacogn Rev.* 2014 Jul-Dec; 8(16): 147–155.
17. Park HM, Heo J, Park Y. Calcium from plant sources is beneficial to lowering the risk of osteoporosis in postmenopausal Korean women. *Nutr. Res.* 2011 Jan.; 31(1): 27-32.
18. Deriemaeker P, Alewaeters K, Hebbelinck M, Lefevre J, Philippaerts R, Clarys P. Nutritional status of Flemish vegetarians compared with non- vegetarians: a matched samples study. *Nutrients.* 2010 Jul; 27: 770-780.
19. Osborn JM. The nature of the Hunter-Schreger Bands in enamel. *Arch. Oral Biol.* 1965; 10(1): 929-933.
20. Raue L, Gersdorff N, Rödiger M, Klein H. New insights in prism orientation within human enamel. *Arch Oral Biol.* 2012; (57): 271-276.
21. Gomez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental.* 3rd ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A; 2009
22. Reyes Gasga J, Carbajal de la Torre G. Estudio del esmalte dental humano por microscopía electrónica y técnicas afines. *Rev LatinAm Met Mat.* 2001 Diciembre; 21(2): 81-85.
23. Rensberger J. Mechanical adaptation in enamel. In Koenigswald W, Sander P, editors. *Tooth enamel microstructure.* Rotterdam: Balkema; 1997, pp. 237-257.
24. Ten Cate A. *Histología Oral. Desarrollo, estructura y función.* 2nd ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.; 1989
25. Koenigswald W, Clemens W. Levels of complexity in the microstructure of mammalian enamel and their application in studies of systematics. *Scanning Microscopy.* 1992; 6: 195-218.
26. Durso G, Abal A. Variabilidad de la morfología de los prismas del esmalte humano. *Acta Microscópica.* 2008; 17(1): 1-8.
27. Goin F, Durso G, Anselmino C, Batista S, Tanevitch A, Abal A. Microestructura del esmalte dentario: definiciones y conceptos. *R.A.O.A.* 2007 Oct- Dic; 95(5): 393-398.
28. Tanevitch A, Durso G, Batista S; Abal A; Llompert G; Llompert J; Martínez C; Licata L. Microestructura del Esmalte en Dientes Deciduos: Los Tipos de Esmalte y la Resistencia a la Abrasión. *e- Universitas.* 2013; 11(6): 1713-22.
29. Abal A, Durso G, Tanevitch A. Comparative study of human tooth enamel in relation to microhardness and chemical composition. *Acta Microscópica.* 2015; 24(Suppl. A): 66-67
30. White DJ, De Faller RV, Browman WD. mineralization and Remineralization Evaluation Techniques. Added Considerations. *J. Dent. Res.* 1992 April; 71(Spec Iss): 929-933.

31. Joshi Mahasweta, Joshi Nikhil, Kathariya Rahul, Angadi Prabhakar, Raikar Sonal. Techniques to Evaluate Dental Erosion: A Systematic Review of Literature. *J Clin Diagn Res.* 2016, Oct; 10(10): ZE01–ZE07. doi: 10.7860/JCDR/2016/17996.8634
32. Rodriguez A, Maldonado A, Acevedo A. Estudio in vitro del efecto de dentífricos fluorurados comercialmente disponibles en Venezuela en el proceso de remineralización de lesiones iniciales de caries dental. *Acta Odontológica Venezolana.* [Online]. 2006 [consultado: 27/02/2015]; 4(3). Disponible en: http://www.actaodontologica.com/ediciones/2006/3/dentifricos_fluorurados_comercialmente.asp
33. Arends J, ten Bosh JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res.* 1992 Apr; 71(Spec N°): 924-8.
34. Braly A, Darnell LA, Mann AB, Teaford MF, Weihs TP. The effect of prism orientation on the indentation testing of human molar enamel. *Arch Oral Biol.* 2007 Sep; 52(9): 856-860.
35. Habelitz S, Marshall S, Marshall G, Balooch M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. *Arch Biol Oral.* 2001 Feb; 46(2): 173-83.
36. Nanci A. Ten Cate's Oral Histology. Development, Structure and Function. 8th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2008, pp. 141- 190
37. Battelino L, Dorronsoro de Cattoni S. *Bioquímica en Ciencias de la Salud Córdoba: Triunfar*; 2001. pp. 464-77.
38. Bhaskar SN. *Histología y Embriología Bucal de Orban.* 9th ed. Buenos Aires: El Ateneo; 1986. pp. 49-115.
39. García-Garduño MV, Reyes-Gasga J. La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 2006 Diciembre; 9(2): 90-95.
40. Kunin A, Evdokimova A, Moiseeva N. Age-related differences of tooth enamel morphochemistry in health and dental caries. *EPMA J.* 2015; 6(1): 1-11.
41. Mariel Cárdenas J, Mariel Murga H, Villagrán Rueda S, Mariel Cárdenas G, Gutierrez Cantú F, A GB. Distribución de elementos químicos en el esmalte dental. *Revista de Ciencias Básicas UJAT.* 2010 Junio; 9(1): 3-11.
42. de Menezes Oliveira MA, Torres CP, Gomes Silva JM, Chinelatti MA, De Menezes FC, Palma Dibb. Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. *Microsc. Res. Tech.* 2010 May; 73(5): 572-7.
43. Baldassarri M, Margolis HC, Beniash E. Compositional determinants of mechanical properties of enamel. *J Dent Res.* 2008 Jul; 87(7): 645-9.
44. Besic FC, Bayard M, Wiemann MR, Burrell K. Composition and structure of dental enamel: elemental composition and crystalline structure of dental enamel as they relate to its solubility. *J Am Dent Assoc.* 1975 Sep; 91(3): 594-601.

45. Lussi A. Dental Erosion: From Diagnosis to Therapy Adrian L, editor. Basel, Switzerland: Karger; 2006. pp. 77-87.
46. Amaechi B. Dental Erosion and Its Clinical Management Amaechi BT, editor. Switzerland: Springer; 2015. pp. 3-68.
47. Bordoni N. Odontología Preventiva. Medidas Preventivas O.P.S. , editor. Buenos Aires: Paltex; 1992, pp. 9-11.
48. Fejerskov O KE. Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management. 2nd ed. Ole Fejerskov EK, editor. Singapore: Blackwell Monksgaard; 2008. pp. 233-248.
49. Shellis R. The Dental Erosion Process. In Amaechi BT, editor. Dental Erosion and Its Clinical Management.: Springer; 2015. pp. 13- 34.
50. Goldberg Michel. Understanding Dental Caries. En: Pathogenesis to Prevention and Therapy. Michel Goldberg Editor. Paris: Springer; 2016, pp. 11-16
51. Cedillo Valencia Jd. Uso de los derivados de la caseína en los procedimientos de remineralización. REVISTA ADM. 2012 Julio- Agosto; 69(4): 191-199.
52. Núñez DP, García Bacallao L. Bioquímica de la caries dental. Revista Habanera de Ciencias Médicas. 2010; 9(2): 156-166.
53. Cuniberti de Rossi NE, Rossi GH. Lesiones Cervicales no Cariotas. La lesión dental del futuro. 1st ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009. pp. 19-36.
54. Tyler J. A Scanning Electron Microscope Study of Factors Influencing Etch Patterns of Human Enamel. Arch Oral Biol. 1976; 21: 765-179.
55. Silverstone LM, Saxton CA, Dogon IL, Fejerskov O. Variation in the pattern of acid etching of human dental enamel exmined by Scanning Electron Microscopy. Caries Res. 1975; 9: 373-387.
56. Zafar MS AN. The effects of acid etching time on surface mechanical properties of dental hard. Dental Materials Journal. 2015; 34(3): 315-320.
57. Arnold WH, Haddad B, Schaper K, Hagemann K, Lippold C, Danesh G. Enamel surface alterations after repeated conditioning with HCl. Head Face Med. 2015 Sep 25;11(1):32.
58. Lynch CD, O'Sullivan VR, Dockery P, McGillicuddy CT, Rees JS, Sloan AJ. Hunter-Schreger Band patterns and their implications for clinical dentistry. Review Article. Journal of Oral Rehabilitation. 2011; 38: 359-365.
59. Silverstone L, Johnson NW, Hardie JM, Williams RAD. Caries dental: Etiología, patología y prevención: El Manual Moderno; 1985.
60. Moss S. Dental Erosion. Int Dent J. 1998 Dec; 48(6): 529-39.
61. Ganss C. How valid are current diagnostic criteria for dental erosion? Clin Oral Invest. 2008; 12(Suppl 1): S41-S49.

62. Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci.* 1996 Apr; 104(2(Pt2)): 151-5.
63. Sabel N, Robertson A, Nietzsche S, Norén JG. Demineralization of enamel in primary second molars related to properties of the enamel. *The Scientific World Journal.* [Online]. 2012 [consultado 12/03/2015], 2012(587254): 1-8. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/587254/>.
64. Eisenburger M. Degree of mineral loss in softened human enamel after acid erosion measured by chemical analysis. *J. Dent.* 2009 Jun; 37(6): 491-4.
65. Johansson AK, Koch G, Poulsen S. Dental Erosion. In Goran Koch SP, editor. *Pediatric Dentistry: A Clinical Approach.* 2nd ed. Oxford, UK: Wiley- Blackwell; 2009, pp. 141- 152.
66. Bartlett DW, Fares J, Shirodaria S, Chiu K, Ahmada N, Sherriff M. The association of tooth wear, diet and dietary habits in adults aged 18–30 years old. *Journal of Dentistry.* 2011; (39): 811-816.
67. Costa Aguiar YP, Gomes dos Santos F, Freitas de Farias Moura E, Mariz da Costa FC, Auad SM, Martins de Paiva S, Leite Cavalcanti A. Association between Dental Erosion and Diet in Brazilian Adolescents Aged from 15 to 19: A Population-Based Study. *The Scientific World Journal.* 2014; 2014(ID 818167): p. 1-7. doi:10.1155/2014/818167
68. Milisevic A. Sports drinks hazard to teeth. *Br J Sports Med.* 1997 Mar; 31(1): 28-30.
69. Moynihan P. The role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. *Bull World Health Organ.* 2005 Sep; 83(9): 694-9.
70. Wang YL, Chang CC, Chih WC, Chang HH, Chiang YC, Chuang YC, Chang HH, Huang GF, Liao YS, Lin CP. Erosive potential of soft drinks on human enamel: An in vitro study. *Journal of the Formosan Medical Association.* 2014; (113): 850-856.
71. Khamverdi Z, Vahedi M, Abdollahzadeh S, Hosein Ghambari M.. Effect of a Common Diet and Regular Beverage on Enamel Erosion in Various Temperatures: An In-Vitro Study. *J Dent (Tehran).* 2013 Sep; 10(5): 411-6.
72. Moreno Ruiz X, Narváez Carrasco CG, Bittner Schmidt V. Efecto In Vitro de las Bebidas Refrescantes sobre la Mineralización de la Superficie del Esmalte Dentario de Piezas Permanentes Extraídas. *Int. J. Odontostomat.* 2011; 5(2): 157-163.
73. Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The Role of Diet in the Aetiology of Dental Erosion. *Caries Res.* 2004; 38((suppl 1)): 34-44.
74. Zero DT, Narváez Carrasco CG, Bittner Schmidt V. Erosion--chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J.* 2005; 55(4 (Suppl 1)): 285-90.
75. Ehlen LA, Marshall TA, Qian F, Wefel JS, Warren JJ. Acidic beverages increase the risk of in vitro tooth erosion. *Nutr Res.* 2008 May; 28(5): 299-303.
76. Murrell S, Marshall TA, Moynihan PJ, Qian F, Wefel JS. Comparison of in vitro erosion potentials between beverages available in the United Kingdom and the United

- States. *J Dent.* 2010 Apr; 38(4): 284-289.
77. Paes Torres C, Chinelatti MA, Gomes-Silva JM, Rizóli FA, Hueb de Menezes Oliveira MA, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Surface and Subsurface Erosion of Primary Enamel by Acid Beverages over Time. *Braz Dent J.* 2010; 21(4): 337-345.
 78. Sener Y, Botsali MS, Kucukyilmaz E, Tosun G, Altunsoy M. Influence of soft drinks on dental enamel: An in vitro study. *Journal of Pediatric Dentistry.* 2013 May-Aug; 1(Issue 2): 42-45.
 79. Chuenarrom C, Benjakul P, Daosodsai P. Comparison between a profilometer and a measuring microscope for measurement of enamel erosion. *Journal of Oral Science.* 2008; 50(4): 475-479.
 80. Attin T, Koidl U, Buchalla W, Schaller HG, Kielbassa AM, Hellwig E. Correlation of microhardness and wear in differently eroded bovine dental enamel. *Arch. Oral Biol.* 1997 Mar; 42(3): 243-250.
 81. Devlin H, Bassiouny M, Boston D. Hardness of enamel exposed to Coca-Cola and artificial saliva. *Journal of Oral Rehabilitation.* 2006; 33: 26-30.
 82. Matos Gonçalves GK, Brandao Guglielmi Cde A, Pires Corrêa FN, Raggio DP, Pires Corrêa MS. Erosive potential of different types of grape fruit juices. *Braz. Oral Res.* 2012 Sep-Oct; 26(5): 457-463.
 83. Cochrane NJ, Yuan Y, Walker GD, Shen P, Chang CH, Reynolds C, Reynolds EC. Erosive potential of sports beverages. *Australian Dental Journal.* 2012;(57): 359-364.
 84. Lussi A, Kohler N, Zero D, Schafner M, Megert B. A comparison of the erosive potential of different beverages in primary and permanent teeth using an in vitro model. *Eur J Oral Sci.* 2000; (108): 110-114.
 85. Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res.* 1999; 33(1): 81-87.
 86. Zimmer S, Kirchner G, Bizhang M, Benedix M. Influence of Various Acidic Beverages on Tooth Erosion. Evaluation by a New Method. *PLOS One.* 2015 June; (2): 1-8.
 87. de Carvalho Sales Peres SH, Magalhaes AC, de Andrade Moreira Machado MA, Buzalaf MAR. Evaluation of the Erosive Potential of Soft Drinks. *European Journal of Dentistry.* 2007; 1(1):10-13
 88. Simeone Giordano S. *Acta Odontológica Venezolana.* Usos y efectos del fosfato de calcio amorfo (FCA) en la odontología restauradora y preventiva. [On Line]. 2009 [consultado 15/06/2015]. Disponible en: <http://www.actaodontologica.com/ediciones/2010/3/art24.asp>.
 89. Llena Puy C. La saliva en el mantenimiento de la salud oral y como ayuda en el diagnóstico de algunas patologías. *Med. oral patol. oral cir.bucal.* [Online]. 2006 [consultado 22/06/2015], Ago-Sep; 11(5). Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-69462006000500015

90. Loyo Molina K, Balda Zavarce R, Gonzalez Blanco O, Solórzano Peláez A, González M. Actividad cariogénica y su relación con el flujo salival y la capacidad amortiguadora de la saliva. *Acta Odontológica Venezolana*. [Online]. 1999 [consultado 20/07/2013]; 37(3). Disponible en: https://www.actaodontologica.com/ediciones/1999/3/actividad_cariogenica_relacion_flujo_salival.asp.
91. Ionta FQ, Mendonça FL, de Oliveira GC, de Alencar CR, Honório HM, Magalhães AC, Rios D. In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization. *J Dent*. 2014 Feb; 42(2): 175- 9.
92. Karlinsey RL, Mackey AC, Blanken DD, Schwandt CS. Remineralization of Eroded Enamel Lesions by Simulated Saliva In Vitro. *The Open Dentistry Journal*. 2012; 6:170-176. doi:10.2174/1874210601206010170.
93. Meyer- Lueckel H, Tschoppe P, Kielbassa AM. Effect of various Ca/PO4 concentrations of linseed-based saliva substitutes on enamel in vitro. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2006; 33: 760-766.
94. Eisenburger M, Addy M, Huges, JA, Shellis, RP. Effect of Time on the Remineralisation of Enamel by Synthetic Saliva after Citric Acid Erosion. *Caries Res*. 2001; (35): 211-215.
95. Juárez-López MLA, Hernández-Palacios RD, Hernández-Guerrero JC, Jiménez-Farfán D, Molina-Frechero N. Efecto preventivo y de remineralización de caries incipientes del fosfopéptido de caseína fosfato de calcio amorfo. *Revista de Investigación Clínica*. 2014 marzo-abril; 66 (2): 144-151
96. Chen F, Wang D. Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. *Expert Opin. Ther. Pat*. 2010 May; 20(5): 681-694.
97. Aimutis WR. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *J. Nutr*. 2004 Apr.; 134(4): 989S-95S.
98. Mettu S, Srinivas N, Reddy Sampath CH, Srinivas N. Effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on caries-like lesions in terms of time and nano-hardness: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2015 Oct-Dec; 33(4): 269-73.
99. Hedge M, Moany A. Remineralization of enamel subsurface lesions with casein phosphopeptide- amorphous calcium phosphate: A quantitative energy dispersive X-ray analysis using scanning microscopy. An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2012 Jan-Mar; 15(1): 61-67.
100. Rirattanapong P, Vongsavan K, Tepvichaisillapakul M. Effect of Various Forms of Calcium in Dental Products on Human Enamel Microhardness in vitro. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2012 July; 43(4): 1053-58.
101. Patil N, Choudhari S, Kulkarni S, Joshi S. Comparative evaluation of remineralizing potential of three agents on artificially demineralized human enamel: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2013 Mar-Apr; 16(2): 116–120.
102. Zhao J, Liu Y, Sun WB, Zhang H. Amorphous calcium phosphate and its application

- in dentistry. *Chem. Cent. J.* 2011 Jul.; 8: 5-40.
103. Sorvari R, Meurman JH, Alakuijala P, Frank RM. Effect of Fluoride Varnish and Solution on Enamel Erosion in vitro. *Caries Res.* 1991; 28: 227-232.
 104. Lussi A, Hellwig E, Klimek J. Fluorides- mode of action and recommendations for use. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2012; 122(11): 1030-42.
 105. Barlow AP, Sufi F, Mason SC. Evaluation of different fluoridated dentifrice formulations using an in situ erosion remineralization model. *J Clin Dent.* 2009; 20(6): 192-8.
 106. Rirattanapong P, Vongsavan K, Suratit R, Tanaiutchawoot N, Charoenchokdilok V, Jeansuwannagorn S, Yoddee M. Effect of Five Different Dental Products on Surface Hardness of Enamel Exposed to Chlorinated Water in vitro. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2011 September; 42(5): 1293-98.
 107. Algarni AA, Mussi MC, Moffa EB, Lippert F, Zero DT, Siqueira WL, Hara AT. The impact of stannous, fluoride ions and its combination on enamel pellicle proteome and dental erosion prevention. *PLOS One.* 2015 Jun; 10(6): 128-196.
 108. Lee Bor-Shiunn, Chou Po-Hung, Chen Shu-Yu, Liao Hua-Yang, Chang, Che-Chen. Prevention of enamel demineralization with a novel fluoride strip: enamel surface composition and depth profile. *Scientific Reports* [Online]. 2015 [consultado 02/01/2016]; 5:13352. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep13352>
 109. Haghgoo R, Rezvani MB, Salehi Zeinabadi M. Comparison of nano-hydroxyapatite and sodium fluoride mouthrinse for remineralization of incipient carious lesions. *J Dent (Tehran).* 2014 Jul; 11(4): 406-10.
 110. Tschoppe P, Zandim DL, Martus P, Kielbassa AM. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *J Dent.* 2011 Jun; 39(6): 430-7.
 111. Psicoestimulantes y Alucinógenos. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Medicina. [Online]. [consultado 29/09/2015]. Disponible en: <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c60.htm>
 112. Kargul B, Özcan M, Peker S, Nakamoto T, Simmons WB, Falster AU. Evaluation of human enamel surfaces treated with theobromine: a pilot study. *Oral Health Prev Dent.* 2012; 10(3): 275-82.
 113. Amaechi BT, Porteous N, Ramalingam K, Mensinkai PK, Ccahuana Vasquez RA, Sadeghpour A, Nakamoto T. Remineralization of Artificial Enamel Lesions by Theobromine. *Caries Res.* 2013 Abril; 24(47): 399-405.
 114. Wu C. Grape Products and Oral Health. *J Nutr.* 2009 Sep; 139(9): 1818s-23s.
 115. Djakpo O, Yao W. *Rhus chinensis* and *Galla Chinensis*--folklore to modern evidence: review. *Phytother Res.* 2010 Dec; 24(12): 1739-47.
 116. Cheng Lei ten Cate JM. Effect of *Galla chinensis* on the In Vitro Remineralization of Advanced Enamel Lesions. *Int J Oral Sci.* 2010; 2(1): 15-20.

117. Islam SM, Hiraishi N, Nassar M, Sono R, Otsuki M, Takatsura T, Yiu C, Tagami J. In vitro effect of hesperidin on root dentin collagen and de/re-mineralization. *Dental Materials Journal*. 2012; 31(3): 362–367.
118. Elleuch M, Besbes S, Roiseux O, Blecker C, Attia H. Quality characteristics of sesame seeds and by-products. *Food Chem. Food Chemistry*. 2007 Jan; 103(2): 641-650.
119. Kemal Ünal M, Yalçın Hasan. Proximate composition of Turkish sesame seeds and characterization of their oils. *Grasas y Aceites*. [Online]. 2008 [consultado 3/08/2017]; (1): p. 23-26. Disponible en: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/viewFile/485/487>
120. Temas de Farmacognosia. Plantas Medicinales. [Online]. [consultado 03/08/2017]. Disponible en: <https://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/productos-naturales/sesamo-ajonjolli/propiedades-del-sesamo/>
121. Moss GP. Nomenclature of Lignans and Neolignans (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry*. [Online]. 2000 [consultado 31/07/2017]; 72(Issue 8):1493-1523. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1351/pac200072081493>
122. Calle Álvarez, J. Aislamiento, purificación e identificación de sesamina a partir de lodos de microfiltrado en la fabricación del aceite virgen de *Sesamum Indicum L.* (ajonjolí). *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.* [Online] Jan./June. 2007 [consultado 13/08/2017]; 36(1). Bogotá. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74182007000100001
123. El-Saied HM, El-Nikeety MA, Abo-Etta AM. Evaluation of sesame by-product of sesame meal manufacture [1987]. *AGRIS (International System for Agricultural Science and Technology)*. [Online]. 1987 [consultado 30/09/2015]. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=ES880038388>.
124. Lee JI, Lee BH, Bang JK. Breeding of sesame (*Sesamum indicum L.*) for oil quality improvement. Varietal differences of amino-acid composition in protein of sesame seed [1990] *Korean J of Breeding*, 1969, 21(4): 300-7
125. Chiriboga Espín M. Evaluación de la efectividad nutricional de la pasta de ajonjolí (*Sesamum indicum L.*) como sustituto de la pasta de soya en el crecimiento de codornices (*Coturnix coturnix*). [Tesis]. Quito: Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias e Ingeniería; 2013.
126. Safont Estruch S. Triptófano: aminoácido amigo. *Dialnet* [Online]. 2003 [consultado 22/09/2015]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4956301.pdf>
127. Martínez Domínguez B, Ibañez Gómez V, y Rincón León F. Ácido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. [Online]. 2002 [consultado 12/03/2014] Sep; 52(3) Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222002000300001
128. Fernández S. Uso de Enzimas Termoestables en la Alimentación Animal Engormix. [Online]. 2007 [consultado 03/08/2017]. Disponible en: <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/uso-enzimas-termoestables-alimentacion-t27080.htm>

129. Rebollar PG, Mateos GG. XV Curso de Especialización. Avances en Nutrición y Alimentación Animal. El Fósforo en nutrición animal. Necesidades, valoración de materias primas y mejora de la disponibilidad. [Online]. 2013 [consultado 15/06/2016]. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/F%C3%B3sforo_en_Alimentaci%C3%B3n_Animal.pdf
130. Chaparro DC, Pismag RY, Elizalde AD. Efecto de la germinación sobre el contenido de hierro y calcio. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2011 Enero- Junio; 9(1): 51-59.
131. Kang Kyung W, Echarri Juan M., Llorente Carlos L. Repositorio de la Universidad Nacional de La Plata SeDiCi. [Online]. 2013 [consultado 1/03/2017]. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/38238/Documento_completo.pdf?sequence=1
132. García Jacomino Jorge Luis. Una introducción en los Materiales Cerámicos. Monografías. [Online]. 2017 [consultado 11/08/2017]. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos81/introduccion-materiales-ceramicos/introduccion-materiales-ceramicos.shtml>
133. Servicios Técnicos de Investigación Universidad de Alicante E. Técnicas de análisis químico de superficie. [Online]. 2012 [consultado 01/07/2017]. Disponible en: <https://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2012/especifica/tecnicas-instrumentales-en-el-analisis-de-superficie/26-noviembre-tecnicas-de-analisis-quimico-superficies.pdf>
134. Renau-Piqueras Jaime FM. Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido. [Online]. 2011 [consultado 01/06/2017]. Disponible en: http://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/9313/CC-011_art_5.pdf;sequence=1
135. Sahin O. An atomic force microscope tip designed to measure time-varying nanomechanical forces. [Online]. 2007 [consultado 04/08/2017]. doi:10.1038/nnano.2007.226
136. Bonfiglioli A, Mari E, Milani P, Silva S. Nanotecnologías y Materiales. Aplicaciones industriales y nuevas oportunidades. [Online]. 2002 [consultado 04/08/2017]. Disponible en: <http://www.ceramicaycristal.com/Ciencia.html>
137. Servicios Técnicos de Investigación. Universidad de Alicante. España. Microscopio de Fuerza Atómica y Efecto Túnel. [Online]. 2012 [consultado 04/08/2017] Disponible en: <https://ssti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-microscopia/microscopio-de-fuerza-atmica-y-efecto-tunel-afm-stm.html>
138. Mendoza Gamboa Oscar. Evaluación de métodos para la medición de dureza en materiales cerámicos y refractarios de ingeniería. 2004 mayo. [Tesis]. San Nicolás de los Garza: Universidad Autónoma de Nuevo León. México
139. Hysitron INC. Bruker- Hysitron [Online]. 2017 [consultado 03/10/2017] Disponible en: <https://www.hysitron.com/products-services/standalone-instruments/ti-950-triboindenter>.
140. Oliver WC, Parr GM. An Improved Technique for Determining Hardness and Elastic-Modulus Using Load and Displacement Sensing Indentation Experiments. *Journal of Materials Research*. 1992; p. 1564-1583.

141. Schlueter N, N Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the Measurement and Characterization of Erosion in Enamel. *Caries Res.* 2011; 45(suppl 1): 13–23.
142. Curia María Victoria. Estudio fisicoquímico y catalítico del sistema Mn-O-V [Tesis]. Repositorio de la Universidad Nacional de La Plata (SeDiCi). [Online]. 2010 [consultado 01/07/2017]. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2681>
143. Martínez Téllez A. La mecánica cuántica. [Online]. 2009 [consultado 01/11/2017]. Disponible en: <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com.ar/2009/08/la-espectroscopia-de-rayos-x.html>
144. Fernández Ruiz Ramón. Técnicas de plasma -masas (ICP-MS). Universidad Autónoma de Madrid. [Online]. 2004 [consultado 20/07/2017]. Disponible en: https://www.uam.es/personal_pas/txrf/icpms.html
145. Such Basáñez Ion. Curso de Técnicas para l análisis de Superficies. Análisis Físico de la superficie (Adsorción física de gases). [Online]. 2012 [consultado 24/06/2017]. Disponible en: <https://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2012/especifica/tecnicas-instrumentales-en-el-analisis-de-superficie/ion-such-tias/sesion-13-de-noviembre-ion-such.pdf>.
146. Sing Kenneth. The use of nitrogen adsorption for the characterisation of porous materials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2001 Aug; 187-188: 3-9.
147. Alonso Rodríguez J. Universidad de Oviedo. [Online]. 2006 [consultado 20/10/2017]. Disponible en: http://ocw.uniovi.es/pluginfile.php/4882/mod_resource/content/1/T2-TecnicasEstudioPorosidad.pdf
148. Toledo B. Universidad del País Vasco. [Online]. 2014 [consultado 04/09/2017] Disponible en: https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/14637/TFG_B%C3%A1rbara_Toledo.pdf?sequence=1
149. Martín Martínez José Miguel. Adsorción física de gases y vapores por carbones. España: Universidad de Alicante. [On line]. 1990 [consultado 24/10/2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Jose_Martin-Martinez/publication/39436526_Adsorcion_fisica_de_gases_y_vapores_por_carbones/links/581cc92b08aacc08aacc08aacc9abc/Adsorcion-fisica-de-gases-y-vapores-por-carbones.pdf
150. García Martínez Javier, Pérez Pariente Joaquín. Materiales zeolíticos: síntesis, propiedades y aplicaciones. Publicaciones Universidad de Alicante. [Online]. 2010 [consultado 14/10/2017]. Disponible en: <http://publicaciones.ua.es/publica/Detalles.aspx?fndCod=LI9788479089146&idet=621>
151. Lemos Barboza Adriana, Tanevitch Andrea, Bilmes Pablo. Estudio de la desmineralización del esmalte dental mediante ensayos de microdureza. En Terceras Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión de la Facultad de Ingeniería; [On line]. 2015 [consultado 01/08/2017] Abril; La Plata: FI-UNLP. pp. 588-590. Disponible en: sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/47899
152. Mathews MS, Amaechi BT, Ramalingam K, Ccahuana-Vasquez RA, Chedjieu IP, Mackey AC, Karlinsey RL. In situ remineralisation of eroded enamel lesions by NaF rinses. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(5): 525-30.

153. Pino Falconi R. Estudio del uso de aditivos en alimentos terminados encontrados en góndolas de supermercados en Ecuador y Argentina. Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización (IRAM); 2012.
154. García Bello D. La fórmula de la Coca-Cola. [Online]. 2014 [consultado 01/10/2017]. Disponible en: <http://dimetilsulfuro.es/2014/02/19/la-formula-de-la-coca-cola/>
155. Química. Facultad de Ciencias Exactas UNLP. Departamento de Química analítica Instrumental. Marzo 2009. Módulo 1: Métodos electroquímicos de análisis
156. Zárate ÁI. Determinación de ácido fosfórico en refrescos de Cola por medio de Titulación Potenciométrica. Asignatura Química analítica II. Bárbula: Universidad de Carabobo. Facultad de Ciencias de la Educación. Departamento de Biología y Química. [On line]; 2014, [acceso 24/06/2017]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/jaimejeff/informe-de-analitica>
157. Einsenburger M, Hughes J, West NX, Shellis RP, Addy M. The use of ultrasonication to study remineralisation of eroded enamel. *Caries Res.* 2001 Jan-Feb;35(1):61-6.
158. Valenzuela Armando Silerio, y Dr. Pablo Elias Gómez Posse. Unión Vegetariana Argentina. [Online]. 2003 [consultado 06/06/2016]. Disponible en: <http://www.uva.org.ar/germinados.html>
159. Luo Yu-Wei, Xie Wei-Hua, Jin Xiao- Xiao, Wang Qian, He Yi-Jian. Efectos de la germinación sobre la disponibilidad de hierro, zinc, calcio, manganeso y cobre de cereales y leguminosas. *Journal CyTA - Journal of Food.* [On line]. 2014 [consultado 06/06/2016]; 12(Issue 1), pp. 22-26. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19476337.2013.782071>
160. Chuenarrom C, Benjakul P. Effect of Indentation Load and Time on Knoop and Vickers Microhardness Tests for Enamel and Dentin. *Materials Research.* 2009; 12(4): 473-476.
161. Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury JA. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz. Dent. J.* [Online]. 2008 [acceso 26/06/2013]; 19 (1). Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-64402008000100004
162. Sahoo S, Chakraborti CK, Naik S, Mishra SC, Nanda UN. Structural Analysis of Ciprofloxacin-Carbopol Polymeric Composites by X-Ray Diffraction and Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 2011; 10(3): 273.
163. Adewuyi Adewale, Vargas Pereira Fabiano. Surface modification of cellulose isolated from Sesamun indicum underutilized seed: A means of enhancing cellulose hydrophobicity. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices.* 2017 Sep.; 2(Iss. 3): 326-332.
164. Amaechi B. Techniques for the production of dental eroded lesions in vitro. *Journal of Oral Rehabilitation.* 1999; 26: 97-102.
165. Buzalaf M, Hannas A, Magalhães A, Rios D, Honório H, Delbem A. pH-cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries

- control: strengths and limitations. *J Appl Oral Sci.* 2010; 18(4): 316-34.
166. Shetty S HMBT. Enamel remineralization assessment after treatment with three different remineralizing agents using surface microhardness: An in vitro study. *J Conserv Den.* 2014; 17(1): 49-52.
167. Cabral Torres MI, Oviedo De Cristaldo RM. Caracterización agronómica de cuatro variedades de sésamo (*Sesamum Indicum* L.), sembradas en el departamento central. *Ivestigación Agraria*, 2008; 10(2): 10-15.
168. Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. [Online]. 2014 [consultado 20/09/ 2017]. Disponible en: <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/sesamum-indicum>.
169. Kanu Philip. Biochemical Analysis of Black and White Sesame Seeds from China. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 2011; 1(2): 145-157.
170. Gutiérrez-Salazar M del P, Reyes Gasga J. Microhardness and Chemical Composition of Human Tooth. *Materials Research.* 2003; 6(3): 367-373.
171. Lippert F LR. Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Archives of Oral Biology.* 2014; 59: p. 704-710.
172. Tanevitch A, Batista S, Durso G, Abal A, Anselmino C, Licata L,. Tipos de Esmalte y su Relación con la Biomecánica. *Cs Morfol.* 2008; X(1): 9-14.
173. Koenigswald W SP. Tooth enamel microstructure Koenigswald W SP, editor. Rotterdam: Balkema; 1997, pp. 277-280.
174. Durso G, Tanevitch A, Batista S, Abal A, Llompart G, Llompart J, Martínez C, Licata L. Estudios sobre la Microestructura del Esmalte en Dientes Deciduos. Facultad de Odontología. Publicación Informativa y Científica UNLP, 2013; 1: 23-28.
175. Donassollo TA, Romano AR, Demarco FF, Della- Bona A. Avaliação da microdureza superficial do esmalte e da dentina de dentes bovinos e humanos (permanentes e decíduos). *Rev. Odonto Ciênc.* 2007 out./dez; 22(58): 311-316.
176. Chicot D, Mercier D, Roudet F, Silva K, Staia MH, Lesage J. Comparison of instrumented Knoop and Vickers hardness measurements on various soft materials and hard ceramics. *Journal of the European Ceramic Society.* 2007; (27): 1905–1911.
177. Jager DHJ, Vieira AM, Ruben JL, Huysmans. Estimated erosive potential depends on exposure time. *Journal of Dentistry* 2012; 40: 1103–1108. Disponible en: www.sciencedirect.com
178. Vono Ribeiro H, de Oliveira Lima J, Gonzalez Vono B, de Andrade Moreira Machado MA, da Silva S. Airpolishing effect on bovine enamel and the posterior remineralizing effect of saliva. An in vitro study. *Journal of Applied Oral Science.* 2006; 14(3): 193-197.
179. Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teaford MF, Weihs TP. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Archives of Oral Biology*, 2002

- April; 47(Issue 4): 281-291
180. Penumatsa NV, Kaminedi RR, Baroudi K, Barakath O. Evaluation of remineralization capacity of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on the carbamide peroxide treated enamel. *Dental Science*. 2015; 7(Issue 6): 583-586.
 181. García Godoy F, Gwinnett AJ. Effect of etching times and mechanical pretreatment on the enamel of primary teeth: an SEM study. *Am J Dent*. 1991; Jun; 4(3): 115-8.
 182. Burrow MF, Burrow JF, Makinson OF. Pits and fissures: etch resistance in prismless enamel walls. *Aust Dent J*. 2001 Dec; 46(4): 258-62.
 183. Meola MT, Papaccio G. A scanning electron microscope study of the effect of etching time and mechanical pre-treatment on the pattern of acid etching on the enamel of primary teeth. *Int Dent J*. 1986 Mar; 36(1): 49-53.
 184. Poggio C, Ceci M, Beltrami R, Lombardini M, Colombo M. Atomic force microscopy study of enamel remineralization. *Annali di Stomatologia* 98 2014. 2014; V(3): 98-102.
 185. Galbiatti de Carvalho F, Lima Moura Brasil V, da Silva Filho T, Lemes Carlo H, Lacerda dos Santos R, Silva Guedes de Lima B. Protective effect of calcium nanophosphate and CPP-ACP agents on enamel erosion. *Braz Oral Res*. 2013 Nov-Dec; 27(6): 463-70.
 186. Armstrong WD, Brekhus PJ. Chemical constitution of enamel and dentine. *J. Biol. Chem.* [Online]. 1937 [acceso 19/11/2017]; 120:677-687. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/120/2/677.full.pdf>
 187. Clemente Presas A, García Molina JA, Greco Machado Y, Carvalho Lobato P, Belmonte Calderón A, Serra Renom I, Manzanares Céspedes MC. Análisis semicuantitativo del calcio y fósforo en el esmalte y la dentina. *Biomecánica*. 2002; 10(2): 14-19
 188. Savas S, Kavrik F, Kucukyilmaz E. Evaluation of the remineralization capacity of CPP-ACP containing fluoride varnish by different quantitative methods. *J Appl Oral Sci*. 2016 May-Jun; 24(3): 198-203.
 189. Bewley JD, Black M. *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*: Springer; 1978, pp. 126-198.
 190. Kitade K, Katayama N, Kuwae A. FT-IR/ATR spectral analysis of black sesame constituents. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 2010; 57(5): 215-219
 191. Matilla AJ. Desarrollo y Germinación de las semillas. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, Edition: 2nd, Publisher: McGraw Hill, Editors: J. Azcón-Bieto, M. Talón, [Online]. 2008 [consultado 22/9/2017]; pp.537-558. Disponible en: <https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2016/08/Matilla-2008.pdf>
 192. Lodoño ME, Echavarría A, De La Calle F. Características cristal químicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. *Revista EIA (Escuela de Ingeniería de Antioquía)*. 2006 Junio; (5): 109-118.

193. Gonzalez García J. Análisis químico del esmalte dental humano tratado con una sustancia remineralizante experimental. Tesis. [Online]. 2015. [consultado 29/09/2017]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/50942/1/53105564.2015.pdf>
194. Kim IH, Son JS, Min BK, Kim YK, Kim KH, Kwon TY. A simple, sensitive and non-destructive technique for characterizing bovine dental enamel erosion: attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Oral Science*. 2016; 8: 54–60.
195. Delgado Aceves M de L, Andrade Ortega JA, Ramírez Barragán CA. Caracterización físicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Rev Mex de Cienc Forestales*. [Online]. 2015 [consultado 29/09/2017] Abril; 6(28). Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322015000200006
196. Nunes Oliveira R, Cordeiro Mancini M, Cabral Selles de Oliveira F, Marques Passo T, Quilty B, da Silva Moreira M, Garrett T, Mc Guinness B. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Matéria (Rio J)*. [Online]. 2016 [consultado 01/10/2017] July/Sept.; 21(3). Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-70762016000300767
197. Mirghani MES, Che Man YB, Jinap S, Baharin BS, Bakar J. Application of FTIR spectroscopy in determining sesamol in sesame seed oil. *J Am Oil Chem Soc*. 2003 January; 80(Issue 1): 1-4.
198. Andueza I, Ávila G, Attias D. Caracterización física de hidroxipropilmetilcelulosa con potencial aplicación oftalmológica: pH, tensión superficial, característica de la película. *Rev. Soc. Quím. Méx*. 2000 Jul/Sep.; 44(3): 224-228.
199. Hueb de Menezes Oliveira MA, Paes Torres C, Gomes Silva JM, Chinelatti MA, Hueb de Menezes FC, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Microstructure and Mineral Composition of Dental Enamel of Permanent and Deciduous Teeth. *Microscopy Research and Technique*. 2010; (7): 572–577.
200. Nguyen TT, Miller A, Orellana MF. Characterization of the porosity of human dental enamel and shear bond strength in vitro after variable etch times: initial findings using the BET Method. *The Angle Orthodontist*. 2011; 81(4): 707-715.
201. Wang X, Mihailova B, Klocke, A, Heidrich S, Bismayer U. Effect of Artificial Saliva on the Apatite Structure of Eroded Enamel. *International Journal of Spectroscopy*. 2011; ID 236496, 9 pag. doi:10.1155/2011/236496

ANEXO

I. MICRODUREZA DE LA EROSIÓN DEL ESMALTE

Hoja de registro de dureza para la erosión del esmalte

	Sana	Tratada
A1	430,3	311,8
	454,4	297,5
	424,2	312,1
A2	438,6	288,7
	395,1	310,5
	395,8	289,2
A3	419	318
	410,2	329,9
	438,9	337,5
A4	433,8	306,2
	406,4	336,5
	414	327
PROM	421,7	313,7

II. MICRODUREZA PARA EL RÉGIMEN CÍCLICO

	agua			saliva			sésamo	
	sana	tratada		sana	tratada		sana	tratada
A1	384,7	303,3	S7	427,3	301	SS13	412,6	325
	388,9	297,5		426,8	295		417,1	322
	424,2	312,1		420,5	314,1		430	337,9
	413,5	308,6		424,2	285,5		396,9	334,3
	395,3	290,8		423,9	301,7		435	319,9
A2	438,6	288,7	S8	411,8	289,1	SS14	394,5	327
	395,1	310,5		395,8	315,2		420,2	338,9
	395,8	289,2		397,1	301,7		418,8	309,4
	398,7	319,3		418,5	318		438,8	319,1
	385,9	291,2		397,1	322,2		431,1	308
A3	419	318	S9	412,1	292,1	SS15	439,2	334,3
	410,2	329,9		424,2	305,5		408,8	307
	438,9	278,8		400	323,7		411,3	326,8
	416	327,3		399,7	316,7		439,8	330,9
	417,1	323,3		386,7	292,3		431,4	336,9
A4	418,2	291,7	S10	430,8	307	SS16	414,3	305
	417,6	291		412,4	319		446,5	307,8
	433,8	281		409,6	306,2		418,2	324,4
	433,2	282,7		399	309,1		418,8	339,7
	434,1	280,5		413,5	324,3		448,4	327,2
A5	406,4	336,5	S11	395,8	282,7	SS17	404,5	338,2
	414	327		394,3	305		394	329,5
	419,9	337,9		384,9	286,3		408,8	297,3
	403,7	338,9		402,4	279,8		385,7	334,5
	404,6	316,2		366,1	307		396,6	281
A6	401,1	312,5	S12	438,3	275,1	SS18	437,7	348,8
	438	304,5		428,8	348,1		422,2	306,4
	424,4	321,4		446,5	330,1		399,7	291,7
	432,9	301,4		422,2	339,7		386,4	299,3
	403,4	321,2		429,4	345,4		385,9	342,4

III. ESPECTROMETRÍA DE ENERGÍA DISPERSIVA

A	Sésamo n= 4					Desmineralizada n= 4				
	04/05/2015		Ca	P	Ca/P			Ca	P	Ca/P
	M 1	Trat1	61,65	38,35	1,608	M 1	coc1	61,17	38,83	1,575
		Trat2	60,17	39,83	1,511		coc2	61,17	38,83	1,575
		Trat3	64,11	35,89	1,786		coc3	61,15	38,85	1,574
	M 2	Trat4	62,04	37,96	1,634	M2	coc4	61,4	38,6	1,591
		Trat5	62,31	37,69	1,653		coc5	61,3	38,7	1,584
	M 5	Trat14	60,43	39,57	1,527		coc7	62,03	37,97	1,634
		Trat16	60,49	39,51	1,531	M 3	coc20	62,08	37,92	1,637
13/07/2015	MD	D1	63,16	36,84	1,714	MS	S1	62,21	37,79	1,646
		D2	65,29	34,71	1,881					
		D3	63,98	36,02	1,776					
		D4	64,38	35,62	1,807					

B	Saliva 24 h					Desmineralizadas			
		n= 4					n= 3		
	21/08/2015	Ca	P	Ca/P		01/04/2016	Ca	P	Ca/P
M0	Sal1 M0	61,94	38,06	1,63	M2	Control sal 3	61,57	38,43	1,60
	Sal2 M0	62,43	37,57	1,66	M3	Control sal 4	61,5	38,5	1,60
	Sal3 M0	61,33	38,67	1,59		Control sal 5	60,89	39,11	1,56
M1	Sal1 M1	61,75	38,25	1,61		Control sal 6	61,97	38,03	1,63
	Sal2 M1	62,06	37,94	1,64	M4				
	Sal3 M1	61,74	38,26	1,61					
	Sal 4 M1	59,84	40,16	1,49					
M2	Sal1.M2	59,19	40,81	1,45					
	Sal2. M2	59,26	40,74	1,45					
M3	Sal1 M3	59,24	40,76	1,45					
	Sal2 M3	59,43	40,57	1,46					
	Sal3 M3	60,46	39,54	1,53					

C		Sano			
		n= 6	calcio	fosforo	Ca/P
29/05/2017	Sano	sano 1	61,78	38,22	1,62
		sano 2	62,05	37,95	1,64
		sano 3	61,88	38,12	1,62
12/06/2017	M1	sano 2	64,11	35,89	1,79
		sano 3	63,46	36,54	1,74
		sano 4	61,96	38,04	1,63
	M2	sano 5	65,94	34,06	1,94
		sano 6	66,28	33,72	1,97
	M3	sano 7	66,17	33,83	1,96
		sano 8	66,53	33,47	1,99
		sano9	62,65	37,15	1,69
	M4	sano 10	62,43	36,47	1,71
		sano 11	62	38	1,63
		sano 12	63,39	36,61	1,73
	M5	sano 13	62,98	37,02	1,70
		sano 14	62,68	37,32	1,68
		sano 15	65,39	34,61	1,89
		sano 16	65,13	34,87	1,87
		sano 17	63,58	36,42	1,75

IV. MUESTRAS

Muestras V y P



Muestras



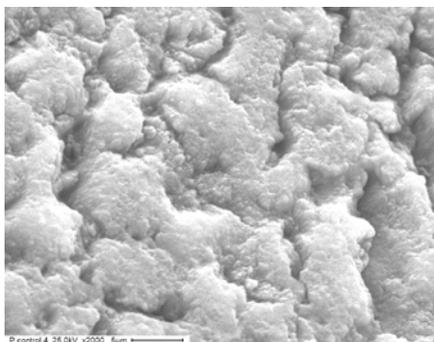
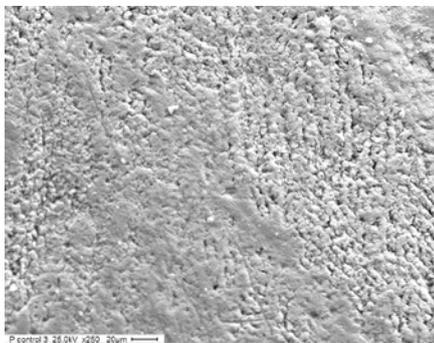
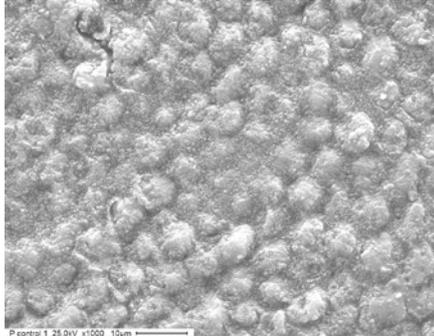
Muestras MEB



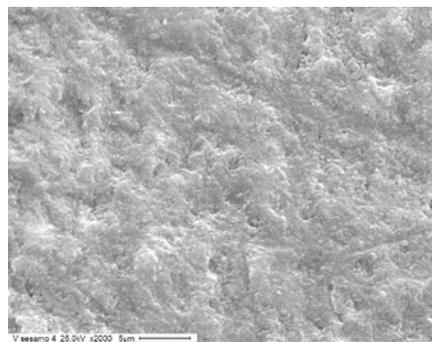
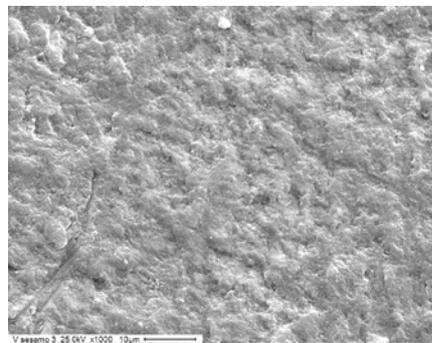
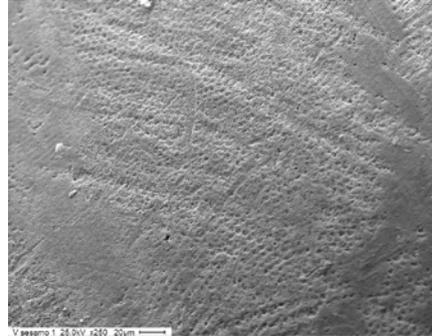
V. MICROGRAFÍAS MEB-EDS

CINDECA 27/3/15

Muestras P Control

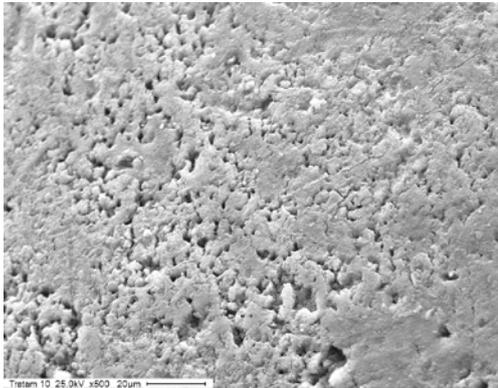


Muestras V Sésamo



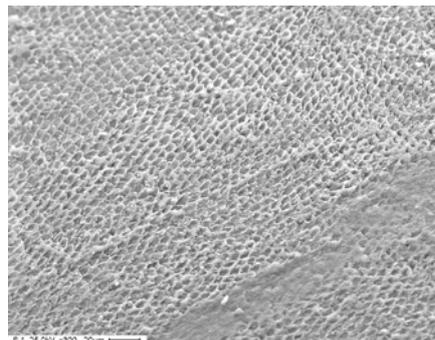
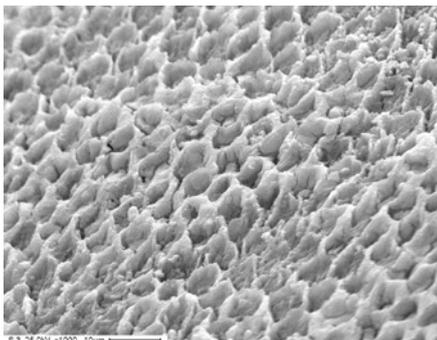
CINDECA 4/5/15

Tratamiento sésamo 24 h sin saliva

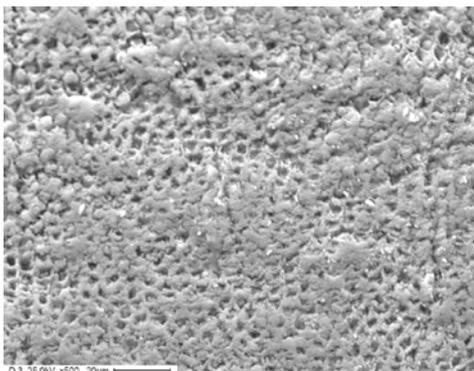


CINDECA 13/7/15

Muestras S: control con gaseosa 24 h sin saliva artificial

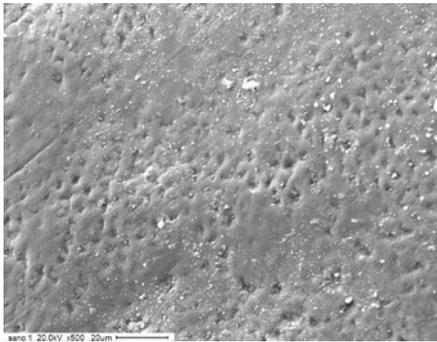
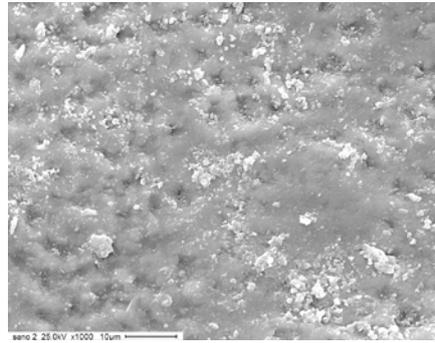


Muestra D: tratamiento con sésamo 24 h sin saliva artificial

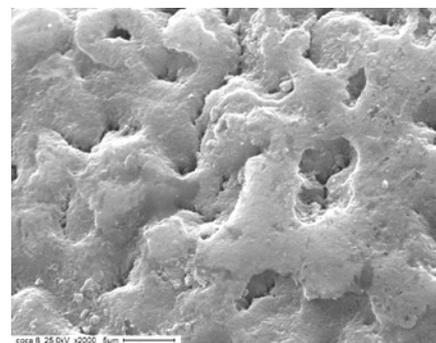
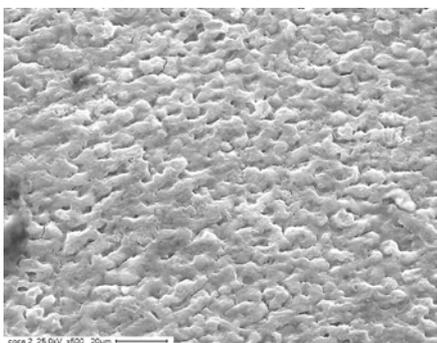
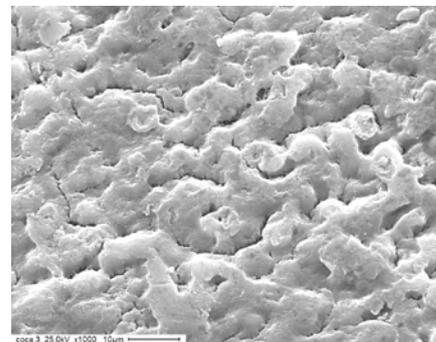
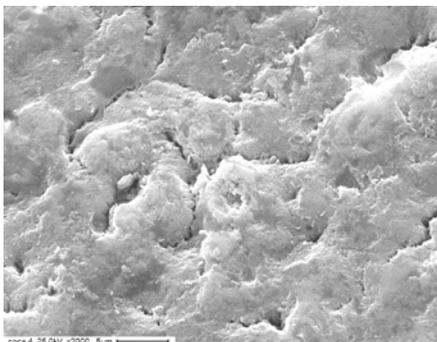


CINDECA 17/11/14

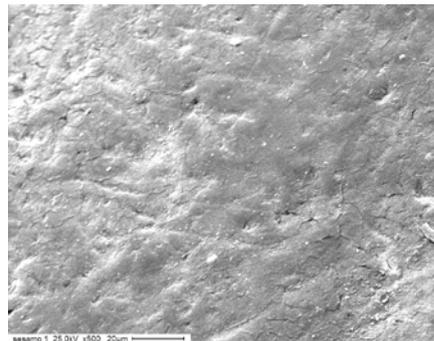
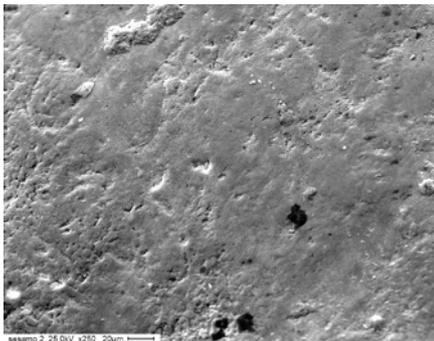
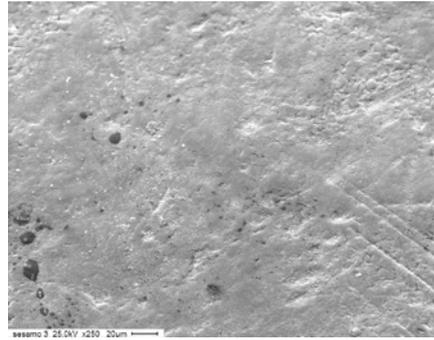
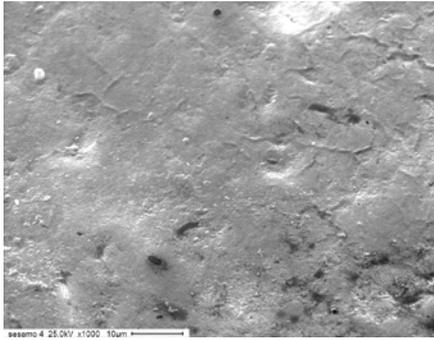
SANO



GASEOSA SIN SALIVA

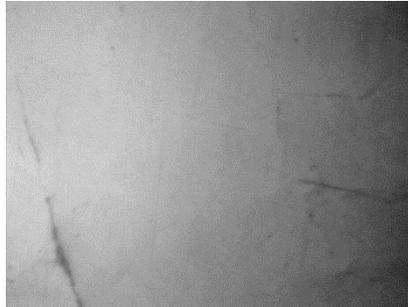
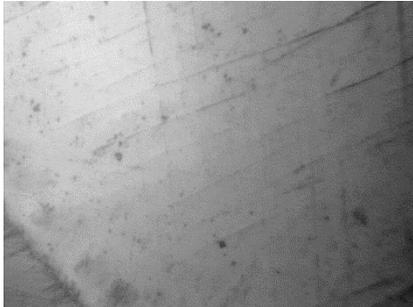


SESAMO CICLADO EN SALIVA

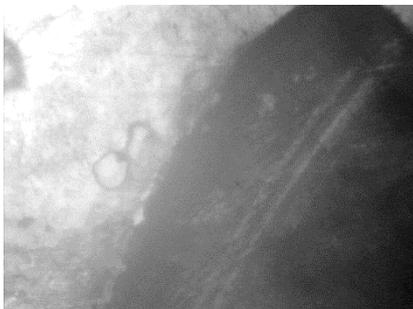


VI. IMÁGENES DE LAS MUESTRAS ENSAYADAS EN EL TRIBOINDENTER

Muestras sanas



Muestras tratadas con SÉSAMO 24 h



**VII. MICRODUREZA DEL RÉGIMEN ESTÁTICO 24H.
TRIBOINDENTER**

Muestra	SANO			DESMINERALIZADO		
	Hardness	Modulus	Contact Depth	Hardness	Modulus	Contact Depth
1- I	4,69	85,64	159,18	0,281		18,25 711,12
2- II	3,96	86,88	178,28	0,0523		5,97 1733,85
3-III	3,43	84,74	190,86	0,0476		7,71 1810,26
4- IIII	5,65	96,37	142,2	0,0589		8,73 1619,14
4- V	2,85			DESCARTAR		
6- VI	3,58	74,93	183,78	0,3685		21,91 625,62
7- VII	5,48	96,98	145,64	0,7104	50,69	MUY ALTO 439,96
8- VIII	8,56			VALORES MUY ALTOS		
9- IX	22,15			VALORES MUY ALTOS		
10- X	4,73	101,6	164,09	0,1262		15,44 1103,59
11- XI	4,61	129,95	161,52	0,024		5,95 2573,18
12	5,06	88,97	151,75	0,1027		16,31 1207,77
13	4,87	86,95	155,44	0,028		6,93 2365,41
14	3,99	86,24	175,76	0,18		16,43 911,06
15	4,45	89,83	164,99	0,07		11,69 1405,02
16	5,14	88,92	150,47	0,0734		12,18 1438,27
17	4,8	96,54	156,55	0,0646		10,19 1542,78
18	4,11	79,16	171,4	0,0604		9,69 1596,06
19	4,9	92,1	154,78	0,0422		8,95 1913,39
20	4,31	87,78	168,190	0,0582		10,7 1628,55
21	4,33	89,63	166,41	0,0656		12,99 1548,65

MUESTRA	SANO			DESMINERALIZADO			
	HARDNESS	MODULUS	CONTACT DEPTH	HARDNESS	MODULUS	CONTACT DEPTH	
II	3,96	86,88	178,28	0,0523	5,97	1733,85	
III	3,43	84,74	190,86	0,0476	7,71	1810,26	
IIII	5,65	96,37	142,2	0,0589	8,73	1619,14	
12	5,06	88,97	151,75	0,1027	16,31	1207,77	
13	4,87	86,95	155,44	0,028	6,93	2365,41	
14	3,99	86,24	175,76	0,18	16,43	911,06	
15	4,45	89,83	164,99	0,07	11,69	1405,02	
16	5,14	88,92	150,47	0,0734	12,18	1438,27	
I	4,69	85,64	159,18	0,281	18,25	711,12	
VI	3,58	74,93	183,78	0,3685	21,91	625,62	
X	4,73	101,6	164,09	0,1262	15,44	1103,59	
XI	4,61	129,95	161,52	0,024	5,95	2573,18	
17	4,8	96,54	156,55	0,0646	10,19	1542,78	
18	4,11	79,16	171,4	0,0604	9,69	1596,06	
19	4,9	92,1	154,78	0,0422	8,95	1913,39	
20	4,31	87,78	168,190	0,0582	10,7	1628,55	
21	4,33	89,63	166,41	0,0656	12,99	1548,65	
n= 17	4,61	88,92	164,09	0,0646	10,7	1548,65	MEDIANA
	4,51	90,95	164,45	0,10	11,77	1513,75	PROMEDIO
	0,58	11,82	12,70	0,09	4,57	515,5	DESV