



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
Facultad de Odontología

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS EN
ODONTOLOGÍA
"DR. KEISABURO MIYATA"

Especialidad en Ortodoncia

"Análisis de la composición química del esmalte en
órganos dentales tratados con plasma no térmico.
Estudio piloto"

PROYECTO TERMINAL

Que para obtener el diploma de
Especialista en Ortodoncia

Presenta

Alumna:

C.D. KAREN ROSARIO LUÉVANO MUÑOZ

Directora:

DRA. EN C. S. EDITH LARA CARRILLO

Tutores adjuntos:

DR. EN P.M.B. VÍCTOR HUGO TORAL RIZO
E. EN O. ANA MIRIAM SANTILLÁN REYES

**Docencia, Investigación
y Compromiso**



2017-2021

Toluca, Estado de México, enero de 2021

Índice

Índice.....	2
1. Antecedentes	3
1.1. Esmalte	5
1.2. Composición Química	7
1.3. Estructura Histológica del Esmalte	9
1.4. Apatitas	11
1.5. Capa de Hidratación	13
1.6. Cambios en Desmineralización ↔ Remineralización	14
1.7. Características de los Cristales.....	16
1.8. Exploración del Esmalte.....	17
1.9. Difracción de Rayos X.....	20
1.10. Microscopia Electrónica de Barrido SEM	21
1.11. Plasma no Térmico	22
1.12. Electricidad Asociada al Plasma no Térmico.....	23
1.13. Toxicidad	23
1.14. Radiación Involucrada en el Plasma	24
1.15. Antecedentes Históricos del Plasma no Térmico	25
1.16. Odontología y el Plasma.....	26
1.17. Gases Nobles	28
2 Planteamiento del Problema	30
3 Justificación.....	31
4 Hipótesis	32
5 Objetivos	32
6 Material y Métodos.....	33
6.1 Diseño de Estudio.....	33
6.2 Poblacion y Universo de Estudio	33
6.3 Muestreo.....	33
6.4 Criterios de Inclusión:	34
7 Resultados	43
8 Discusión.....	59
9 Conclusiones.....	62
10 Referencias Bibliográficas.....	63
11 Anexos	68

1. Antecedentes

En la práctica ortodóncica contemporánea, acondicionar el esmalte del órgano dental es prácticamente un procedimiento de rutina, por lo que se busca continuamente mejorar los protocolos para optimizar tiempos y ocasionar menor daño a la estructura dental.

Pero sabemos, que el fenómeno de desmineralización-rem mineralización es un ciclo continuo que se repite con la ingesta de alimentos y bebidas, donde los carbohidratos al metabolizarse y en conjunto con la placa dental transforman ácidos en un tiempo determinado reaccionan en la superficie del esmalte, la cual cede iones de calcio y fosfato y altera la estructura de la hidroxiapatita gradualmente. De tal forma, que este tejido se vuelve más propenso a remineralizarse por los iones que se encuentran en el medio bucal, después de 30 minutos, si persiste este medio ácido, el pH puede reestablecerse permitiendo este proceso de intercambio iónico influido también por el cepillado que se realice en ese momento.¹⁻⁴

De no ser así, tendremos la primera expresión clínica, la mancha blanca causada por la desmineralización localizada en un área específica, como resultado de las alteraciones sucesivas de pH, ingesta de alimentos, bacterias e higiene oral.

Las manchas blancas en el tratamiento dental son asociadas a la acumulación de placa, y que además acentúan la desmineralización, ésta, puede resultar difícil de remover por la aparatología fija, el grado de apiñamiento incluso condiciones particulares del paciente; seguida de los procesos antes descritos terminando así en lesiones por caries.

Generalmente para la prevención de estas lesiones se busca concientizar al paciente sobre sus hábitos alimenticios, de higiene, en casos específicos se recomienda la aplicación de tratamientos remineralizantes, pero debe reconocerse que no todos los pacientes son cooperadores, ni conscientes de todo esto, por lo que día a día se busca innovar alternativas para combatir esta problemática que facilite la vida a las personas.⁵⁻⁶

Se ha comprobado que el efecto de la saliva natural y de barnices remineralizantes como MIPaste, ClinPro entre otros tienen un efecto positivo en la reacción química

que procede a la re-mineralización, representando una alternativa más a esta problemática.⁶⁻¹⁰

Actualmente la búsqueda de productos que sean biocompatibles con el esmalte dental dando resultados positivos en la hidroxiapatita continúa siendo un desafío para la comunidad odontológica.

Por tanto, con el desarrollo de la investigación presente se busca aportar una opción más al personal odontológico para sus tratamientos futuros, aplicando plasma no térmico con gases nobles en órganos dentales para después hacer su análisis en esmalte dental mediante la tecnología SEM y difracción de rayos X, con el objetivo de sugerir un protocolo *in vivo*.

Los hallazgos encontrados en el presente estudio demostraron una interacción importante en los iones minerales que se encuentran en la estructura superficial del órgano dental después de la aplicación del plasma no térmico cargado con helio durante diferentes períodos.

1.1. Esmalte

Tejido que cubre en su porción externa a la corona del órgano dental, brindando protección a la dentina y a la pulpa gracias a su compleja constitución. Una vez creado es incapaz de renovarse (Figura 1).¹



Figura 1. Fotografía de un órgano dental extraído. Fotografía tomada por Karen Luévano.

Es el tejido más duro del organismo debido a su composición mineralizadas desde la conexión amelodentinaria hasta la superficie externa libre de contacto con el medio bucal.¹

Esta dureza se debe a que posee el 96% de matriz orgánica cristalina, estos cristales se componen de hidroxiapatita, principalmente de fosfato de calcio, lo que lo asemeja a otros tejidos mineralizados el hueso o la dentina; sin embargo, cada uno tiene características propias que los diferencian. El esmalte presenta las siguientes particularidades:¹

1. En su desarrollo embrionario, esta deriva de naturaleza ectodérmica que a su vez deriva de una proliferación localizada del epitelio bucal, momento en el cual se diferencia del resto de los tejidos dentarios de origen ectomesenquima.¹

2. En su composición no se presenta colágeno a pesar de su naturaleza proteica.¹
3. Los cristales de hidroxiapatita están empaquetados de una forma muy compacta, estos son susceptibles a los ácidos, y bajo ciertas condiciones puede dar origen a la caries dental.¹⁻²
4. Los ameloblastos, una vez formados involucionan por un mecanismo de apoptosis desaparecen al pasar la erupción.¹⁻²
5. Es una estructura acelular, avascular y sin inervación.
6. Ciertas condiciones en el medio oral permiten al esmalte reaccionar, con pérdida de sustancia, ya sea que el agente agresor sea físico, químico o biológico, permitiendo cierta remineralización.

En órganos recién erupcionados este tejido está tapizado de una película primaria, de la última secreción ameloblástica, la cual da protección, se va desvaneciendo al entrar en oclusión y suele persistir en la zona cervical, sin embargo, posterior a esto se cubre por una capa exógena de origen salival cambiando las propiedades del esmalte, permitiendo adaptarse gradualmente a el medio oral.¹⁻²

En general, el espesor disminuye desde el borde incisal hacia la región cervical, su grosor no es constante, varía de órgano dental, presenta mayor espesor en la cara vestibular que en su cara lingual, al igual que es mayor en su cara mesial que en la cara distal. Su espesor máximo (2 a 3mm) se encontrará en zonas de gran carga masticatoria, como en las caras oclusales y varía de acuerdo con la zona anatómica y órgano dental (Figura 2).¹⁻²



Figura 2. Fotografías macro de un molar seccionado. Fotografía tomada por Juan Carlos Sarango.

1.2. Composición Química

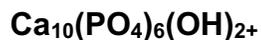
La sustancia adamantina o esmalte tiene 3 principales componentes: una matriz orgánica de (1%), una matriz inorgánica (96%) y agua (3%).¹⁻³

A) *Matriz orgánica:* con naturaleza proteica no colágena, además de ser un sistema complejo de multiagregados polipéptidos que no han sido descifrados de forma definitiva, sin embargo, podemos identificar los siguientes:

1. Amelogeninas: hidrofóbicas, las más abundantes (90%) disminuyen gradualmente.
2. Enamelinas: hidrofílicas, glicosiladas ricas en serína, ácido aspártico y glicina que se localizan en la periferia de los cristales.
3. Ameloblastinas, amelinas: se localizan en la superficie.
4. Tuftelina (proteínas de los flecos): se localizan en la unión amelodentinaria.

En la matriz orgánica del esmalte existen proteínas séricas, enzimas, entre otros elementos que continúan estudiándose.¹⁻⁴

B) *Matriz inorgánica:* compendio de sales minerales cálcicas, mayormente de fosfato y carbonato. Su fórmula general es:



Se depositan sales en la matriz del esmalte, cristalizándolo que genera la materia mineral en cristales.

Los iones de flúor sustituyen a los grupos hidroxilos (OH-) en el cristal de hidroxiapatita, reacción que lo hace menos soluble a la acción de ácidos y menor grado de desmineralización.⁴

Las concentraciones más altas de flúor están en las 50µm más superficiales y en las regiones más profundas la concentración baja hasta 20 veces, el contenido de flúor en el esmalte varía dependiendo de distintos factores: ya sea sistémica o tópica la forma en que se adquirió.⁴⁻⁵

Los cristales de la sustancia adamantina alcanzan una longitud de 100-1.000µm, una anchura de 30-70µm y una altura de 10-40µm. Presentan una morfología de

hexágonos elongados cuando se seccionan perpendicularmente en el eje longitudinal y rectangular cuando se seccionan verticalmente.⁵⁻⁶

Están conformados por celdillas unitarias, parecido a una red, estas con funciones básicas de asociación iónica de sales minerales en el centro del cristal.⁵⁻⁶

Existe también un grupo de iones de calcio en la superficie externa del hidroxilo y por dentro del hexágono de calcio.

Los iones fosfato se colocan entre los iones de calcio que ocupan los vértices del hexágono externo.

En el esmalte existen dos compuestos más abundantes: el flúor y los carbonatos, que reaccionan de forma antagonista influidos por la saliva. El flúor adherido a los cristales aumenta su resistencia al ataque ácido, mientras que un mayor porcentaje de carbonatos lo hace más propenso al inicio de esta, por esa razón se trata de una reacción equilibrada que se compensa constantemente.⁵⁻⁶

C) Agua: Es poca y disminuye gradualmente con la edad, localizada en la periferia del cristal, formando una capa de hidratación, que también da lugar a un papel fundamental.⁵⁻⁶

1.3. Estructura Histológica del Esmalte

A) Unidades Estructurales Primarias

- **Prismas del esmalte.** estructuras alargadas con orientación oblicua, estos bastoncillos van de los 5 millones, en los incisivos inferiores laterales hasta los 12 millones en los molares, están sobrepuestos entre sí, tienen 4 μm de diámetro y algunos llegan a medir 8 μm . (Figura 3).⁶

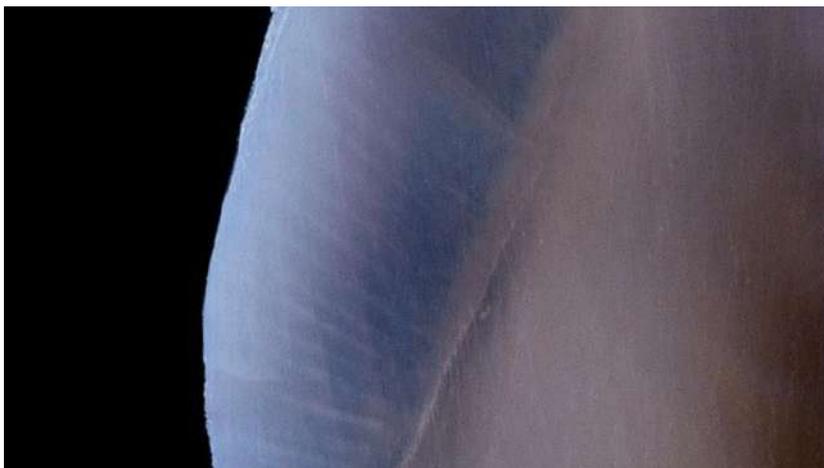


Figura 3. Fotografía macro de corte en esmalte. Fotografía tomada por Juan Carlos Sarango.

- **Esmalte aprismático.** Es carente de estos bastoncillos o prismas. Se localiza en la superficie externa del esmalte prismático.⁶

B) Unidades Estructurales Secundarias

- **Penachos adamantinos o de Linderer.** Esta formación estructural asemeja a las fisuras del esmalte y también se les compara a fallas geológicas por su forma irregular y forma no constante de aparecer sin tener un papel relevante hasta hoy (Figura 4).⁷⁻⁸

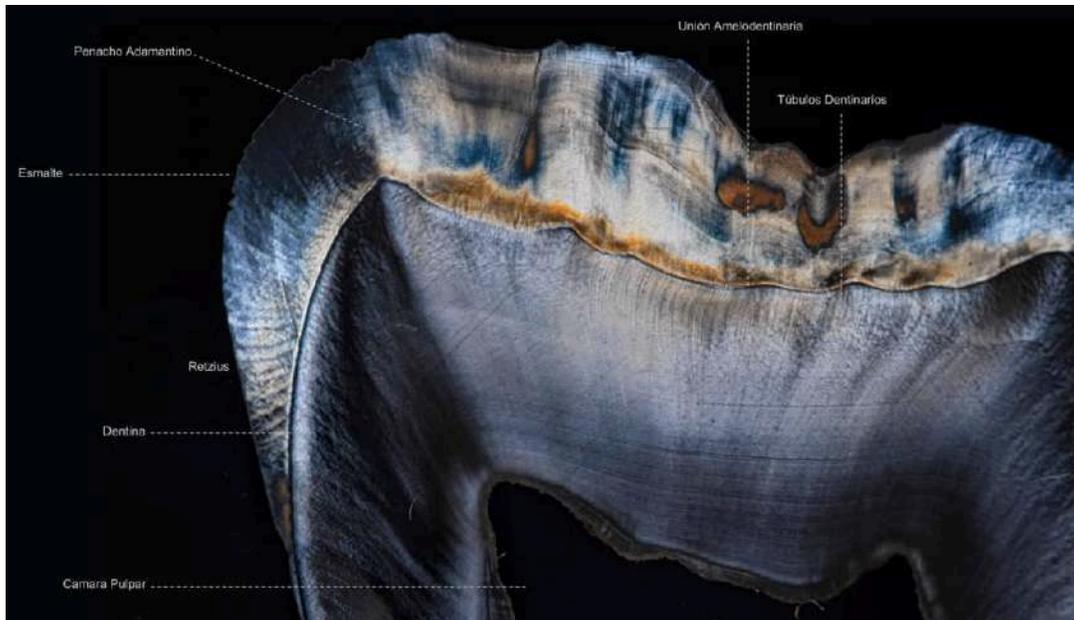


Figura 4. Corona dental con técnica de polarización cruzada. Fotografía tomada por Martin Flores.

- **Estrías de Retzius.** También se le conoce como línea neonatal. Son estructuras que aparecen por desgaste en forma de líneas de color Marrón.
- **Esmalte nudoso.** Está formado por un entrelazado de prismas adamantinos de forma irregular asemejando un nudo entre los bastoncillos, por lo que de ahí parte su nombre.⁶⁻⁹
- **Husos adamantinos.** Pequeñas estructuras con aspecto de prolongaciones engrosadas de forma irregular que se encuentran a nivel de la CAD.⁸⁻⁹
- **Cutícula del esmalte.** En algunos libros se refieren a esta como membrana de Nasmyth. Consiste en una membrana delgada que cubre toda la corona recién erupcionado, y que representa la última producción de los ameloblastos hasta su erupción, momento en el cual comienza a desvanecerse gradualmente.
- **Laminillas de esmalte.** Son conformaciones finas y delgadas parecidas a laminas que se localizan desde la superficie del esmalte hacia la unión amelodentinaria. Están compuestas por material orgánico, pero con poco contenido mineral. Pueden confundirse con fisuras en cortes sin embargo éstas están presentes sin ser fisuras o fracturas.⁹

1.4. Apatitas

Palabra usada para los componentes que dan lugar a la fase mineral del hueso, dentina o esmalte, esta fase tiene su porcentaje en iones los cuales varían de tejido a tejido. Forman parte de un grupo de compuestos iónicos, cuya fórmula química general es:



Representando cada uno a:

Me = ion divalente (calcio)

XO = ion trivalente (fosfato)

Y = ion monovalente (hidroxilo)

Conformación que tiene forma de una columna hexagonal de grupos fosfatos (PO_4^{3-}) con dos túneles paralelos a su eje central, uno ocupado por iones de calcio Ca^{2+} , otro con oxígeno (O) y el último por iones hidroxilo OH^- muy semejante a la siguiente imagen (Figura 5).⁷⁻¹⁰

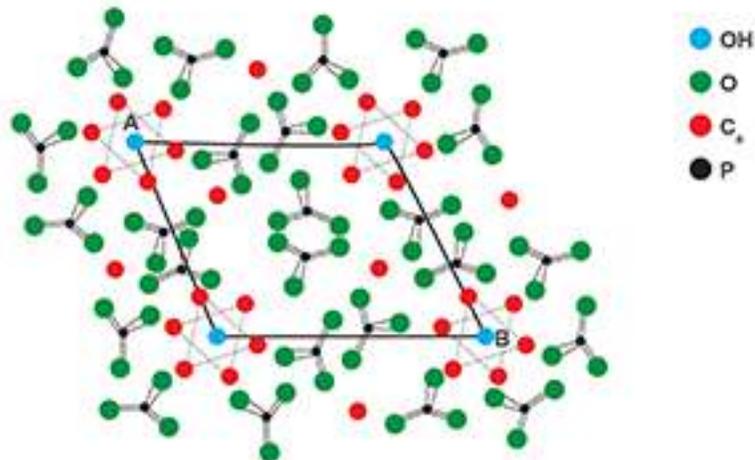


Figura 5. Representa los iones de oxígeno, calcio, fósforo y los iones hidroxilo. Fuente: Gasga J "Observación del esmalte dental humano con microscopía electrónica".⁴

Esta fórmula de sistema iónico permite realizar sustituciones de iones sin generar un cambio estructural importante, permitiendo los cambios estructurales iónicos necesarios. Lo anterior funciona en otros tejidos para eliminar elementos tóxicos, sin embargo, en el caso del esmalte, sirve para mantener un equilibrio en la reacción y generar cambios que le permitan adaptarse al medio bucal, adquiriendo las propiedades que se requieran en la condición generada, ya sea por la alimentación, hábitos de higiene, pH salival y temperatura.⁷⁻¹⁰

Cuando se da el intercambio de iones y obtiene cargas eléctricas diferentes, se necesita la misma reacción busca una carga que compense, para conservar la neutralidad eléctrica en la reacción química, lo que puede crear espacios en la estructura de la columna del esmalte que puede traducirse en una apatita deficiente en calcio u otro elemento (denominado línea oscura en una vista por microscopio electrónico).⁷⁻¹⁰

De esta forma el esmalte logra tener intercambio de iones de carbonatos por fosfatos, OH⁻ etc. y por consiguiente estos iones OH⁻ intercambian lugar por los F⁻, y es la apatita del esmalte que queda a adaptarse a el medio bucal.

Esta reacción es la que hace posible la sustitución de carbonatos por fosfatos, por OH⁻ o por ambos. Estas partes carbonatadas son las que dan oportunidad del cambio iónico entre los grupos OH⁻ y los F⁻. Existe la cantidad y proporción de elemento ideal para que se dé la estequiometría. Esta es la propiedad que lo mantiene estable y que le da resistencia contra ataques ácidos de toda naturaleza.⁷⁻¹⁰

La forma en que este tejido se va a adaptar dependerá de su composición química y grado de mineralización, el tamaño de sus cristales y su proyección y de la calidad de la saliva que se tenga en el medio bucal, la frecuencia de los ataques ácidos y a medida que estos se prolonguen y permitan a la apatita volver a su reacción original o de remineralización.¹⁰⁻¹¹

1.5. Capa de Hidratación

Esta zona superficial, hidratada, cuenta con la presencia de diversos iones móviles, responsables de la conductividad eléctrica de esta zona. ⁷⁻¹¹

Tabla 1.- Tabla de relación de la capa hidratada y solución constante.

Estructura	Capa de hidratación	Solución
	HPO_4^{2-} Ca^{2+} CO_3^{2-}	Ca^{2+} HCO_3^- HPO_4^{2-} Pr Ca^{2+} $\text{H}_2\text{PO}_4^{2+}$

Fuente: Revista CES disponible en: <http://alfonsoescobar.integ.ro/interna-mod-2.html?action=main>

-Propiedades de las apatitas

Las principales propiedades se describen a continuación:

- La maduración (Ostwald) caracterizada por la disminución de la energía superficial del sólido y disolución de los cristales más pequeños para beneficio de los más grandes le da estabilidad.¹⁰⁻¹¹
- El intercambio iónico, de iones provenientes de la zona de hidratación mediante reacciones reversibles.¹⁰⁻¹¹
- La adsorción hace referencia a la masiva liberación de proteínas de la zona de hidratación como resultado del intercambio iónico.¹⁰⁻¹¹

1.6. Cambios en Desmineralización ↔ Remineralización

El fenómeno de desmineralización – remineralización es un proceso que se da durante todo el día, sin importar las condiciones, por las características del esmalte, saliva, ingesta de alimentos y hábitos de cada individuo, se puede iniciar aproximadamente 30 min después de cada ataque ácido, sin embargo, dependerá de la prolongación del ataque ácido y el efecto buffer de la saliva, donde se pueden plantear tres escenarios:

Tabla 2.- Cambios en el equilibrio mineral.

D ~ R: Hay equilibrio, entre el pH, la remineralización dental y la dieta, fenómeno que se observa en una boca sana con buena higiene bucal.

D > R: Son más los minerales que se pierden (desmineralización) que los que se reincorporan del medio húmedo que baña al esmalte (remineralización). En esta situación se forma una mancha blanca activa que puede progresar a la lesión cavitada.¹⁰⁻¹¹

D < R: En esta situación al crear un medio ambiente favorable (remoción profesional de la bio-película dental acompañada de una buena higiene bucal diaria), se facilita la reincorporación de los minerales perdidos. Este fenómeno puede acelerarse mediante el uso de soluciones re-mineralizantes ricas en calcio y fosfato, con o sin fluoruros.¹⁰⁻¹¹

Fuente: Revista CES Disponible en: <http://alfonsoescobar.integ.ro/interna-mod-2.html?action=mai>

Se puede resumir que la caries es el resultante de la pérdida de equilibrio de la saturación de estos iones minerales presentes en la saliva y precipitación que pueda presentar el esmalte, por las condiciones del medio principalmente por calcio y fósforo, donde el flúor desempeña un papel fundamental en proporciones adecuadas, favorable hacia los ataques ácidos.

A continuación, se observa un gráfico donde se muestra que la saturación del flúor convierte la apatita del diente en flúor apatita que puede llegar a conservarlo más resistente a los ataques ácidos, con la desventaja de que lo vuelve más cristalino y frágil, por lo que debe existir un punto medio que se da por la fórmula inicial de la apatita (Figura 6).¹⁰⁻¹³

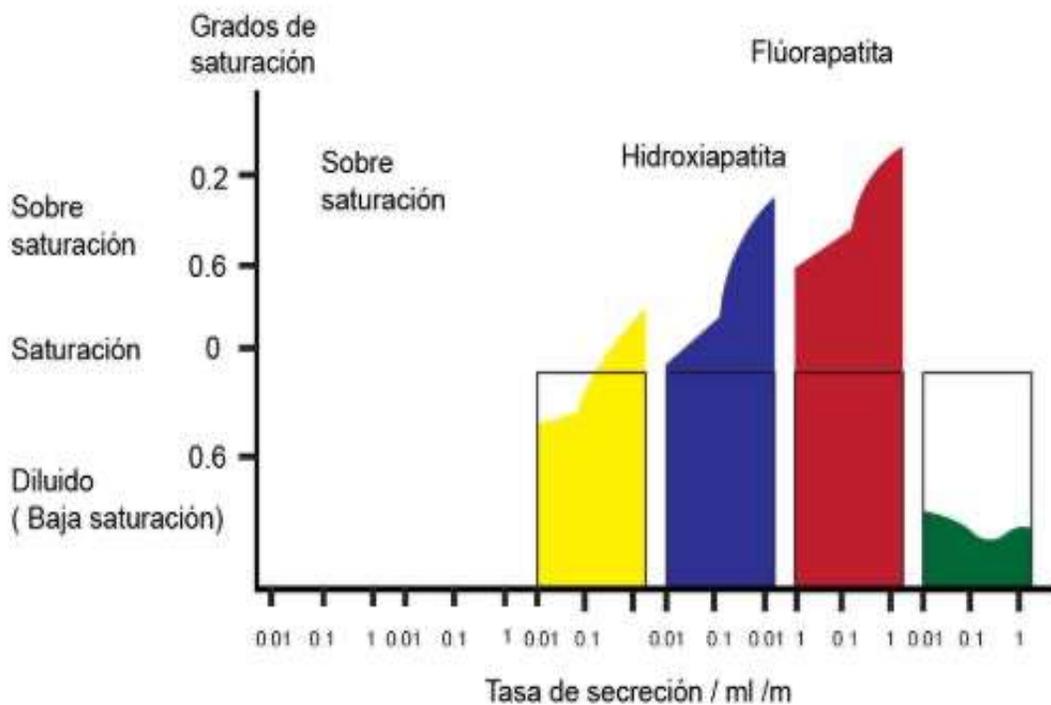


Figura 6.-Gráfica que indica los niveles de saturación comparando los niveles de secreción con cada apatita.⁴

1.7. Características de los Cristales

Cuando la solución se encuentra muy saturada con relación a la fórmula inicial es posible que se dé el crecimiento de los cristales, hablamos de distancias poco significativas como son las micras.¹⁰

Cada cristal crece hasta cierto tamaño con una forma predeterminada, además, porque al encontrarse empaquetados en el prisma del esmalte no tienen suficiente espacio para hacerlo.¹¹⁻¹³

El esmalte “inmaduro” previo a la erupción presenta cristales con ausencia de ciertos iones, eso lo hace poroso y más soluble. Una vez erupcionado, el esmalte está en contacto con los fluidos de la boca, saturándose, dando origen al término de esmalte “maduro”, cuyos cristales son de forma más perfecta, crecen hasta alcanzar su tamaño máximo, es el proceso conocido como “maduración” de Ostwald como resultado de la precipitación del material disuelto sobre las superficies de cristales, menos solubles en proceso de crecimiento.¹³⁻¹⁴

1.8. Exploración del Esmalte

Analizar la superficie dental puede llegar a ser muy complejo por todo lo mencionado anteriormente, sin embargo, se puede analizar desde varios puntos de vista, y existen diferente tecnología que se puede aplicar, por ejemplo, con el análisis químico del diente por medio de la detección de los rayos X, generado por incidir un haz de electrones sobre la muestra se observan las señales del calcio, fósforo, oxígeno, sodio, magnesio y cloro (Figura 7).⁷⁻¹⁵

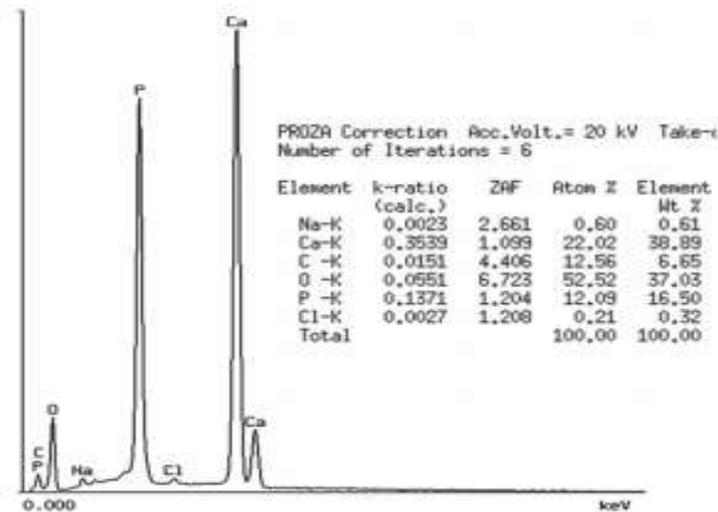


Figura 7.-. Análisis químico mediante espectroscopia por dispersión de energía EDS de los rayos X característicos generada por los electrones al incidir sobre la muestra de microscopio electrónico de barrido. En este espectro se registran elementos calcio, fosforo, oxígeno, carbono, sodio y cloro.⁴

Para observar la superficie del esmalte dental, hay que quitarle un porcentaje en micras del material superficial, esto se logra induciéndolo químicamente con ácido ortofosfórico. Técnica que permite ver que el esmalte está compuesto de pequeñas estructuras en forma de cerradura compactada en una lámina hexagonal (Figura 10).⁷⁻¹⁶

Si por medio de un corte sagital del órgano dental observamos unas líneas de la unión amelodentinaria tienen dimensiones micrométricas y cambiarán de posición oblicuamente de acuerdo con la zona del diente.¹⁷⁻¹⁸

La microscopía electrónica de barrido nos permite estudiar la superficie del esmalte y si observamos los prismas a mayor amplificación podremos ver que estos se componen de millones de cristales a escala nanométrica. Estos cristales y están unidos lo más juntos posible pero rodeados de material orgánico.¹⁹⁻²⁰

El pulido final, proceso que en ocasiones se requiere, se obtiene erosionando atómicamente por medio de un haz iónico pulidor y este permite además los estudios de la interfaz entre los cristales y el de las interacciones entre estos. Por ejemplo, en la figura se muestra una muestra del espectro de difracción por rayos X reaccionando con el polvo de esmalte y los cursores en rojo muestran el espectro identificado como hidroxiapatita (Figura 8).²⁰

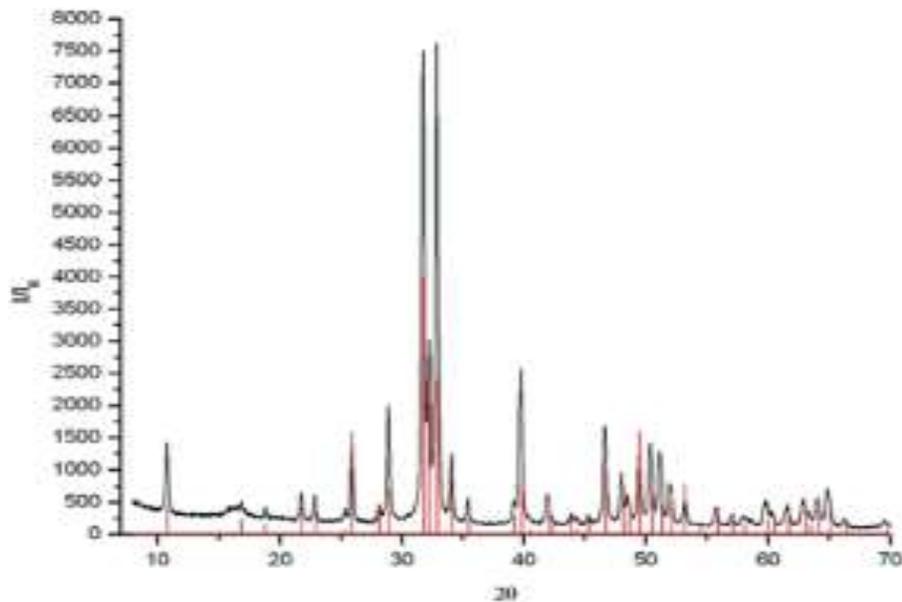


Figura 8.- Espectro de difracción de rayos X al reaccionar el polvo de esmalte, los cursores en rojo indican que el espectro identificado como hidroxiapatita.⁴

La hidroxiapatita se puede presentar como una columna unitaria monocíclica, sin embargo, por medio de la microscopia de transmisión, al igual que la difracción de rayos X demuestran que el esmalte dental presenta una celda unitaria hexagonal.²¹⁻²²

En el estudio de la estructura y composición química de la hidroxiapatita, en ocasiones se observarán períodos donde ésta se disuelve por un proceso de desmineralización, el cual se le denomina línea oscura.²⁴⁻²⁷ Ésta representa un contraste de 1 a 2 nanómetros, además su contraste dependerá del foco del microscopio: cuando la imagen de un cristal del esmalte está sobre enfocado la línea aparece oscura (de ahí su nombre) y cuando aparece desenfocada aparece blanca y en foco desaparece.²⁰⁻²²

Existen varias hipótesis sobre la estructura y composición de la línea oscura y el papel que representa, esta es el producto de una desmineralización mayor a la del resto de la superficie. (Figura 9)²⁴⁻²⁶

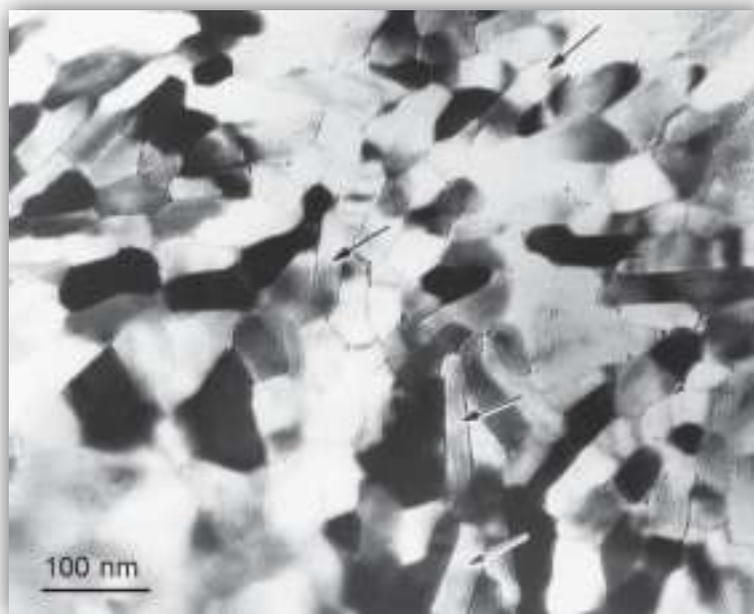


Figura 9.- Imagen de TEM de los cristales de hidroxiapatita que conforman el esmalte dental, nótese el tamaño de los cristales y lo compacto de su arreglo. Las flechas indican la presencia de línea oscura en centro de algunos de los cristales.⁴

1.9. Difracción de Rayos X

Resultado de un estudio que se ocasiona cuando un haz monocromático de rayos X de una determinada longitud de onda se cruza con una sustancia cristalina formando un ángulo y se puede medir mediante un software.²³

Este haz y su dispersión mantienen la misma onda a lo que se le llama “dispersión de rayos X coherente” que no se encuentra distribuida de forma uniforme en el espacio si no solo en la muestra electrónica por medio de coordenadas manipuladas por un software.²³⁻²⁴

Los materiales cristalinos orgánicos e inorgánicos se estudian a través de esta técnica para determinar su estructura atómica molecular, cuando los átomos se tienen ordenados (periódicamente, intensidad y distribución) el haz refleja un patrón de difracción de la muestra y su estructura interna.²³⁻²⁵

Se puede predecir con base en la ley de Bragg la dirección en la que se da la interferencia constructiva entre los rayos y el cristal, por lo que es importante conocer ese punto para poder repetirlo en otra muestra.²⁶

$$\text{Ley de Bragg: } n \lambda = 2 d \sin \theta$$

Dónde “ λ ” significa la longitud de onda del haz de rayos X incidente, d el espacio de los planos cristalográficos y θ el ángulo de Bragg al que se produce la difracción (Figura 10).

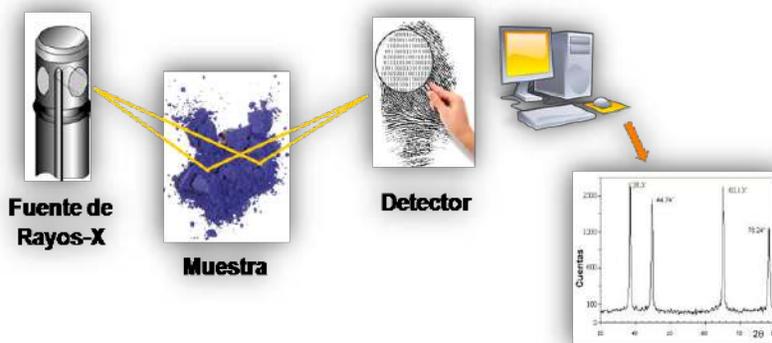


Figura10.-Difraccion de rayos X. Fuente: <https://www.xdataser.com/index.php/difraccion-de-rayos-x/>

1.10. Microscopia Electrónica de Barrido SEM

Es una de las técnicas de análisis, topográfico estructural con imagen y composición química para la generar de imágenes utilizadas en investigación de materiales debido a su alta resolución y gran capacidad de analizar características morfológicas de diversas muestras.²⁷⁻²⁸

La idea básica de actividad es la siguiente: Primero se genera un haz de electrones de alta energía (o electrones incidentes EI) y se usa un sistema de lentes para focalizar el haz y hacerlo incidir sobre una muestra, la cual generará, a su vez, electrones (llamados secundarios y retro dispersados con siglas SE y BSE, respectivamente) como respuesta al impacto electrónico, y dichos electrones que salen de la muestra son detectados mediante dispositivos que registran cada uno la cantidad de electrones detectados y lo convierten en una señal digital que se interpreta como intensidad de color, para construir una imagen aunque no se usen fotones (ejemplo: Figura 11).²⁷⁻²⁸

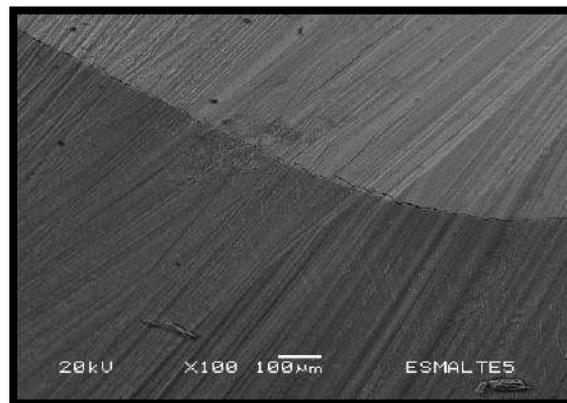


Figura 11.- Fotografía de esmalte dental tomada desde el microscopio electrónico de barrido por el ININ.

1.11. Plasma no Térmico

En el área de la física se refiere al cuarto estado de la materia.

Sir William Crookes, un físico británico, descubrió el plasma en 1879 e Irving Langmuir lo nombró en 1929.

Este puede existir en un amplio rango de temperaturas sin cambiar de estado ya que está parcialmente ionizado, es el estado más abundante y se encuentra en un 99% del universo visible, por ejemplo, las luces del norte son frías como el hielo, mientras que el centro de una estrella distante es extremadamente caliente.²⁹

El plasma, como las partículas de gas, no tiene una forma definitiva. Sin embargo, la presencia de campos eléctricos y magnéticos lo vuelve maleable.

Las diversas formas de crear plasmas incluyen radiofrecuencia, Corrientes Continuas o Corrientes Alternas de alto voltaje, frecuencias de microondas, etc.³²

Los plasmas se clasifican como “térmicos” o “no térmicos” de acuerdo con su temperatura. Los electrones del plasma no térmico (NTP), son más calientes mientras que los iones y los neutros permanecen a temperatura ambiente. Recientemente, se ha presentado una fuente de NTP con una temperatura <40 ° C en el punto de aplicación que ofrece la posibilidad de tratar a los seres humanos por su baja influencia negativa en ellos.²⁹⁻³⁰

El plasma atmosférico frío (CAP) también se conoce como NTP debido a la presencia de electrones y partículas pesadas a una temperatura muy alta y a temperatura ambiente. La temperatura en el punto de aplicación es inferior a 104 ° F.²⁹⁻³¹

El plasma se forma a partir de la ionización de un gas noble el cual se centra para ser aplicado por una aguja o cánula de plasma. Se han desarrollado amplias aplicaciones de NTP en el área de la salud por su escasa reacción negativa en humanos. La literatura reciente ha mostrado las aplicaciones para la esterilización de equipos médicos y dentales, el envasado de alimentos en la industria alimentaria, la coagulación de la sangre, la promoción de la curación de heridas, como catalizador de materiales, etc.²⁹⁻³²

1.12. Electricidad Asociada al Plasma no Térmico

A presión atmosférica, que logra el rompimiento en un gas puede ser bastante alto: desde cientos de Volts hasta kV, de acuerdo con el tipo de descarga, la separación entre los electrodos y la composición del gas. Se hace notar que la electricidad representa un peligro. Los voltajes eléctricos que inducen tales fenómenos pueden ser considerablemente altos; la razón de su inocuidad se encuentra en una muy baja corriente eléctrica y, en consecuencia, una baja disipación de energía. El límite de seguridad se encuentra alrededor de 100 kHz, así que una gran cantidad de equipos opera a 300 kHz o más.²⁹⁻³³

1.13. Toxicidad

El plasma promueve el flujo de radicales y otras especies activas. Los radicales libres se han ganado una reputación inexacta en biología y medicina, debido a su capacidad de causar daño a las células dañadas, en especial, las especies reactivas del oxígeno (ROS). La familia ROS comprende radicales como O, OH y HO₂, aniones de peróxido O₂⁻ y HO₂⁻, ozono y peróxido de hidrógeno. Especies que se crean fácilmente en el aire y el agua, y viven para llegar a la célula. Cuando el nivel de ROS en los fluidos del cuerpo es alto ocurren varios tipos de daño, conocidos bajo el nombre común de estrés de oxidación. Los radicales de oxígeno en elevadas concentraciones aceleran eventos como el envejecimiento celular ya sea a nivel de lípidos, bases de ADN u proteínas, si bien se puede reducir temporalmente la actividad enzimática.²⁹⁻³³

En otro orden de ideas, los radicales libres también tienen son funcionales para el cuerpo humano. Pequeñas cantidades de radicales libres son producidos por el propio organismo. Por ejemplo, los macrófagos generan ROS para destruir las bacterias invasoras; las células endoteliales producen óxido nítrico, para regular la dilatación de la arteria. No está completamente claro qué concentraciones de radicales son indispensables para el buen funcionamiento del cuerpo, y en qué grado de exceso son demasiado peligrosos.²⁹⁻³³

1.14. Radiación Involucrada en el Plasma

Es conocido que la irradiación UV puede causar lesiones en las células de forma negativa, por ello es necesario conocer los efectos de las longitudes de onda sobre dichas lesiones, sobre todo si se emplearán directamente en personas. El intervalo de interés puede restringirse a la siguiente clasificación:

- UV-A (rango de trabajo en 315-380nm de onda) es la zona menos nociva, provoca lesiones de la piel, y también puede acelerar su envejecimiento.
- UV-B (el cual trabaja en el rango de 280-315nm) es la zona donde absorbe el ADN.
- UV-C (rango de 100-280nm) esta zona es más agresiva que la UV-B, daña las células, proteínas y lípidos celulares.

Diversos investigadores han determinado que la radiación UV-B y UV-C puede inactivar eficientemente las bacterias, si bien, en todos sus intervalos, es por eso por lo que se ha implementado mucho la terapia con láser hasta en el área de alimentos, el UV es un factor importante en la esterilización bacteriana por plasmas de baja presión. Sin embargo, los plasmas no-térmicos por debajo de la presión atmosférica son, generalmente, pobres fuentes de radiación UV; trabajan en el espectro visible, así, la potencia irradiada en la zona de 200-300nm es del orden de 1 mW/cm².²⁹⁻³⁴ En los plasmas no térmicos la radiación UV es de intensidad débil y por lo tanto puede no tiene mucho efecto sobre las células. La respuesta específica en las células es probablemente inducida por otros factores, como la química que compone el plasma.²⁹⁻³⁵

1.15. Antecedentes Históricos del Plasma no Térmico

El físico inglés William Crookes se dio cuenta que ciertos gases se comportaban de forma distinta al experimentar con descargas eléctricas en estos, a diferencia de un gas regular, el cual denominó “cuarto estado de la materia”.³⁵⁻³⁶

Seguido a este suceso, en 1923 Irving Langmuir, empezó a investigar a conciencia las descargas eléctricas puesto que ya se sabía que éstas ionizaban parcialmente. A partir de esto, implementó por primera vez la palabra plasma en el informe de un trabajo científico, y con Levy Tonks, descubren una nube de electrones que brillaba y se movía, que podía emerger del interior del gas durante la descarga y poco a poco esta se volvía maleable, de forma semejante al plasma sanguíneo, de ahí su nombre.³⁷

Después de numerosas pruebas, fue Langmuir el primero en notar la separación de plasmas de acuerdo con diferentes densidades, temperaturas o intensidades magnéticas en regiones semejantes a las células, separadas por corrientes eléctricas.³⁸

El físico soviético Lev Landau en 1936 propuso una teoría estadística la cual describe el plasma y que empezó a tener aportaciones de otros científicos como el sueco Hannes Alfvén quien aportó el desarrollo de ecuaciones que detalla el movimiento de un fluido eléctrico con influencia de campos magnéticos, tiempo después, el mismo Landau puntualizó matemáticamente la interacción entre las ondas en un plasma y las partículas, considerado un gran impacto para el entendimiento de los plasmas calientes tanto en las estrellas como en el laboratorio ya que a partir de estos trabajos nació el estudio de los plasmas en la física actual.³⁶⁻³⁸

No fue, sino hasta 1952 cuando otros dos físicos estadounidenses, David Bohm y David Pines, tomaron en cuenta por primera vez la aplicabilidad general del concepto del plasma a partir de los movimientos colectivos de los electrones y no por su definición plasma.³⁸

El plasma así fue acaparando fama en diversos campos. No está completamente documentado cuando se usó por primera vez en la odontología, sin embargo, se cree que Eva Stoffles desarrolló la primera investigación con un enfoque hacia un posible

tratamiento terapéutico e introdujo en el año 2002 el concepto de un reactor de aguja de plasma adaptado al tratamiento alternativo de las cavidades de los órganos dentales antes de ser obturadas. La idea cobró interés debido a que la aguja de plasma tiene el propósito de inactivar las bacterias de la placa dento-bacteriana y detener la caries por medio del uso de un micro-plasma frío a presión atmosférica. El tratamiento no provoca ni el calentamiento de la pieza, ni el deterioro de material sano sin mencionar que el estrés por el ruido de la pieza de alta que se genera en los pacientes se ve disminuido, ventajas que, hasta ese momento, sólo el tratamiento por láser podía ofrecer.³⁸⁻³⁹

Hoy en día se continúa experimentando con la caracterización del plasma y en construir un protocolo estandarizado que permita su uso de forma segura sin reacciones adversas y permitiendo al operador optimizar tiempos costos y brindar mayor comodidad a los pacientes con tratamientos de calidad.

1.16. Odontología y el Plasma

Las tendencias de la tecnología en plasma son aplicables en el área de la salud. En particular, el tratamiento no invasivo del tejido vivo se logra con el tratamiento de plasma en las áreas dañadas por diferentes motivos, y este va permitiendo la inactivación de bacterias de una manera radical, por lo que una de sus indicaciones es la desinfección y esterilización de instrumentos quirúrgicos y tejidos vivos.⁴⁰⁻⁴²

Esta tecnología no es novedad en países como Francia, u Alemania, sin embargo, en México se requiere aún un doble esfuerzo de investigación para que estas técnicas se aprueben de práctica diaria en el área de la salud y de esta forma tener certeza de que los efectos secundarios sean mínimos.⁴²⁻⁴³

Representa un reto esta línea de estudio ya que se trabaja multidisciplinariamente en áreas como microbiología y biotecnología, para poder estandarizar los procesos y manejar con completo control el plasma no térmico y de los gases nobles sobre los tejidos vivos, las cuales están enfocadas en la esterilización de superficies e instrumental, coagulación de la sangre, cicatrización de heridas, tratamientos en la piel directa con biocompatibilidad.

En el área de odontología se está implementando el uso de plasma no térmico para desinfección de heridas en la boca, cicatrización de éstas, como catalizador de materiales y para aumentar la adhesión entre diversas superficies. Asimismo, la idea que ha cobrado mayor interés de implementar el uso de plasma como tratamiento alternativo de las cavidades dentales antes de ser obturadas, disminuyendo el tiempo operatorio, incomodidad y esterilizando las cavidades previo a la obturación, sin embargo, hasta el día de hoy no se han estandarizado protocolos que permitan su uso de forma segura.⁴³

La principal utilidad de estos gases es la fluorescencia al ser excitado con una pequeña cantidad de energía con un color particular para cada uno de ellos.

El helio es el primer gas noble, con número atómico igual a 2, lo que quiere decir que tiene 2 protones y 2 neutrones en el núcleo y además tiene orbitando a su alrededor 2 electrones, este es el más liviano exceptuando el hidrógeno, Tiene un uso doméstico para inflar globos y dirigibles, carece de efectos toxicológicos y euforizantes, sin embargo, en altas concentraciones puede llegar a sustituir el oxígeno creando hipoxia. Por ello y como medida de seguridad, cuando se está en contacto aéreo con helio se precisa una concentración mínima de un 19% de oxígeno (similar a la del aire: 21% de oxígeno). Sin embargo, esta propiedad, ha dado lugar a su uso aún en terreno experimental desde 1935, y continúa siendo un área sin explorar en diferentes áreas de la salud.

En cuanto al argón, segundo gas con el que se trabajara en el presente trabajo, podemos decir que está presente en el aire de la atmósfera en casi el 1%, usando en su uso más comercial para lámparas incandescentes y fluorescentes, sin embargo, tiene un uso más útil como gas inerte en las soldaduras por arco metálicas.

2 Planteamiento del Problema

El esmalte dental tiene diversas propiedades físicas y químicas según Gómez de Ferraris¹, lo cual le permite estar en el medio bucal de forma estable y brindando protección a los tejidos dentales ante los ataques ácidos que puede llegar a enfrentar. Estas propiedades las obtiene de acuerdo con la composición química que adquiere continuamente gracias a su permeabilidad iónica y a los cambios que se van presentando en la cavidad oral, aun así, estas características del esmalte pueden ser rebasadas por las mismas condiciones y causar pérdida de sustancia.

Dicho de esta forma, conocer la composición química del esmalte ante cualquier cambio que se haga en la interfaz de este, representa un gran reto para los odontólogos, puesto que tendrá gran influencia , con base en esto, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación **¿El uso de plasma no térmico con gases nobles influencia cambios cualitativos o cuantitativos en la composición química de la superficie del esmalte?**

3 Justificación

Durante años se ha estudiado la estructura del esmalte y su comportamiento al medio bucal, y el fenómeno de desmineralización - remineralización se considera un ciclo continuo pero variable que permite a su estructura no tener grandes cambios estructurales a nivel químico, éste se repite con la ingesta de alimentos, y en el caso de ser carbohidratos se metabolizan en la placa dentobacteriana formando ácidos que reaccionan en la superficie provocando un intercambio de iones de calcio y fosfato alterando la hidroxiapatita nuevamente y dejando esas brechas para que pueda remineralizarse, en caso de no prolongarse el cambio ácido, de 30 a 40 minutos el pH sube y los iones minerales se pueden incorporar a la superficie nuevamente. En caso de prolongarse el ataque ácido observaremos una mancha blanca clínicamente como resultado de las alteraciones sucesivas del pH.

Actualmente existe una gran incidencia en la aparición de lesiones clínicas de mancha blanca, que afecta a la población en general, lesiones que sin un manejo correcto pueden terminar en lesiones amplias afectando la salud oral y por ende la salud general de los pacientes, debido a esto se ha recurrido a diversos tratamientos que aunque son efectivos suelen ser agresivos para la superficie del esmalte, por lo que la brecha de investigación sobre el empleo del tratamiento con plasma no térmico podría ser una alternativa viable para promover el flujo y el intercambio iónico en la superficie del esmalte disminuyendo la precipitación de iones desmineralizándolo, influenciando una disminución de bacterias de la placa dental, relacionadas con la pérdida de sustancia gradual, previo a cualquier obturación sin causar efectos no deseados o manteniendo sus propiedades estables previas a un tratamiento de grabado ya sea por motivos protésicos u ortodóncicos, sin obtener efectos adversos y optimizando los tiempos de consulta para el odontólogo. Para tratar de contestar las preguntas de investigación abiertas se ha propuesto la realización de un análisis de la composición química del esmalte en dientes naturales y en dientes tratados con plasma no térmico a manera de un estudio piloto, la intención de identificar cambios

4 Hipótesis

La hipótesis de investigación del presente trabajo propone que la aplicación de plasma no térmico con gases nobles puede favorecer un intercambio de iones, influenciando cambios cualitativos y cuantitativos en la composición química del esmalte dental, por tanto, la hipótesis nula se confirmaría al no identificar los cambios sugeridos.

5 Objetivos

Objetivo General

Analizar la composición química del esmalte después de la aplicación de plasma no térmico (con gases nobles) *in vitro*, en muestras de esmalte dental humano mediante tecnología SEM y difracción de rayos X en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

Objetivos Específicos

1. Aplicar plasma no térmico bajo diferentes condiciones en especímenes dentales extraídos, empleando diferentes gases nobles de helio y argón.
2. Identificar diferencias cuantitativas en la composición química entre las muestras después de la aplicación de plasma no térmico, mediante SEM y difracción de rayos X
3. Comparar las lecturas obtenidas de los equipos de SEM y difracción de rayos X, entre las muestras tratadas y las no tratadas.
4. Identificar diferencias entre los resultados obtenidos de las muestras no fijadas con las que sí están fijadas con formol (20%).

6 Material y Métodos

6.1 Diseño de Estudio

La presente investigación se constituyó como un estudio experimental de corte transversal realizado en los laboratorios del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, en el cual, se realizaron las preparaciones de las muestras y la caracterización de éstas, previa y posteriormente a su tratamiento de plasma no térmico con gases nobles, conservados en ambiente hidratado con formol (20%).

6.2 Poblacion y Universo de Estudio

6 órganos dentales (terceros molares de pacientes adultos jóvenes entre los 18 y 25 años) extraídos por razones de ortodoncia fueron seccionadas en su porción coronal de manera cuadrangular obteniendo 20 muestras in vitro, de las cuales fueron seleccionadas aquellas que por sus características estructurales pudieron ser observadas y medidas.

Las muestras seleccionadas recibieron tratamiento de conservación en formol al 20%.

6.3 Muestreo

20 muestras in vitro

Grupo problema:

muestras extraídas de 6 órganos dentales sometidos a plasma no térmico.

Grupo testigo: muestras extraídas de 1 órgano dental sin aplicación de plasma.

Identificación de las muestras: de acuerdo con el tratamiento recibido las muestras fueron codificadas de la siguiente manera:

Codificación	1 spl	2 plhe	3 splAr	4 spl F	5 plhe F	6 pl Ar F
Significado	Sin plasma y sin conservación en formol	Con plasma no térmico y helio	Con plasma no térmico y sin argón	Muestra conservada en formol y sin	Conservado en formol y con plasma no térmico y helio	Conservado en formol y con plasma no térmico

conservación en formol	conservación en formol	sin plasma no térmico
---------------------------	---------------------------	--------------------------

6.4 Criterios de Inclusión:

Muestras donde se observaba suficiente tejido de dentina y esmalte

Muestras sin manchas ni irregularidades clínicas.

Muestras no propensas a la fractura.

Criterios de exclusión y eliminación:

Muestras que no cumplieron los criterios anteriores.

6.5 Variables del Estudio

Variables independientes:

Plasma no térmico.

Gases nobles aplicados (helio y argón).

Variables dependientes:

composición química elemental constitutiva del esmalte observado.

Tabla 3. Operacionalización de las variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
Independiente					
Plasma no térmico	Gas parcialmente ionizando con presencia de campos eléctricos y magnéticos con Helio.	Se opera desde un monitor a corriente directa con voltaje de 200 V potencia eléctrica de 20W intensidad menor a 200nm, y frecuencia de 16.53Mhz.	Cualitativa	Frecuencia. Longitud de onda. Radiación. Intensidad. potencia	KHz. µm. Watts. A.U. (unidades astronómicas)
Helio	Gas incoloro, inodoro e insípido con menor solubilidad en agua, es el menos reactivo.	Se transporta manipula y almacena en estado líquido a temperaturas criogénicas flujo de .5ml/h.	Cuantitativa continua	Flujo de gas.	Mililitros.
Argón	Gas empleado en la industria de distintos láseres.	Se transporta manipula y almacena en estado líquido a temperaturas criogénicas flujo de .5ml/h.	Cuantitativa continua	Flujo de gas	Mililitros.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
Dependiente					
% Elemento Oxígeno	Es un elemento químico de número atómico 8 y representado por el símbolo O.	Cada elemento se valoró en porcentaje elemental mediante SEM y XRD.	Cuantitativa continua	Porcentaje en elemento	A. u (unidades astronómicas)
Calcio	Es un metal blando, grisáceo, y es el quinto más abundante en masa de la corteza terrestre.	Cada elemento se valoró en porcentaje elemental mediante SEM y XRD.	Cuantitativa continua	Porcentaje en elemento	A. u
Sodio	Es un metal alcalino blando, untuoso, de color plateado, muy abundante en la naturaleza.	Cada elemento se valoró en porcentaje elemental mediante SEM y XRD.	Cuantitativa continua	Porcentaje en elemento	A. u
Fósforo	Mineral que constituye el 1% del peso corporal la mayor parte se encuentra en los dientes y ayuda a producir ATP.	Cada elemento se valoró en porcentaje elemental mediante SEM y XRD.	Cuantitativa continua	Porcentaje de elemento	A. u
Cloro	Gas tóxico amarillento – verdoso 25 veces más pesado que el aire, olor	Cada elemento se valoró en porcentaje elemental	Cuantitativa continua	Porcentaje de elemento	A. u

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
	desagradable y tóxico.	mediante SEM y XRD.			
Carbono	Metal tetravalente y dispone de 4 electrones para formar enlaces químicos.	Cada elemento se valoró en porcentaje elemental mediante SEM y XRD.	Cuantitativa continua	Porcentaje de elemento	A. u
Flúor	Halógeno, electronegativo y reactivo.	Cada elemento se valoró en porcentaje elemental mediante SEM.	Cuantitativa continua	Porcentaje de elemento	A. u

Materiales empleados.

- Formol al 20%.
- Laminillas de microscopio.
- Carbón y plástico como fijador al microscopio.
- Tanque de gas Helio.
- Hojas de máquina con tablas impresas, lápiz y pluma.
- Cámara Cannon lente 10mm.

Equipos empleados

- Tecnología SEM (Nova NanoSEM)
- Difracción de rayos XRD (Analitek).
- Plasma no térmico. (ININ)

6.6 Procedimiento

Este estudio piloto estima realizar las pruebas primero para conocer las consecuencias del plasma no térmico en las condiciones indicadas por el Coordinador de Plasmas del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, que se consideran desconocidas.

Para la elaboración de este estudio se eligieron por conveniencia 6 terceros molares incluidos que se encontraban almacenados en formol al 20 % en el laboratorio de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México. (Figura 13).



Figura 13. Frascos almacenando los órganos dentales identificados con nombre y edad del paciente.

Una vez seleccionados los dientes, se procedieron a lavarse con agua corriente, se limpiaron con guantes, utilizando una hoja de bisturí no.15 de cualquier tejido blando adherido, y se procedió con la pieza de baja a seccionar separando la raíz de la corona, una vez separada la corona se dividió en 4 segmentos que tenían dentina y esmalte para evitar fracturas a la hora de las pruebas. (figuras 14-16).



Figura 14. Limpieza del tercer molar seleccionado.



Figura 15. Limpieza de tejidos blandos del órgano dental.

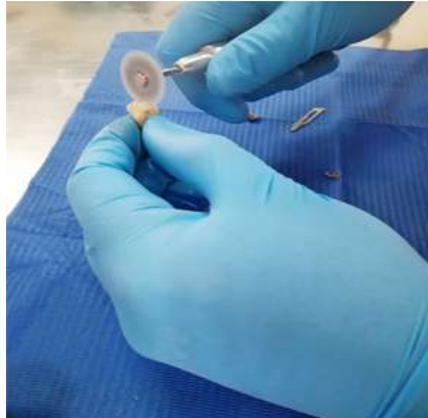


Figura 16. Seccionamiento del órgano dental

Una vez teniendo las muestras de los 6 órganos dentales, obteniendo 20 muestras en total cada una, se secó con la jeringa triple y se radiaron 3 muestras de cada grupo con el plasma no térmico, colocando la cánula a 3 mm haciendo movimientos circulares abarcando toda la superficie de la dentina (figura 18) y esmalte de las muestras.

Seguido a este acto, se colocó cada muestra en un frasco de vidrio individual, las cuales se entregaron al personal del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, quienes realizaron las pruebas correspondientes.



Figura 17. Agrupación de las 4 muestras obtenidas del órgano dental.

Debido que el proyecto piloto es en colaboración con el ININ, se pidió completa confidencialidad en cuanto a las fotos del equipo del plasma no térmico o de las instalaciones del mismo, días después se obtuvieron los resultados.



Figura 18. Muestra del órgano dental siendo radiado por el plasma no térmico.

6.7 Consideraciones Bioéticas

Para llevar a cabo el presente trabajo se consideraron los aspectos éticos de la investigación en seres humanos, de acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki y a los vertidos en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación. Por tratarse de una investigación con riesgo mínimo, y de acuerdo con el Título Segundo, De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos Capítulo I, artículo 23 que menciona que, en el caso de investigaciones con riesgo mínimo, la Comisión de Ética, por razones justificadas, podrá autorizar que el consentimiento informado se obtenga por escrito, y tratándose de investigaciones sin riesgo, podrá dispensar al investigador la obtención del consentimiento informado. En el presente trabajo se solicitó la autorización de los padres o el asentimiento del paciente para la donación de los órganos dentales indicados a extracción por motivos ortodóncicos y cirugía maxilofacial previamente al estudio, por motivos independientes al presente estudio piloto.

6.8 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico ANOVA de 2 factores por interacción donde se buscó la media por elemento y por tratamientos, se buscó definir la interacción y diferencia que existe entre los grupos.

La intención de este análisis es probar que la hipótesis que fue comprobada de acuerdo con los valores de significancia estadística $p < 0.5$.

Se utilizó el software R studio de libre acceso para este análisis.

7 Resultados

En la tabla número 5 se observan los grupos sin proceso de conservación en formol, el elemento con valores más altos es el elemento del oxígeno, el cual se observa disminuyendo del grupo 1 seguido del grupo 2 y finalmente el grupo 3. Seguido de el elemento calcio, el cual se observa en aumento del grupo 1 hasta el 3. El carbono disminuye del grupo 1 hasta el grupo 3. El fósforo aumenta ligeramente del grupo 1 al 3. Y finalmente el cloro se observa sin cambios importantes pero si en aumento desde el grupo 1 al 3.

Tabla 4. Resultados de porcentajes elementales de las muestras sin conservación en formol.

SIN FORMOL		1			Helio	2		Argón	3	
	Patrón SF			Promedio	SF 5 minutos Helio		Promedio	SF 5 minutos		Promedio
Elmt	Element %	Element %	Element %	Element %	Element %	Element %				
C	14.4058168	12.762861	13.90367	16.9837857	12.762861	13.90367	14.5100996	11.0314682	13.183783	12.1076256
O	37.7785742	38.3532792	38.1084293	41.6896691	38.3532792	38.1084293	33.6737317	28.1863391	33.4283233	30.8073312
Na	0.61814291	0.62100855	0.748445	0.63600186	0.62100855	0.748445	0.78812413	0	0	0
P	15.4760942	15.9328789	15.6425223	13.9282448	15.9328789	15.6425223	16.3317841	16.9508085	16.5127367	16.7317726
Cl	0.66580423	0.58844369	0.5800759	0.53013502	0.58844369	0.5800759	0.53974749	0.7327287	0.79507539	0.76390204
Ca	31.0555696	31.7415357	31.0168594	26.2321666	31.7415357	31.0168594	34.1565168	43.0986583	36.0800862	39.5893723
TOTAL	100.000002	100.000007	100.000002	100.000003	100.000007	100.000002	99.9999989	100.000003	100.000005	100.000004

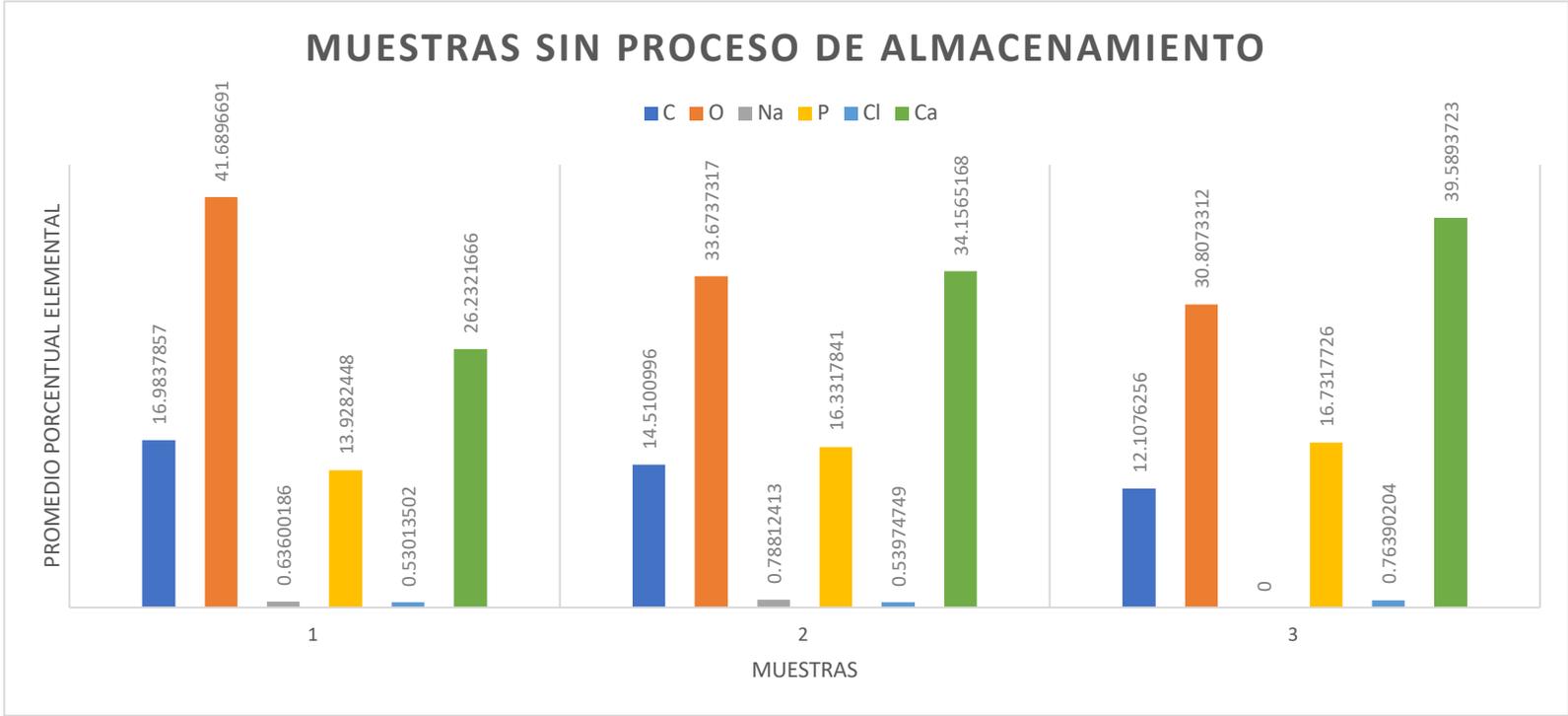


Figura 19. Gráfico de los resultados promediales de la tabla 6

Micrografías de las muestras sin formol

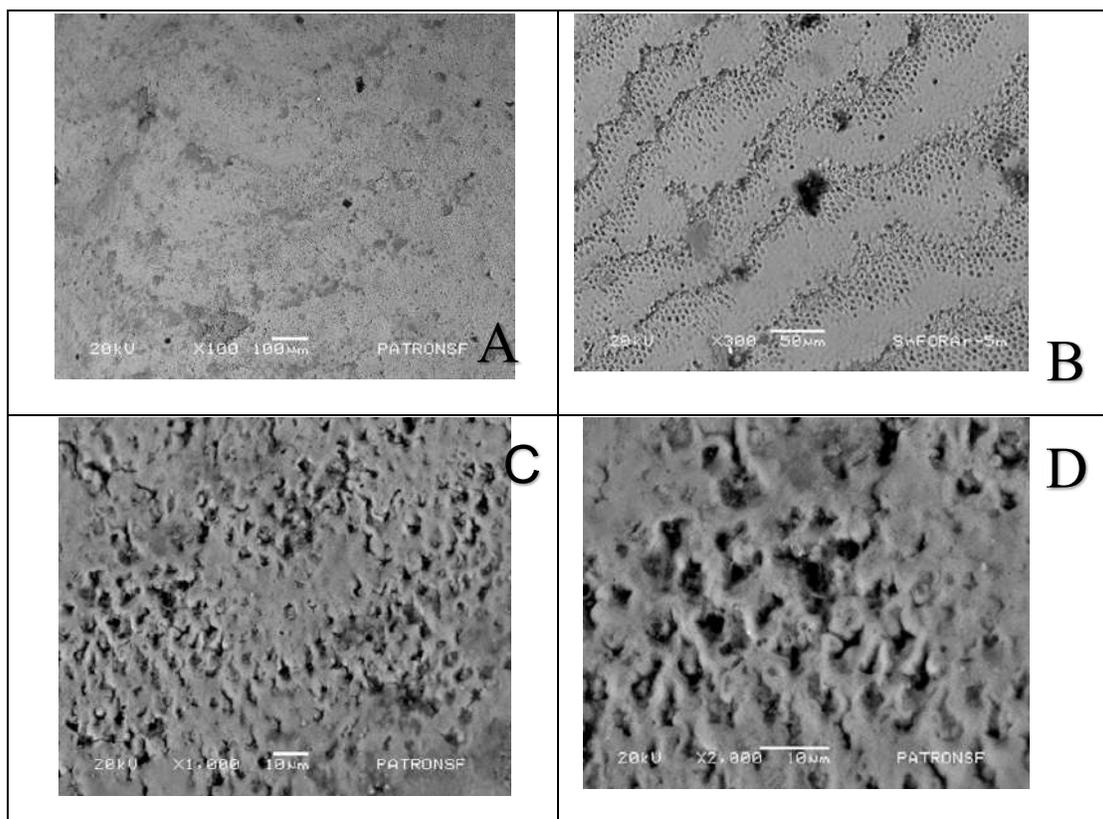


Figura 23.-Micrografías de las muestras que fueron tratadas sin proceso de conservación de formol con una intensidad de radiación de 20 kV. **A)** Se observa a una baja magnificación con una escala de referencia de 10 μm , observamos una superficie no lisa con diferentes zonas oscuras. **B)** Observamos imagen a una magnificación de 300 aumentos, mayor a la anterior con una escala de referencia de 50 μm , donde se observa superficie con líneas oblicuas e irregulares refiriendo la diferencia en la mineralización de las zonas, desde el borde inferior izquierdo hasta el borde superior derecho, puntuales zonas oscuras, las cuales se observan como áreas redonda y sombreadas en diferentes zonas. **C)** Micrografía con una magnificación de 1000 aumentos con una escala de referencia de 10 μm , imagen que se observa semejante a un panal de abejas, con áreas menos densas que otras, áreas redondeadas e irregulares y sombreadas, indicando el grado de desmineralización de la superficie. **D)** Última micrografía la cual se observa con una alta magnificación, y a una escala de referencia de 10 μm , observamos las láminas hexagonales con zonas desmineralizadas y de forma irregular.

En la tabla 6 podemos observar los grupos con proceso de conservación en formol al 20 %.

Se reflejan los siguientes elementos:

El carbono y el oxígeno aumentando del grupo 4 al 5, sin embargo, en el grupo 6 disminuye. El sodio elemento drásticamente disminuido en su porcentaje se observa en aumento en el grupo 5; sin embargo no se refleja en el grupo 6. El fósforo elemento que se observa en aumento del grupo 4 al 6. El cloro refleja valores bajos, pero en aumento del grupo 4 al 6. Por último, el calcio se observa en uno de los valores más altos y en aumento del grupo 4 al 6.

Tabla 5. Resultados de porcentajes elementales de muestras con proceso de conservación en formol.

Patrón CF Muestra	4				CF 5 minutos helio	5			CF 5 minutos Argón	6	
Elmt	Element %	Element %	Element %	Promedio	Element %	Element %	promedio	Element %	Element %	Promedio	
C	9.4058168	12.762861	13.90367	9.05622592	9.7557269	10.2027684	9.97924767	7.03915432	9.2144534	8.12680386	
O	37.7785742	38.3532792	38.1084293	25.3772845	32.4001193	30.6532502	31.5266848	28.649953	24.8875156	26.7687343	
Na	0.61814291	0.62100855	0.748445	0.41305049	0.45816889	0.47360775	0.46588832			0	
P	15.4760942	15.9328789	15.6425223	10.4696577	18.0763438	18.2477087	18.1620263	18.770358	17.3804849	18.0754215	
Cl	0.66580423	0.58844369	0.5800759	0.41808264	0.60295933	0.70912591	0.65604262	0.64722216	0.66368799	0.65545507	
Ca	31.0555696	31.7415357	31.0168594	20.9323684	38.7066782	39.7135377	39.2101079	44.8933154	47.8538573	46.3735864	
Total	100.000002	100.000007	100.000002	66.6666696	99.9999964	99.9999987	99.9999976	100.000007	99.9999992	100.000003	

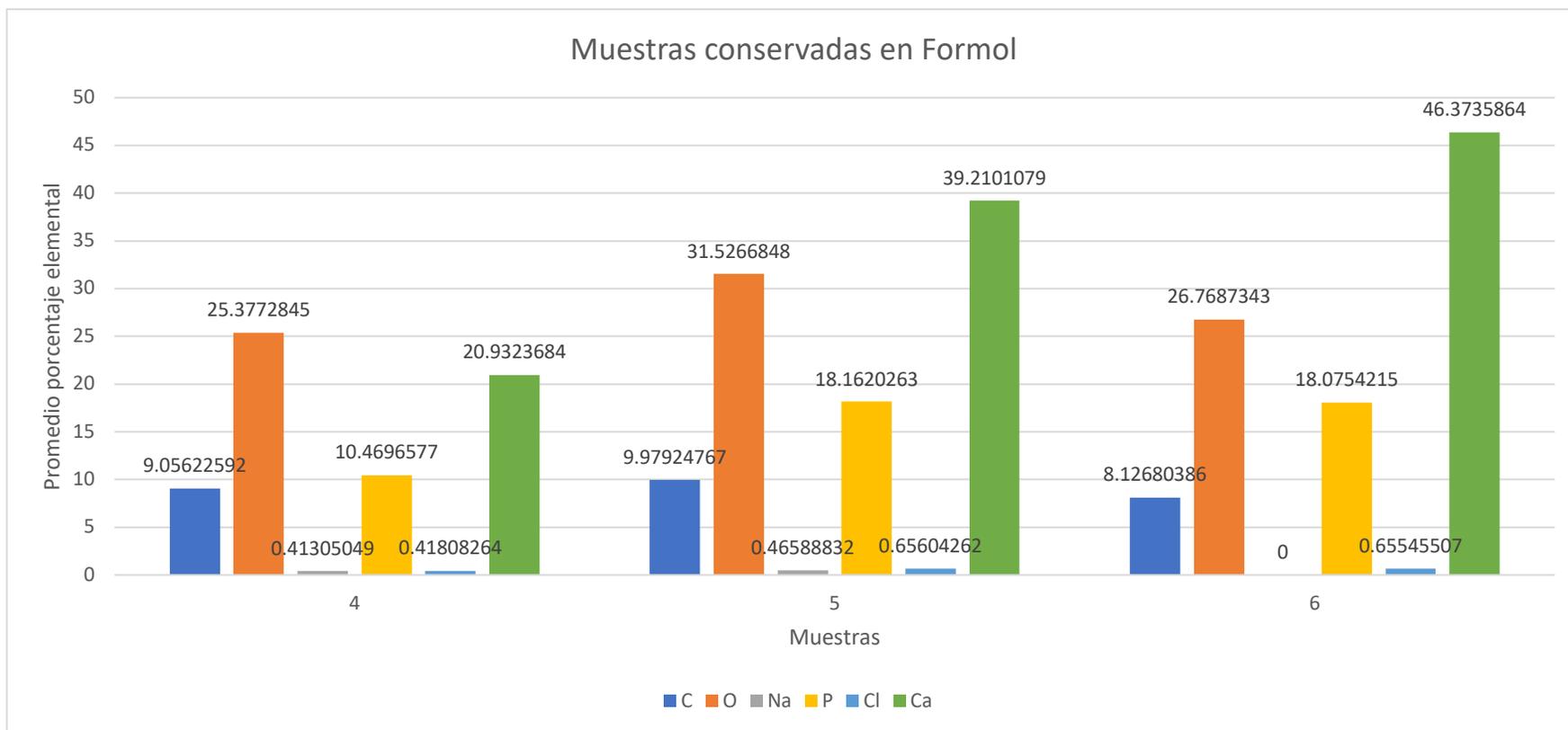


Figura 20. Gráfica de los resultados de la tabla 7.

Micrografías de las muestras almacenadas con formol

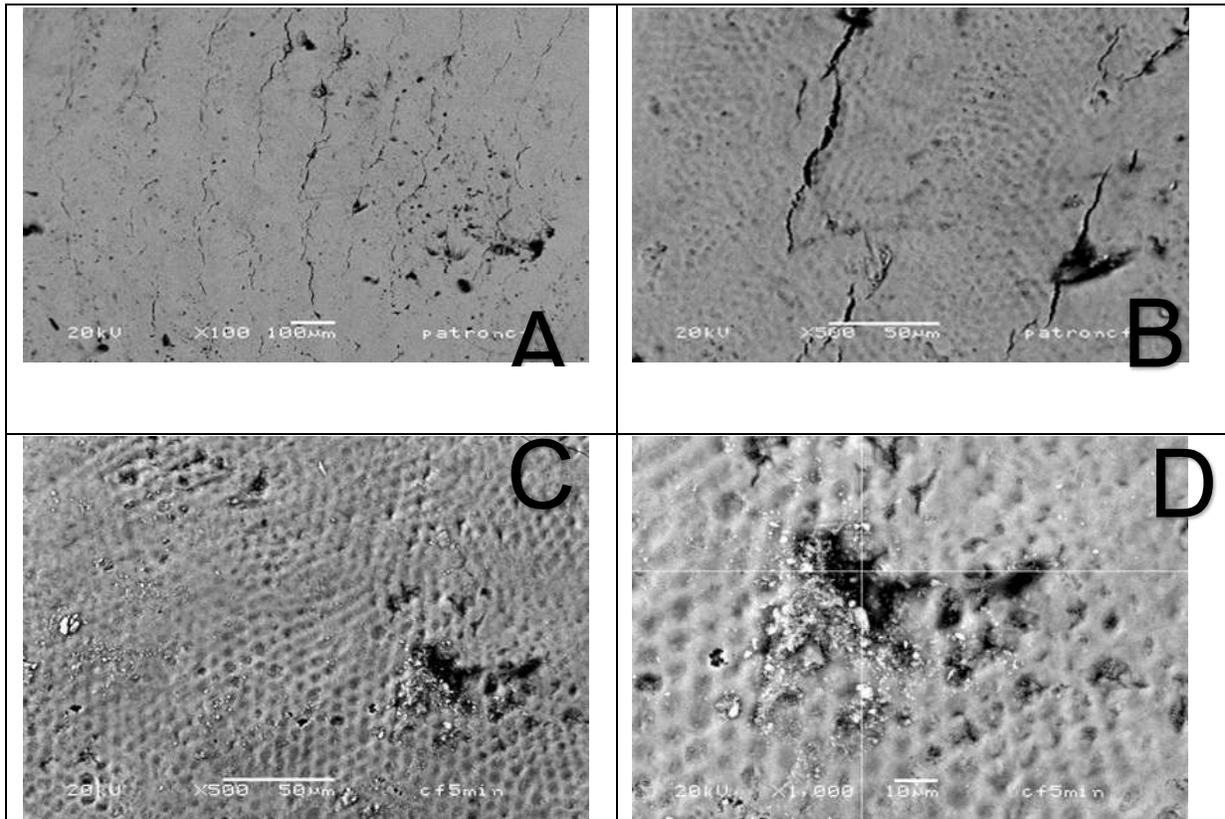


Figura 21. Micrografías de muestras que recibieron tratamiento de conservación con formol, con una intensidad de radiación de 20 kV, **A)** Micrografía se observa a una baja magnificación con una escala de referencia de 100 μm donde se observa una superficie casi lisa con múltiples agrietamientos y zonas puntualmente oscuras y sombreadas. **B)** En esta imagen se aumentó la magnificación a 500 aumentos con una escala de referencia de 50 μm , se puede observar las múltiples grietas y las láminas hexagonales del esmalte. **C)** Micrografía con la imagen de las áminas hexagonales del esmalte en mayor proporción debido a que se amplió la magnificación a 500 aumentos, se observan varias zonas oscuras, particularmente una de mayor tamaño en el borde inferior derecho, zona donde se ve sombreada de igual forma y de forma irregular. **D)** Micrografía de alta magnificación, con escala de referencia de 10 μm se observa una estructura muy semejante a un panal de abejas, las laminillas hexagonales se ven más nítidas y definidas, se observa el eje de las coordenadas indicando la puntual zona oscura haciendo referencia al estudio de la zona desmineralizada para su análisis.

El grupo con los valores más altos son el grupo número 6, seguido del grupo 3 y el 2 y los valores más bajos se observaron en el grupo número 5, 1 y 4 respectivamente.

Tabla 6. Tabla comparativa de promedios de porcentaje en elemento de todos los grupos.

	1	2	3	4	5	6
Elmt	Element %	Element %	Element %	Element %	Element %	Element %
C	16.9838	14.5101	12.1076	9.05622592	9.97925	8.1268
O	41.6897	33.6737	30.8073	25.3772845	31.5267	26.7687
Na	0.636	0.78812	0	0.45816889	0.46589	0
P	13.9282	16.3318	16.7318	18.0763438	18.162	18.0754
Cl	0.53014	0.53975	0.7639	0.41808264	0.65604	0.65546
Ca	26.2322	34.1565	39.937	20.9323684	39.2101	46.3736

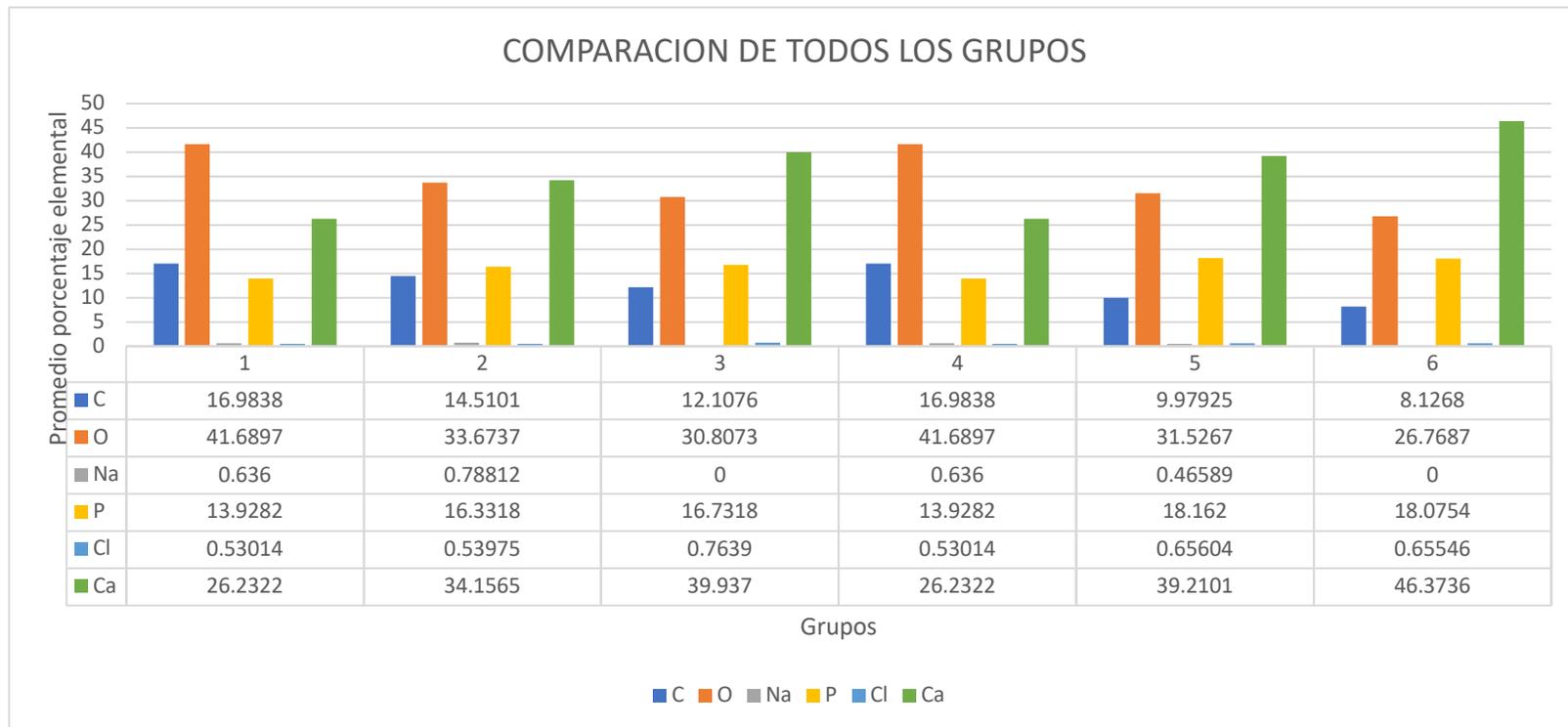
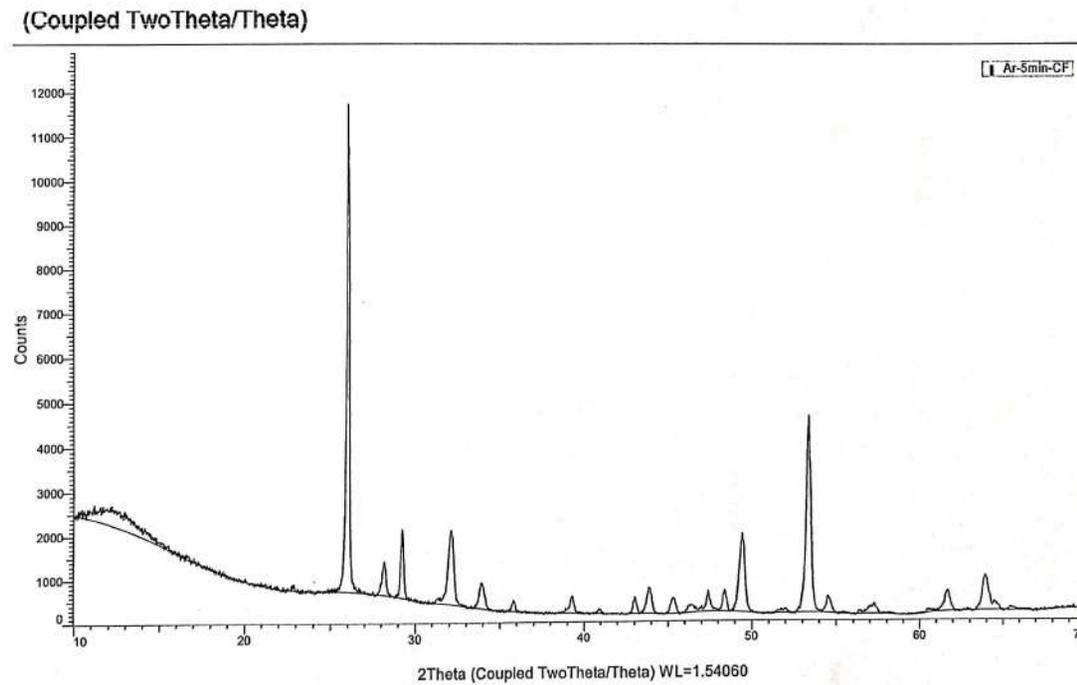


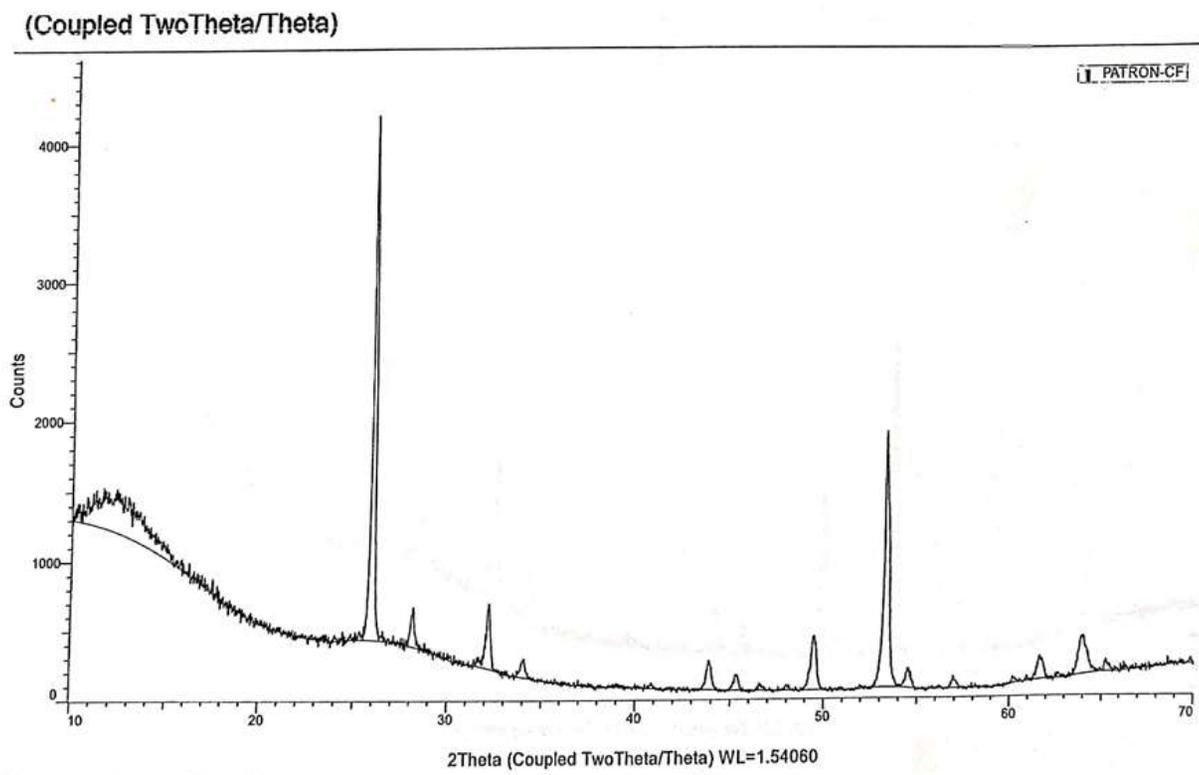
Figura 22. Gráfico que representa los resultados de la tabla 7.

A continuación, se muestran los difractogramas y los mapeos de elementos de las muestras que obtuvieron los valores más altos en la figura 23 respecto de la figura 24 con los valores más bajos de elementos calcificantes, de igual forma en la figura 25 y 26.



Escaneado con CamScanner

Figura 23. Difractograma con los valores más altos, que corresponden al grupo F.



Escaneado con CamScanner

Figura 24 Difractograma que representa a los valores más bajos que corresponde al grupo D.

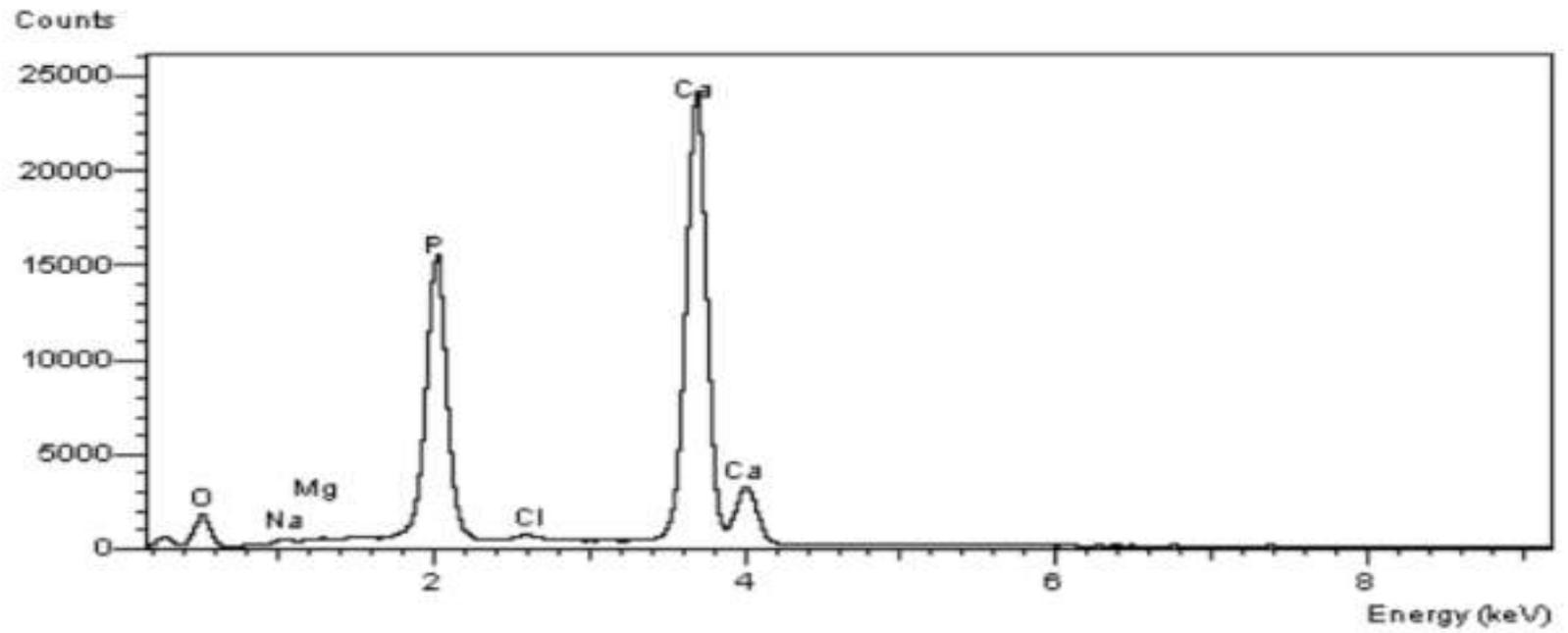


Figura 25 Muestra del mapeo de los elementos por SEM correspondiente al grupo 6.

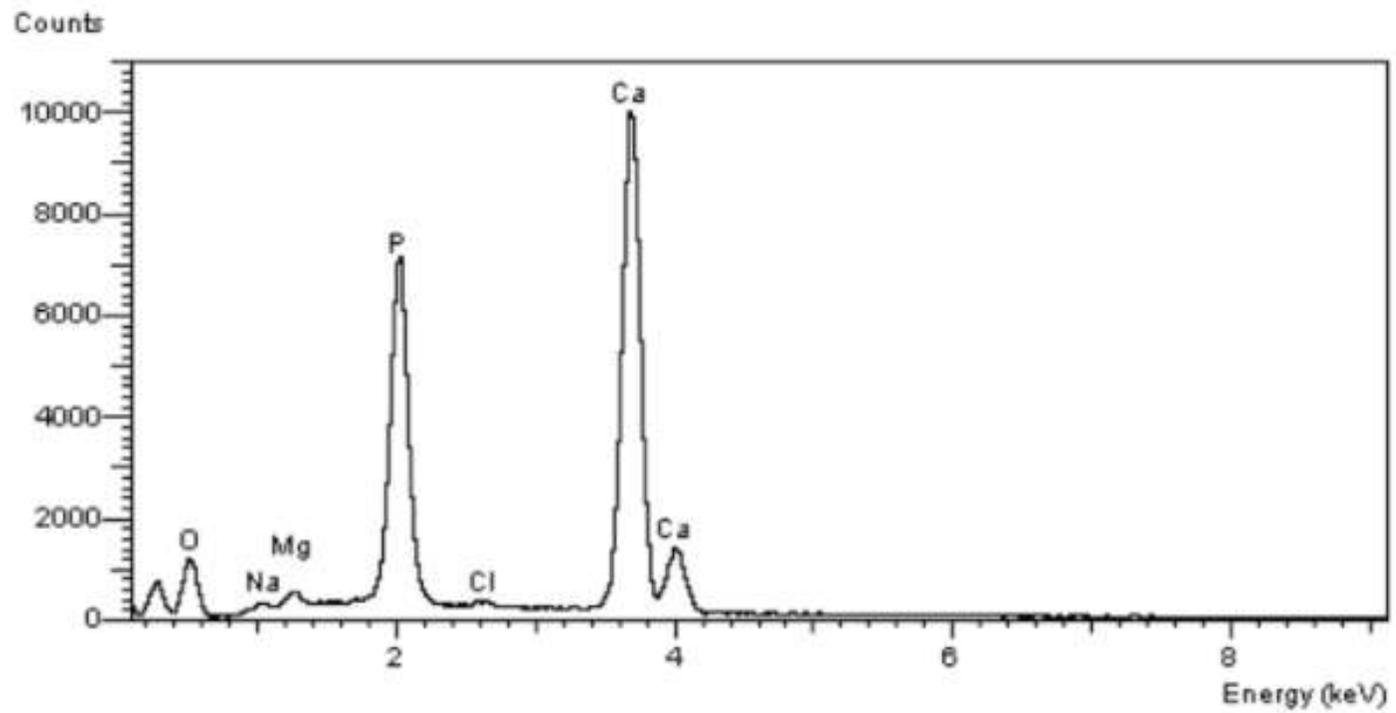


Figura 26 Muestra del mapeo de los elementos por SEM correspondiente al grupo 4

Se realizó un análisis estadístico ANOVA de 2 factores por interacción donde se buscó la media por elemento y por tratamientos, se buscó definir la interacción y diferencia que existe entre los grupos.

Se puede observar en la figura 27 las medias de cada elemento de todas las muestras las cuales nos indican los promedios de los elementos, siendo el calcio y el oxígeno las más altas, seguidas por el fósforo.

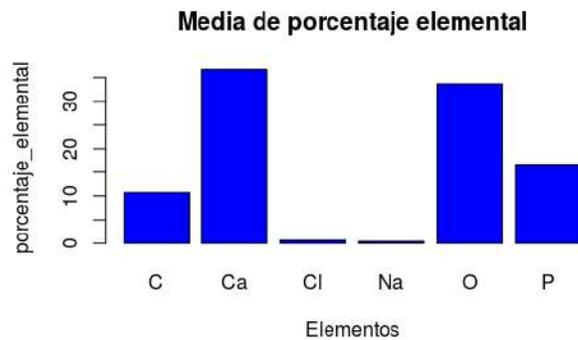


Figura 27.- Media de porcentaje por elemento.

En la figura 28 podemos identificar que las medias del porcentaje elemental por tratamiento aparentan ser semejantes a pesar de la diferencia de tratamiento, los grupos tratados con gas argón no manifestaron el elemento sodio, lo cual influyó en sus valores medios.



Figura 28. Media de porcentaje por tratamiento realizado en cada órgano dental.

En la figura 29 podemos observar una gráfica de cajas que muestra la variabilidad de los valores medios por elemento, siendo el calcio, el oxígeno y el fósforo los mayoritarios. Lo cual indica que el compuesto dominante es el fosfato de calcio.

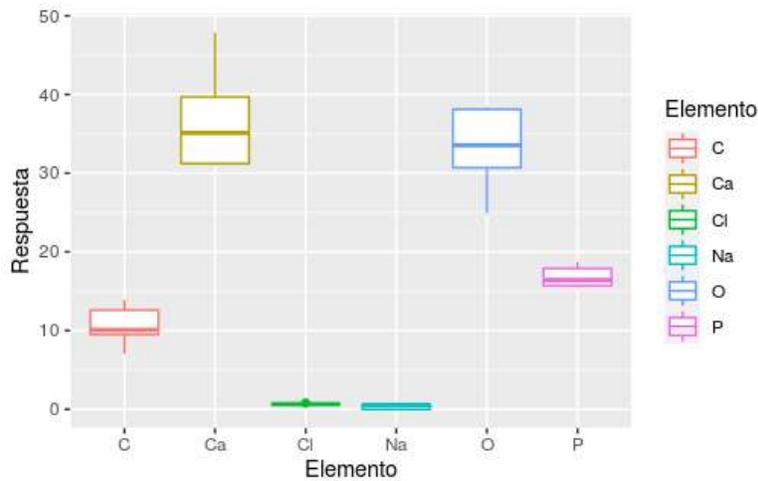


Figura 29. Composiciones elementales más altas respecto a las más bajas y sus varianzas de la media.

La figura 30 representa la distribución de puntuaciones dentro de las variables por tratamiento, las cuales nos indican que la media de cada uno de los grupos no manifestó una gran diferencia, pero la varianza se observó más alta para el grupo 6 y más baja para el grupo 2, lo cual indicó que el tratamiento con helio y sin conservador de formol fue el que menos varió, pero manifestó valores medios más bajos.

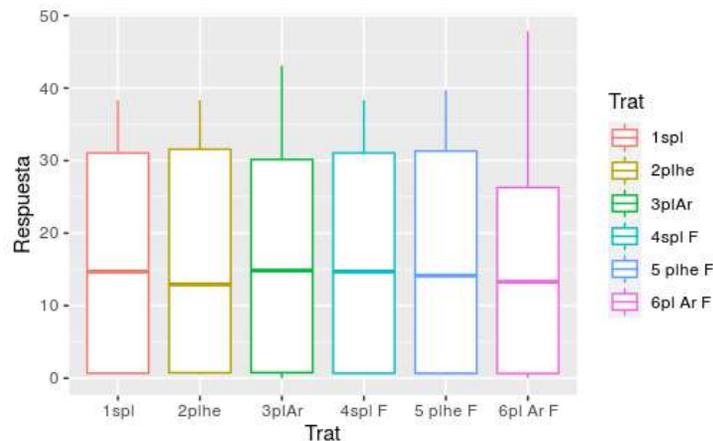


Figura 30.- Grafico donde se observa los valores promedio por tratamiento.

Finalmente, en la figura 31 se representa visualmente la dispersión de la interacción de las muestras con la respuesta al tratamiento por elemento.

El elemento calcio se observa mayoritario en todos los tratamientos respecto de los demás elementos, siendo el sodio y el cloro los elementos con menores valores, por otra parte, el fosfato manifestó una mayor estabilidad al ser el de menor varianza.

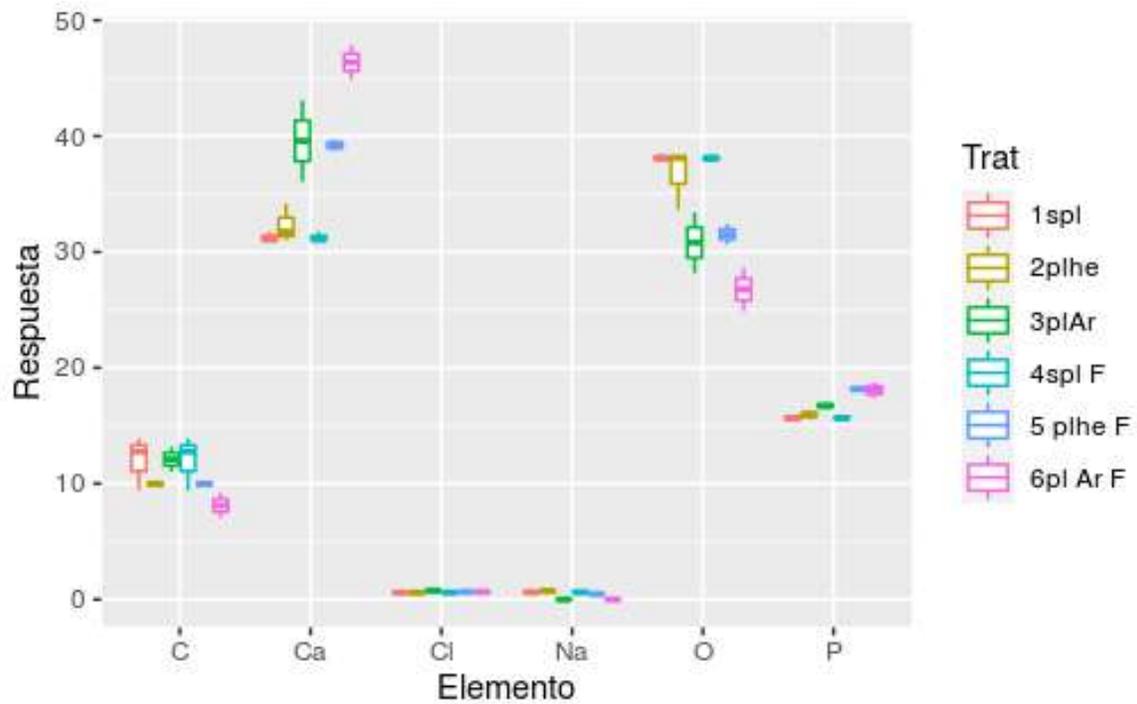


Figura 31.- Grafica que representa el patrón de comportamiento de los elementos respecto de los tratamientos.

La tabla 8 representa los resultados del análisis ANOVA de 2 factores el cual nos muestra grado de libertad, suma de cuartiles, media de cuartiles, los valores F y P, donde el valor de $p < 0.5$ rechaza la hipótesis nula.

Tabla 7. Resultados de análisis ANOVA.

	DF	SUM SQ	MEAN SQ	F VALUE	PR(>F)
ELEMENTO	5	22410	4482	3211.781	<2e-16***
TRATAMIENTO	5	6	1	0.805	0.55
ELEMENTO: TRAT	25	941	38	26.961	<2e-16***
RESIDUALS	72	100	1		

Se aplicó una prueba Tukey para establecer la diferencia entre las medias de todos los muestreos, el cual arrojó un 95 % de confiabilidad.

Elemento	diff	lwr	upr	p adj
Ca-C	25.9632539	24.810352	27.116156	0.000000
Cl-C -	10.0622420	-11.215144	-8.909340	0.000000
Na-C -	10.2885019	-11.441404	-9.135600	0.000000
O-C	22.9555992	21.802697	24.108501	0.000000
P-C	6.0107982	4.857896	7.163700	0.000000
Cl-Ca	-36.0254959	-37.178398	-34.872594	0.000000
Na-Ca	-36.2517559	-37.404658	-35.098854	0.000000
O-Ca	-3.0076547	-4.160557	-1.854753	0.000000
P-Ca	-19.9524558	-21.105358	-18.799554	0.000000
Na-Cl.	-0.2262599	-1.379162	0.926642	0.992391
O-Cl	33.0178412	31.864939	34.170743	0.000000
P-Cl	16.0730402	14.920138	17.225942	0.000000
O-Na	33.2441012	32.091199	34.397003	0.000000
P-Na	16.2993001	15.146398	17.452202	0.000000
P-O	-16.9448011	-18.097703	-15.791899	0.000000

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

8 Discusión

A partir de los hallazgos encontrados, aceptamos la hipótesis general que establece que existe un efecto significativo al aplicar plasma con gases nobles (helio y argón) en los órganos dentales con o sin tratamiento de conservación previo, causa cambios cualitativos y cuantitativos en la composición química del esmalte incluso cuando se ha aplicado con diferentes gases, sin embargo, se observó un incremento de los valores bajo el tratamiento de plasma con argón con y sin conservación en formol, a pesar de que los elementos mostraron varianza entre ellos, destacando el sodio que no se reflejó en ninguna de estas muestras.

El tratamiento que le siguió fue en las muestras tratadas con plasma no térmico y helio, que mostro valores más bajos al anterior pero sus elementos se mostraron estables en el análisis., basado en el análisis ANOVA.

Se puede destacar que los elementos con mayor interacción a los gases son el calcio, el oxígeno y el fósforo.

Los elementos con menor interacción con los gases fueron carbono, cloro y sodio. Por otro lado, a pesar de no dar resultados estadísticos notorios, almacenar los órganos dentales con formol puede causar diferencias en los resultados en las muestras iniciales, mostrando un nivel menor de porcentaje elemental en la muestra, sin embargo, medirlo aporito al estudio, mostrando que aun conservados en él, se observó cambios principalmente en la disminución del oxígeno.

Por otro lado, el tratamiento de plasma con helio no representa una mala opción, ya que presento un aumento en el porcentaje elemental en la mayoría de los elementos detectados.

Estos resultados guardan relación con lo encontrado por Y.M. Kim y colaboradores³⁷ cuyo objetivo fue aplicar formulaciones de fluoruro con plasmas para posteriormente analizar la absorción y resistencia a los ácidos, al aplicar plasma no térmico con un flujo de 2 litros por minuto por un tubo dieléctrico a una frecuencia de 20 KHz y alto voltaje a una radiación por 4 minutos en múltiples muestras se relevó la absorción del flúor por el diente, lo que significa una interacción con el diente logrando alterar la superficie incluyendo hidrofilia e hidrofobicidad, teniendo

gran influencia en la eficacia del tratamiento con el Flúor y siendo más efectivo en términos de absorción, retención y resistencia a la desmineralización.

Esto presenta similitud con el presente estudio, de los doctores, en la calibración del equipo en cuanto potencia, frecuencia y flujo del helio, a su vez se hicieron varias aplicaciones de plasma.

En lo que respecta a la interacción de los iones minerales y el plasma generan cambios cualitativos importantes en la composición química del esmalte dental potencializando la entrada del flúor que se aplicó.

En cambio, en el estudio del doctor Philine H. Metelmann y colaboradores³⁹ encontraron la interacción del plasma con sistemas de adhesión con resina y ionómero de vidrio, el plasma no térmico y el diente humano haciendo énfasis en la reacción hidrofílica, en el acondicionamiento y buscando mejorar la fuerza con el cemento, no encontrando un resultado aceptable para el proceso de adhesión, sin embargo, en su metodología decidieron utilizar el plasma con argón únicamente sin mencionar su concentración.

En el artículo del Nam⁴⁴ donde se evaluó y comprobó que, con la aplicación repetitiva y prolongada para el blanqueamiento dental, combinada con el plasma, tiene un fuerte efecto blanqueador y produce dientes más blancos.

En este contexto, resulta complejo un análisis comparativo ya que existen diferentes formas de calibrar los equipos de plasma, diversos protocolos de almacenamiento de la muestra, así como diferentes técnicas del análisis de la composición del esmalte o dentina.

Estos se deberán calibrar y estandarizar de acuerdo con el objetivo del estudio, lo que se pretende encontrar y el efecto que se desea lograr.

A pesar de las limitantes de la muestra, los órganos dentales utilizados en el presente estudio tuvieron una interacción importante en sus iones minerales localizados en la superficie dental, los hallazgos sugieren que la aplicación del plasma no térmico cargado con helio y argón con un flujo de .5ml/h durante 5 minutos generan cambios cualitativos favorables.

Se recomienda ampliar esta línea de investigación, implementando las siguientes recomendaciones; aumentar la muestra por lo menos a 30 órganos dentales,

cambiando las condiciones de almacenamiento, ya que el formol puede llegar a deshidratar con mayor intensidad el esmalte, también pudo ser un atenuante a la interacción que se obtuvo con el oxígeno, se recomienda utilizar agua bidestilada o agua desionizada para mantenerlos hidratados sin generar grandes cambios estructurales, semejante a las características que se tendrían en boca.

Utilizar de igual forma órganos erupcionados que hayan tenido contacto con el ambiente bucal y de esta forma se observará esmalte dental maduro y tenga en su composición química mayor porcentaje elemental, los órganos incluidos no mostraron el ion flúor, elemento que es importante analizar posteriormente y conocer su reacción con el plasma no térmico.

Así mismo utilizar órganos seccionados en forma sagital utilizando la cara vestibular y lingual para que puedan ser valorados los cambios entre ellos por las variantes de posición de los prismas del esmalte y el proceso de pulido previo pueda realizarse sin contratiempos.

Finalmente, se recomienda utilizar el plasma no térmico con las mismas características aumentando únicamente el flujo del helio por lo menos a un 1 litro por hora para lograr mayor interacción en los iones del esmalte.

9 Conclusiones

1. Al aplicar el tratamiento de plasma no térmico con gases nobles, se manifestó una diferencia cualitativa en los elementos presentes en la mayoría de las muestras de esmalte.
2. Las muestras tratadas con formol al 20% manifestaron una disminución de los elementos calcio, oxígeno y sodio respecto a las no tratadas.
3. Respecto a la aplicación plasma con diferentes gases nobles si se observó una diferencia en cuanto a los promedios elementales respecto de las no tratadas.
4. De las imágenes obtenidas con SEM y los difractogramas obtenidos de difracción de rayos X, se observó que las muestras tratadas con plasma y argón manifiestan menores características de irregularidad en su superficie respecto a las no tratadas
5. De todo el análisis estadístico lo más relevante observado respecto del análisis de varianza fue que el calcio fue el elemento con valores más altos en todos los tratamientos y una variación mayor respecto de los demás, también el compuesto de fosfato de sodio se manifestó como más alto en todos los grupos y las diferencias fueron significativas de acuerdo con los valores de $p < 1.0$.
6. La aplicación de plasma no térmico con gas argón mostro los valores promedio más altos de calcio y fosforo respecto de los demás tratamientos, por lo tanto, se puede afirmar que contribuye a la calcificación del esmalte tratado, sin embargo se hacen necesario estudios con mayor número de muestras y muestreos para comprobar los hallazgos de la presente investigación y determinar con mayor evidencia si la composición química del esmalte en órganos dentales tratados con plasma no térmico resulta favorable para efectos remineralización.

10 Referencias Bibliográficas

- 1) Gómez de Ferraris, M. E., Campos Muñoz. "Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental". 4ta edición. Madrid. Médica Panamericana. (2019).
- 2) Esponda Ávila Rafael. "Anatomía dental". 7ma edición. México Editorial Universidad Nacional Autónoma de México. Porrúa (2009).
- 3) Davis, W. I. "Histología y Embriología bucal". 2da edición. México. McGraw-Hill. Interamericana (1995).
- 4) Margarita Victoria García-Garduño y José Reyes-Gasga. La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. Rev. Especializada En Ciencias Químico-Biológicas. 2006. 9(2):90-95.
- 5) Escobar A, Vélez LF. Escobar, Alfonso, and Luis Fernando Vélez. Teaching of Cariology at the College of Dentistry, Rev. Universidad Ces, Medellin, 2014. 105-120.
- 6) Kidd E. The implications of the new paradigm of dental caries. Journal of Dentistry. 2011. 1(39): 3-8.
- 7) Valencia, R. et al. Características estructurales de los Cristales del Esmalte Humano: Mecanismos de remineralización. Revista RODYB, 2013, 2 (3): 1-17.
- 8) Shimizu, Daisuke; Macho, Gabriele A.; Spears, Iain R. Effect of prism orientation and loading direction on contact stresses in prismatic enamel of primates: implications for interpreting wear patterns. The Official Publication of The American Association Of Physical Anthropologists, 2005126, (4):427-434.
- 9) Reyes, J. Estudio del esmalte dental humano por microscopia electrónica y técnicas afines. Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, 200121, (2): 81-85.
- 10) Hannig, M., and C. Hannig. Nanotechnology and its role in caries therapy. Advances in Dental Research 2012.24.(2): 53-57.

- 11) Alfonso Escobar Rojas." Enfermedades de origen dento-bacteriano". Rev. CES. 2014. 5. (2): 100-110. [consultado el día: 15/06/2020]. Disponible en: <http://alfonsoescobar.integ.ro/interna-mod-2.html?action=main>
- 12) O'Really Mm Featherstone. Demineralization and remineralization around orthodontics appliance: an in vitro study. American Journal Orthodontics and Dentofacial Orthopedics 1987. (92): 33-40.
- 13) Ferreira Ma Mendes Ns. Factors associated with active White enamel lesions. International Journal of Pediatric Dentistry. 2055. (15): 327-334.
- 14) Coronel, María Elena Monterde, et al. Demineralization-remineralization of dental enamel. Rev. Asociación Dental Mexicana, 2002, 59, (6): 220-222.
- 15) Barrantes Delgado, Patricia, et al. Análisis de la estructura cristalina del esmalte dental por medio de difracción de rayos X después del tratamiento con agentes blanqueadores a diferentes concentraciones. Repositorio de la Universidad de Costa Rica. 2016. 1-64
- 16) Cheng, Zhen-Jiang, et al. The enamel softening and loss during early erosion studied by AFM, SEM and nanoindentation. Biomedical Materials, 2009, 4, (1), 015-020.
- 17) Arola DD, Gao S, Zhang H, Masri R. The Tooth: Its Structure and Properties. Dental Clinics Of North American Journal. 2017;61(4):651-668.
- 18) Penagos, J. I. C. Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). Elementos, 2013. 3(3):133-146.
- 19) Rodriguez-Vilchis. Laura Emma, et al. Morphological and structural changes on human dental enamel after Er: YAG laser irradiation: AFM, SEM, and EDS evaluation. Photomedicine and Laser Surgery, (2011) 29, (7): 493-500.
- 20) Shahabi, Sima, et al. FT-Raman spectroscopic characterization of enamel surfaces irradiated with Nd: YAG and Er: YAG lasers. Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects. 2016.10.(4): 207.

- 21) Dong, Zhihong, et al. Characterization and analysis of fluoride calcium silicate composite interface in remineralization of dental enamel. *Composites Part B: Engineering* 2018. (153): 393-397.
- 22) Vieira, T. I et al. Characterization and effect of nanocomplexed fluoride solutions on the inhibition of enamel demineralization created by a multispecies cariogenic biofilm model. *Clinical Oral Investigations*.2020.
- 23) Yao, C., Ahmed, M. H., Yoshihara, K., Mercelis, B., Gré, C. P., Van Landuyt, K. L., ... & Van Meerbeek, B. Bonding to enamel using alternative Enamel Conditioner/etchants. *Dental Materials*, 2019 35(10), 1415-1429.
- 24) Xiao, Z., Que, K., Wang, H., An, R., Chen, Z., Qiu, Z., ... & Shen, M. Rapid biomimetic remineralization of the demineralized enamel surface using nano-particles of amorphous calcium phosphate guided by chimaeric peptides. *Dental Materials*, 2017 33(11), 1217-1228.
- 25) Sabel, N., Karlsson, A., & Sjölin, L. XRMA analysis and X-ray diffraction analysis of dental enamel from human permanent teeth exposed to hydrogen peroxide of varying pH. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 2019 .11(6), e512.
- 26) Kubro, Z. S., Dahlan, K., & Wahyudi, S. T. Phase characterization and electrical properties of fluorhydroxyapatite: influence of molarity variation and microwave irradiation. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 2019 (858). 1, p. 012011.
- 27) ChandraSekhar et al. Extraction of Hydroxyapatite Obtained From Human Premolar Teeth Using Smart Dentine Grinder and Calcination Process for Biomedical Application-An In vitro Study. *Journal of Contemporary Orthodontics*, 2020 4(1), 46-52.
- 28) Colombo et al. Protective effects of a zinc-hydroxyapatite toothpaste on enamel erosion: SEM study. *Annali di Stomatologia*, 2016 7(3), 38.
- 29) Sereda, G., VanLaecken, A., & Turner, J. A. Monitoring demineralization and remineralization of human dentin by characterization of its structure with resonance-enhanced AFM-IR chemical mapping, nanoindentation, and SEM. *Dental Materials*, 2019 35(4), 617-626.

- 30) Regulo López Callejas. Aplicaciones de los plasmas en la salud. Fuentes pulsadas para aplicaciones en plasmas. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Fecha de publicación 31 de marzo de 2016/ fecha de consulta: [junio del 2020]. Disponible en: https://www.inin.gob.mx/_invydes/detalle_proyectos.cfm?campo=cb-103&id=302&year=2012
- 31) Cha S, Park YS. Plasma in dentistry. *Clinical Plasma Medicine*. 2014 1;2(1):4-10.
- 32) Nazemisalman et al. Types of lasers and their applications in pediatric dentistry. *Journal of Lasers In Medical Sciences* 2015 (6):3-96.
- 33) Kim MS, Koo IG, Choi MY, Jung JC, Eldali F, Lee JK, Collins GJ. Correlated electrical and optical studies of hybrid argon gas–water plasmas and their application to tooth whitening. *Plasma Processes and Polymers*. 2012;9(3):339-45.
- 34) Dong X, Chen M, Wang Y, Yu Q. A mechanistic study of plasma treatment effects on demineralized dentin surfaces for improved adhesive/dentin interface bonding. *Clinical Plasma Medicine*. 2014 1;2(1):11-6.
- 35) Kostov, K. G et al. Surface modification of polymeric materials by cold atmospheric plasma jet". *Applied Surface Science*, 2014. (314): 367-375.
- 36) Fowler, B. O., & Kuroda, S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. *Calcified Tissue International*. 1986. 38(4), 197-208.
- 37) Kim, Y. M. et al. Retention improvement in fluoride application with cold atmospheric plasma. *Journal of Dental Research*. 2018.97 (2) 179-183.
- 38) Y. Liu et al. Nonthermal atmospheric plasmas in dental restoration. *Journal of Dental Research*. 2016; 95(5): 496–505.
- 39) Metelmann, Philine H., et al. First insights on plasma orthodontics- Application of cold atmospheric pressure plasma to enhance the bond strength of orthodontic brackets. *Clinical Plasma Medicine*. 2016. 4, (2): 46-49.

- 40) Kinersly, T., et al. Laser effects on tissue and materials related to dentistry. *The Journal of The American Dental Association*.1965. 70, (3): 593-600.
- 41) Andreu, et al. Influencia de la radiación láser de baja potencia en molares permanentes inmaduros. *Rev. Cubana Estomatología*. 2019 33. (1): 49-55.
- 42) Boehm R, Rich J, Webster J, Janke S. Thermal stress effects and surface cracking associated with laser use on human teeth. *Journal Biomech Eng*.1977. (99):189-194.
- 43) Lehmann, Antje, et al. Modification of enamel and dentin surfaces by non-thermal atmospheric plasma. *Plasma Processes and Polymers*.2013: 262-270.
- 44) Nam, S. H., Kim, G. C., & Hong, J. W. (2016). An Evaluation of the Repetitive Tooth Bleaching with Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma. *International Journal of Oral Biology*, 41(4), 243-251.
- 45) Pan, J. et al. (2010). A novel method of tooth whitening using cold plasma microjet driven by direct current in atmospheric-pressure air. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 38(11), 3143-3151
- 46) Davies AG. Sir William Ramsay and the noble gases. *Sci Prog*. 2012;95(Pt 1):23-49.
- 47) Hirano Y, Hayashi M, Tamura M, et al. Singlet oxygen generated by a new nonthermal atmospheric pressure air plasma device exerts a bactericidal effect on oral pathogens. *Journal of Oral Science*. 2019;61(4):521-525.
- Rosmej S, Reinholz H, Röpke G. Contribution of electron-atom collisions to the plasma conductivity of noble gases. *Physical Review E*. 2017;95(6-1):063208.