



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Estudio Comparativo de la Composición
y Estructura Cristalina del Esmalte y
Dentina Humano, Bovino, Ovino
y de Cerdo**

D. Juan de Dios Teruel Fernández

2017

**Estudio comparativo de la composición
y estructura cristalina del esmalte y
dentina humano, bovino, ovino
y de cerdo.**



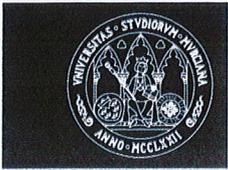
UNIVERSIDAD DE MURCIA

**Departamento de Dermatología, Estomatología,
Radiología y Medicina Física**

Tesis realizada por Juan de Dios Teruel Fernández

Directores: Antonio José Ortiz Ruiz y Ana Hernández Fernández

2017



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. ANTONIO JOSÉ ORTIZ RUIZ, profesor titular de Universidad del Área de Estomatología en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **“Estudio comparativo de la composición y estructura cristalina del esmalte y dentina humano, bovino, ovino y de cerdo”**, realizada por D. Juan de Dios Teruel Fernández, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 15 de septiembre de 2017





UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. ANA HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Doctora de Universidad del Área de Estomatología en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **“Estudio comparativo de la composición y estructura cristalina del esmalte y dentina humano, bovino, ovino y de cerdo”**, realizada por D. Juan de Dios Teruel Fernández, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 15 de septiembre de 2017



AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar por agradecerle todo esto a la persona que desde que salí de la carrera me puso el mote que luego utilizaría para mi clínica, a mi padrino de promoción, a mi padre académico, a Antonio Ortiz, por soportarme y apoyarme a pesar de mis mil defectos.

A todos aquello que me habéis ayudado a sacar esta tesis para adelante: Ana Hernandez, Alberto Alcolea, Jose Miguel Sanchez y Francesc Gisper. Gracias a todos por esos ratos de laboratorio, cifras y letras que habéis pasado por mi culpa.

Fuera del ámbito académico, dedicárselo por supuesto a mis padres, que siempre me han apoyado en todas mis decisiones aunque no les hicieran demasiada gracia. Mi madre siempre tan atenta y mi padre tan paciente, creo que mejores padres es difícil tener, a mi me toco la lotería nada más nacer. Recuerdo especial para mis hermanos y el resto de mi familia que siempre me han apoyado.

Guardarle un párrafo a mis amigos, a los que siempre están ahí pese las adversidades, pese a los enfados y que sigamos organizando viajes para irnos juntos.

Quiero agradecerle a Raquel el dibujo y la portada de esta Tesis, que en cuanto le dije de hacérmelo no se lo pensó 2 veces.

A mi Cristi, Milagros e Iban por la ayuda que he tenido con ellos en la clínica a la hora de sacar todo adelante.

“ IF YOU CAN DREAM IT, YOU CAN DO IT”

Walt Disney

ABREVIATURAS

Å – Amstrong.

ACE – Paquete bien organizado de Carbonato Apatita.

ΔC_p – Cambio de la capacidad calorífica durante la transición vítrea.

AHP – Proceso Analítico Jerárquico.

Al – Aluminio.

C – Carbono.

C/N – Análisis Elemental.

Ca – Calcio.

Cd – Cadmio.

Cl – Cloro.

Co – Cobalto.

Cu – Cobre.

DB – Dentina Bovina.

DGT – Derivada de la curva termogravimétrica.

DH – Dentina Humana.

DO – Dentina Ovina.

DP – Dentina Porcina.

DSC – Calorimetría Diferencial de Barrido.

EB – Esmalte Bovino.

EH – Esmalte Humano.

EO – Esmalte Ovino.

EP – Esmalte Porcino.

EDS – Espectroscopía de Energía Dispersa de Rayos x.

ETA – Atomización termoeléctrica.

F – Fluor.

Fe – Hierro.

FAAS – Espectroscopio de absorción atómica de llama.

FHA – Fluorhidroxiapatita.

FTIR – Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier.

GAE – Generalización de armónicos esféricos.

HA – Hidroxiapatita.

HAs – Hidroxiapatitas.

HAS – Hidroxiapatita Sintética.

IC – Índice de Cristalinidad.

ICP – Acoplamiento de inducción de plasma.

ICP-AES – Espectrometría de emisión atómica acoplada a inducción de plasma.

ICP-MS – Espectrometría de masas acoplada a inducción de plasma.

I – Yodo.

K – Potasio.

L_{vol} – Tamaño del cristalito.

MCDM – Método de toma de decisiones multicriterio.

Mg – Magnesio.

Mn – Manganeseo.

N – Nitrógeno.

Ni – Niquel.

P – Fósforo.

Pb – Plomo.

PIXE – Emisión de rayos x inducida por partículas.

Ppm – Partes por millón.

OES – Espectrofotometría de emisión óptica.

OP – Orientación Periférica.

RIM – Método de Referencia Ideal.

Se – Selenio.

SEM – Microscopio Electrónico de Barrido.

Sr – Estroncio.

TAR – Reflectancia atenuada total.

TEM – Microscopía Electrónica de transmisión.

Tg – Transición Vítreá.

TGA – Análisis Termogravimétrico.

TG-MS – Termogravimetría acoplada a Espectrometría de masas.

WPPD – Procedimiento de descomposición total del diagrama de difracción de polvo.

XPS – Espectroscopia de fotoelectrones de rayos x.

XRD – Difracción de Rayos x.

XRF – Fluorescencia de Rayos x por dispersión de longitud de onda.

Z – Número Atómico.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCION	7
1.2 ESMALTE Y DENTINA	7
1.2.1. ESMALTE	8
1.2.1 DENTINA	12
1.2.2 COMPOSICIÓN QUIMICA	14
1.2.3.1 ELEMENTOS PRINCIPALES	15
1.2.3.2 ELEMENTOS MINORITARIOS Y ELEMENTOS TRAZA	16
1.2.3 STRUCTURA CRISTALINA	19
1.2 SUSTRATOS ANIMALES	22
1.3 TECNICAS ANALITICAS	24
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO	29
2.1 HIPÓTESIS	29
2.2 OBJETIVO GENERAL	29
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MATERIAL Y MÉTODOS	33
3.1 GRUPOS EXPERIMENTALES. DIENTES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS.	33
3.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS COMPOSICIONAL	34
3.2.1. ANÁLISIS ELEMENTAL (C/N)	34
3.2.2. TERMOGRAVIMETRÍA – ESPECTROMETRÍA DE MASAS (TG-MS)	35
3.2.3. ESPECTROMETRÍA DE FLUORESCENCIA DE RAYOS X POR DISPERSIÓN DE LONGITUD DE ONDA (XRF)	37
3.3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTRUCTURAL	39
3.3.1. DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)	39
3.3.2. ESPECTROMETRÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).	44
3.3.3. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	47
3.4. TOMA DE DECISIONES MULTICRITERIO (MCDM)	48
3.4.2. MÉTODO DE REFERENCIA IDEAL (RIM):	53
4. RESULTADOS	57
4.1. TÉCNICAS DE ANÁLISIS COMPOSICIONAL	57
4.1.1. ANÁLISIS ELEMENTAL (C/N)	57
4.1.2. TERMOGRAVIMETRÍA - ESPECTROMETRÍA DE MASAS (TG-MS)	58
4.1.3. ESPECTROMETRÍA DE FLUORESCENCIA DE RAYOS X POR DISPERSIÓN DE LONGITUD DE ONDA (XRF)	61
4.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTRUCTURAL	63
4.2.1. DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)	63
4.2.2. ESPECTROMETRÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	64
4.2.3. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	67
4.3. TOMA DE DECISIONES	71
5. DISCUSIÓN	77
5.1. TÉCNICAS DE ANÁLISIS COMPOSICIONAL	77
5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTRUCTURAL	82

5.3. TOMA DE DECISIONES	84
6. CONCLUSIONES	89
7. BIBLIOGRAFIA	93
ANEXO I	105
ANEXO II	111
ANEXO III	133
ANEXO IV	141
ANEXO V	163

RESUMEN

Introducción. Los dientes humanos son los candidatos ideales para la realización de los estudios experimentales in vitro. Sin embargo su uso de los dientes humanos encuentra muchas limitaciones: son muy difíciles de obtener con suficiente calidad y cantidad, es difícil establecer una muestra homogénea debido a la dificultad de control de la edad y del origen del diente. Por ello se hace necesario el estudio de otros sustratos alternativos. El objetivo de nuestra investigación fue estudiar la composición química y las diferencias entre las nanoestructuras cristalinas del esmalte y dentina humanos y las especies bovina, porcina y ovina, que son los candidatos para sustituirlos en los estudios experimentales.

Material y métodos. En este estudio se escogieron fragmentos de esmalte y dentina de 400 dientes sanos humanos, bovinos, ovinos y porcinos. Estos fueron triturados hasta conseguir una partícula menor de 100 μ m de tamaño. Para hallar su composición química se usaron el Análisis Elemental (C/N), la Termogravimetría unida a Espectrometría de Masas (TG-MS) y la Espectrometría de Fluorescencia de Rayos X por dispersión de longitud de onda (XRF). Para estudiar la estructura cristalina se usó la difracción de Rayos X (XRD), la Espectrometría infrarroja transformada de Fourier (FTIR) y la Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Resultados. El C/N mostró más cantidad de carbón orgánico y nitrógeno en dentina que en esmalte. El esmalte humano fue la muestra más mineralizada de todas, con unos valores de C y N cercanos a la Hidroxiapatita (HA). El esmalte y la dentina bovina fueron los más parecidos al humano. El TG-MS, para todas las especies, mostró que el esmalte contenía menos carbón y materia orgánica que la dentina. La descomposición térmica para el esmalte humano mostró gran similitud con la Hidroxiapatita Sintética (HAS), y grandes diferencias con el esmalte bovino, ovino y porcino. Esta descomposición térmica mostró una gran similitud entre la dentina bovina y humana. Con XRF se encontró que la dentina contenía mayores cantidades de Mg, S, Sr y Zn que el esmalte. El esmalte contenía mayores cantidades de P, Ca, Cl, Cu, K y relación Ca/P

que la dentina. El esmalte y la dentina humana contenían mayor relación Ca/P, mayores cantidades de Cl y Cu, y menores cantidades de Mg, S y Zn que el resto de especies animales. Con XRD, la HAS de los esmaltes obtuvieron mayores índices de cristalinidad (IC) $IC_{Rietveld}$ que las dentinas de la misma especie. Esmalte y dentina humanos mostraron el IC más alto, seguido de esmalte y dentina ovinos. Con FTIR, los tamaños de los cristales y el IC_{FTIR} del esmalte fueron siempre mayores que en dentinas para todas las especies. El mayor IC_{FTIR} fue encontrado para el esmalte humano y el ovino. De acuerdo con DSC, el diente porcino mostró el salto más parecido al diente humano durante el proceso de Transición Vítrea (ΔC_p).

Para conocer entre todos los sustratos cuál es el más parecido al sustrato ideal (el diente humano) hemos usado un Método de Toma de Decisiones Multicriterio (MCDM). Exáctamente, el Proceso Analítico Jerárquico (AHP) y el Método de Referencia Ideal (RIM).

Conclusiones. C/N, TG-MS y XRF mostraron que el esmalte y dentina bovinos muestran las mayores similitudes al humano de entre todas las muestras analizadas. En estudios donde las propiedades mecánicas o fisicoquímicas del esmalte o la dentina prevalezcan, el diente ovino debería ser usado como sustituto del diente humano. Pero en los estudios donde sea más relevante el comportamiento térmico en atmosfera inerte, el diente porcino debería sustituir al humano. El MCDM indicó que, entre las especies estudiadas, el esmalte y dentina bovinos son los mas parecidos al esmalte y dentina humanos.

ABSTRACT

Introduction. Human teeth are ideal candidates for conducting in vitro experimental studies. However, their use has many limitations: they are very difficult to obtain with sufficient quality and quantity; it is difficult to establish a homogeneous sample due to the difficulty of controlling the age and origin of the tooth. Therefore, it is necessary to study other alternative substrates. The aim of this research was to study the chemical composition and the differences between the crystalline nanostructures from enamel and dentin of human, bovine, porcine, and ovine species, that are likely candidates for replacing them in studies that test dental material.

Material and Methods. Dentine and enamel fragments extracted from 400 sound human, bovine, porcine and ovine – 100 teeth per species – incisors and molars were mechanically ground up to a final particle size of less than 100 μm . Elemental analysis (C/N), thermogravimetric analysis coupled to mass spectrometry (TG–MS), and wavelength dispersive X-ray fluorescence (XRF) were used to analyse the samples' composition. X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and differential scanning calorimetry (DSC) were used to analyse the crystalline nanostructures.

Results. Elemental analysis showed more organic carbon and nitrogen in dentine than in enamel. Human enamel was the most highly mineralised, with C and N values close to hydroxyapatite. Bovine dentine and enamel were the most similar to human. TG–MS: in all species, enamel contained less carbon and organic matter than dentine. Thermal decomposition of human enamel showed great similarity to synthetic hydroxyapatite, and large differences from bovine, ovine and porcine enamel. Thermal decomposition showed the greatest similarity between human and bovine dentine. WDXRF: Dentine contained larger quantities of Mg, S, Sr and Zn than enamel. Enamel contained larger quantities of P, Ca, Cl, Cu, K and Ca/P ratio than dentine. Human enamel and dentine contained a higher Ca/P ratio, larger quantities of Cl and Cu and lower quantities of Mg,

S, Zn than the animal species. Hydroxyapatites (HA) in enamel obtained higher crystallinity index $(CI)_{\text{Rietveld}}$ than the corresponding dentin of the same species. Human dentin (HD) and human enamel (HE) showed the highest CI, followed by ovine enamel (OE) and ovine dentin (OD). CI_{FTIR} and enamel crystal sizes were always higher than those of dentin for all species. The greatest CI_{FTIR} were found for HE and OE. The most similar change in heat capacity during the glass transition (ΔC_p) values to human teeth, were obtained by porcine specimens.

To know among all substrates which is closest to the ideal substrate (human tooth), we have used a Multicriterial Decision Making Method (MCDM). Exactly, the Analytical Hierarchic Process (AHP) and the Reference Ideal Method (RIM).

Conclusions: C/N, TG–MS and WDXRF have shown that human and bovine enamel and dentine show the greatest similarity among the species analysed. In researches where the physicochemical and mechanical properties of enamel or dentin prevail, ovine teeth should be used as a substitute to human teeth. Where the thermal behavior in an inert atmosphere is more relevant, porcine samples should substitute human teeth. The MDCD indicated that enamel and dentin bovine are the most similar to enamel and dentin human.

1. INTRODUCCION

Durante muchos años se han realizado infinidad de estudios acerca de nuevos materiales dentales sobre dientes in vitro. Muchos utilizan dientes humanos ya que son los candidatos perfectos para este tipo de estudios.

Sin embargo, los dientes humanos presentan varias limitaciones que dificultan la realización de dichos estudios, como puede ser: la dificultad de obtener suficiente cantidad para una muestra y con suficiente calidad, ya que los dientes extraídos suelen presentar caries extensas o grandes destrucciones; también es muy difícil establecer una muestra homogénea ya que no podemos controlar ni la fuente ni la edad; a todo esto se une el riesgo de infecciones biológicas y todas las limitaciones éticas que actualmente existen para su uso (Yassen y cols., 2011; Soares y cols., 2016). Por ello, muchos autores han optado por utilizar para sus estudios in vitro dientes animales como alternativa a los humanos, los más utilizados son los bovinos (Yassen y cols., 2011), aunque también se utilizan de porcino (Lopes y cols., 2006), ovino (Andreasen y cols., 2006), equino (Magne y cols., 2002), e incluso de tiburón (Enax y cols., 2012). El criterio principal para la elección de un diente animal es que tenga semejanzas físico-químicas, estructurales y biológicas con el diente humano.

El tamaño relativamente pequeño del diente humano, y su superficie curvada, hacen que esté muy limitado su uso para los diferentes test de adhesión in vitro, ya que lo ideal sería contar con superficies planas con un espesor uniforme (Abuabara y cols., 2004).

1.2 ESMALTE Y DENTINA

La parte mineral de los dientes de los vertebrados contiene uno o más tipos de minerales de fosfato, predominando el fosfato cálcico. El mineral más abundante en los dientes humanos es un fosfato cálcico básico conocido como Hidroxiapatita (HA) $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Otros fosfatos cálcicos y fosfatos de magnesio se han encontrado con o sin asociar a la apatita: Brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosfato octacálcico ($\text{Ca}_8\text{H}_2[\text{PO}_4]_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), fosfato tricálcico o whitlockite (β -TCP, β - $\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$) o fosfato

cálcico deshidratado ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), y fosfatos cálcicos amorfos, Estruvita ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Newerbita ($\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), y fosfatos de magnesio cálcico amorfos (**Legeros y cols., 1984**).

El esmalte y la dentina del diente humano están formados, ambos, por HA biológica. Aunque la HA la asociemos a la fórmula antes mencionada, se observa que la HA biológica tiene cantidades de iones carbonato, que pueden ser encontrados de dos formas diferentes dentro de la estructura de la HA: sustituyendo al PO_4^{3-} , al que se le denomina Carbonato apatita o hidroxiapatita carbonatada (HAC) tipo B; y sustituyendo al OH^- , al que se denomina HAC tipo A. La HA biológica es principalmente tipo B (**Slósarczyk y cols., 2005; Tiznado-Orozco y cols., 2009; Combes y cols., 2016**).

1.2.1. ESMALTE

El esmalte es el tejido más duro del cuerpo humano debido a que está compuesto por millones de prismas muy mineralizados que lo recorren en todo su espesor. Estos prismas están formados por paquetes bien organizados de HAC. Es un tejido acelular que está expuesto a altas tensiones de compresión, abrasiones y disoluciones en contacto con ácidos procedentes de los diferentes alimentos y de las bacterias orales. Existen varias características que hacen del esmalte una estructura única, entre ellas destacan su naturaleza ectodérmica (a diferencia de otros tejidos dentarios de naturaleza ectomesenquimática), la naturaleza proteica de su matriz orgánica sin presencia de colágeno, el mayor tamaño de sus cristales de HA y su organización única, y una excelente elasticidad. Las células encargadas de generar este tejido son los ameloblastos, cuya función es limitada en el tiempo, ya que una vez que completan la formación del tejido adamantino, involucionan y desaparecen durante la erupción dentaria, por lo cual, no habrá nueva aposición de esmalte una vez terminada la erupción. Será incapaz de repararse pero sí podrá remineralizarse (**Gómez de Ferraris y cols., 2009; Eimar y cols., 2012; Valencia y cols., 2013**).

El esmalte está compuesto casi en su totalidad de HA bien cristalizada (96% de su peso) con poco contenido de proteínas no colágena y lípidos (3% de su peso) y agua (1% de su peso). No están distribuidos de forma homogénea, ya que dependiendo de la zona del diente en la que nos encontremos, las proporciones variarán. Las principales proteínas que conforman el esmalte son las amelogeninas, las cuales son esenciales en el proceso de remineralización y estructuración de este. También podemos encontrar ameloblastinas, enamelinas y tuftelinas (**Fonseca y cols., 2008; Laurencee-Young y cols., 2011; West y Joiner, 2014**).

La mineralización del esmalte se basa, sobre todo, en el crecimiento de los cristales de HA. Los cristales del esmalte se desarrollan a partir de su forma no mineralizada por el flujo de Ca y PO₄ ocupando el espacio que deja el agua y las sales minerales (**Clemente-Presas y cols., 2002**). Los cristales de HA en el esmalte se forman en contacto directo con los ameloblastos. Se alinean y empaquetan para formar los prismas del esmalte. Estos prismas recorren todo el espesor del esmalte, desde la dentina hasta la superficie del esmalte. Cuando se observa al microscopio electrónico de barrido (MEB) (Figura 1) en cortes transversales se observa una morfología en ojo de cerradura de llave antigua debido a la orientación. Esta morfología hace que los cristales estén unidos a modo de engranaje, lo que le confiere al esmalte una mayor resistencia. La parte de la cabeza soporta los choques de las fuerzas masticatorias y las colas distribuyen y disipan dichas fuerzas (**García Barbero, 1997; Gómez de Ferraris y cols., 2009; Combes y cols., 2016**).

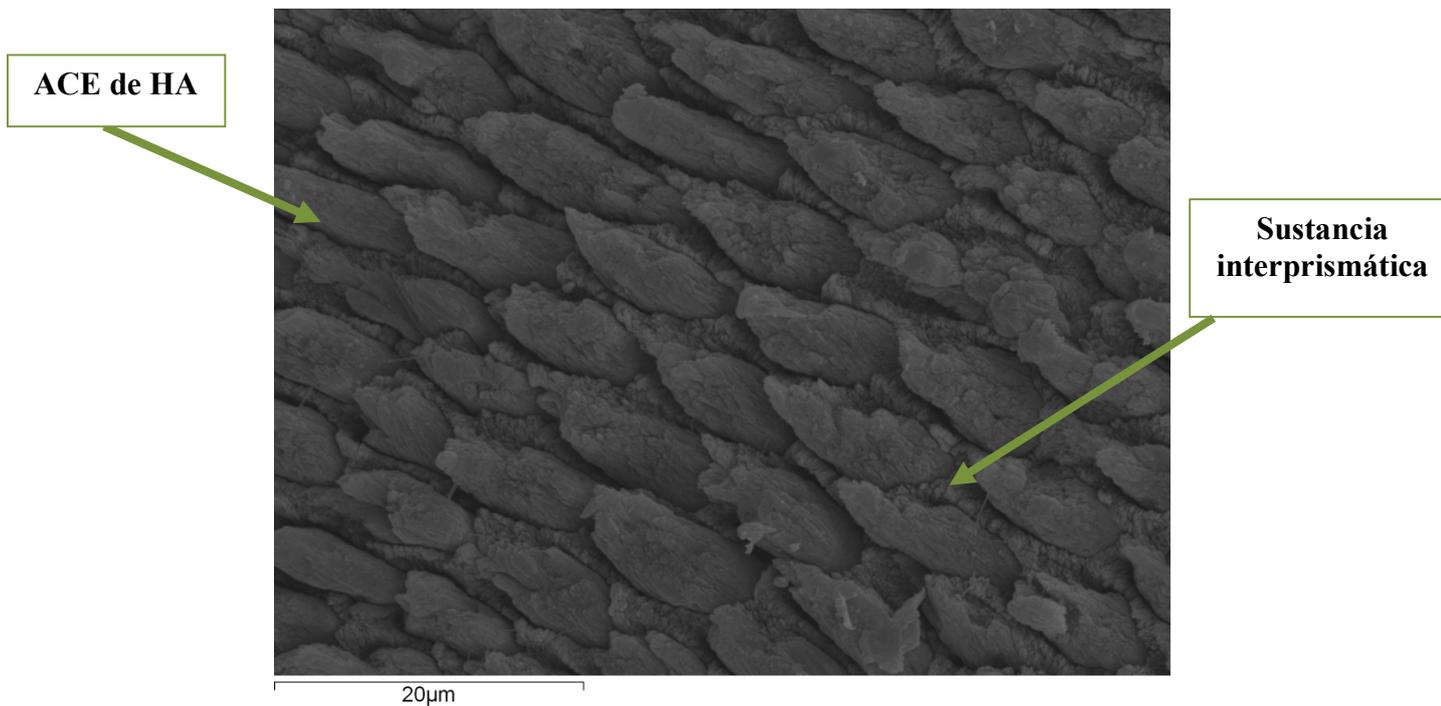


Figura 1. Imagen de un corte del esmalte humano al Microscopio electrónico de barrido (SEM). En ella podemos observar los prismas y la sustancia interprismática.

El material orgánico es muy escaso y se distribuye, sobre todo, en la periferia, rodeando estos prismas, y recibe el nombre de sustancia interprismática (**Gómez de Ferraris y cols., 2009**). Esta sustancia interprismática también posee cierto grado de mineralización, y estos cristales de apatita que contienen, están orientados en otras direcciones ayudando a aumentar la resistencia a fractura del tejido adamantino (**Barrancos y cols., 2006**).

El número de prismas del esmalte varía en relación al tamaño de la corona, pero suele estar entre 5 y 12 millones. El diámetro de estos prismas en el esmalte humano suele variar entre 4 y 10 µm, siendo mayor conforme se aleja de la unión amelodentinaria y se acerca a la superficie del diente. Su curso es sinuoso, formando: ángulos agudos hacia la profundidad de los surcos y fosas de las caras oclusales premolares y molares; ángulos rectos a nivel de los vértices cuspídeos y en la profundidad de los surcos y fosas oclusales; y ángulos obtusos en los tercios medios y gingival de las caras mesiales, distales, vestibulares, palatinas o linguales de los dientes. Estos cambios de dirección y entrecruzamientos de los prismas aumentan la resistencia del esmalte a la fractura (**Gómez de Ferraris y cols., 2009**) (Figura 2).

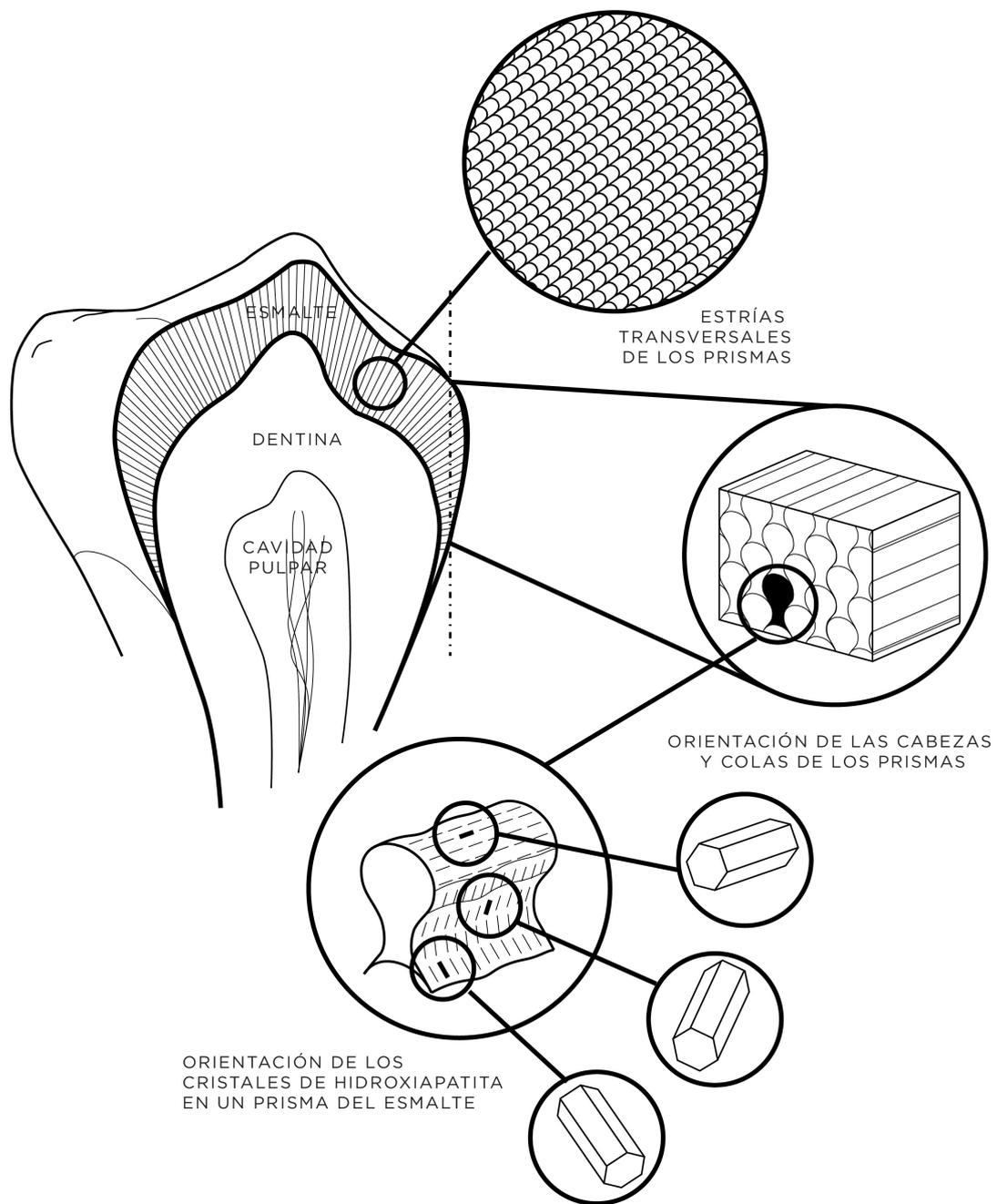


Figura 2. Dibujo de la estructura macro y microscópica del esmalte humano.

1.2.1 DENTINA

La dentina es el tejido más abundante en el diente, es producida por unas células que se denominan odontoblastos. Su formación es un proceso que ocurre desde una dentina desmineralizada o predentina hasta la dentina mineralizada. Esta compuesta por HA pobremente cristalizada o matriz mineral (70% de su peso o 50% de su volumen), colágeno o matriz orgánica (20% de su peso o 30% de su volumen) y agua (10% de su peso o 20% de su volumen). Tiene excelentes fuerzas de compresión y tensión, además de una alta adaptabilidad al estrés mecánico. Y es mucho más porosa que el esmalte **(Featherstone y Lussi, 2006; Hart y Hart, 2007; Goldbert y cols., 2012)**.

La mayor parte de la matriz orgánica de la dentina (90%), está compuesto de fibras de colágeno tipo 1. Estas fibras son muy importantes ya que tienen un papel fundamental en la mineralización del diente **(Kinney y cols., 2003; Lussi y Ganns., 2014)**.

Su estructura está casi completamente compuesta por la presencia de los túbulos dentinarios cilíndricos. Estos están rodeados de por una región peritubular hipermineralizada, que junto las fibra de colágeno forman una entramado. Los túbulos dentinario están dispuestos dentro de la dentina desde la pulpa a su unión amelodentinaria, pero en diferente cantidad dependiendo de la zona. El lumen de los túbulos dentinarios disminuye en diámetro por la deposición de mineral y pueden llegar a ocluirse completamente con la edad, disminuyendo la permeabilidad de la dentina **(Fuentes, 2004; Fonseca y cols., 2008)**.

La dentina tiene unas propiedades elásticas excepcionales que permiten al diente soportar las altas tensiones durante la masticación. Un valor, que en todos los estudios sobre esfuerzo de los dientes debe aparecer es el Módulo de Young, este es el cociente entre la tensión ejercida por un material y la deformación elástica producida, es decir, el grado de recuperación de la forma tras el cese de la aplicación de la fuerza. En este aspecto, la dentina con más cantidad de contenido inorgánico será más rígida que una dentina con mayor cantidad de matriz orgánica **(Kinney y cols., 2003; Fuentes, 2004)**.

Una de las características que hace que haya tantos estudios in vitro sobre dentina humana y de otros mamíferos, es su capacidad de adherir materiales restauradores. Esto es debido a la gran cantidad de túbulos dentinarios que componen su superficie. La capacidad de adhesión dependerá de la cantidad de túbulos por mm² y del diámetro de estos (Schilke y cols., 2000) (Figura 3).

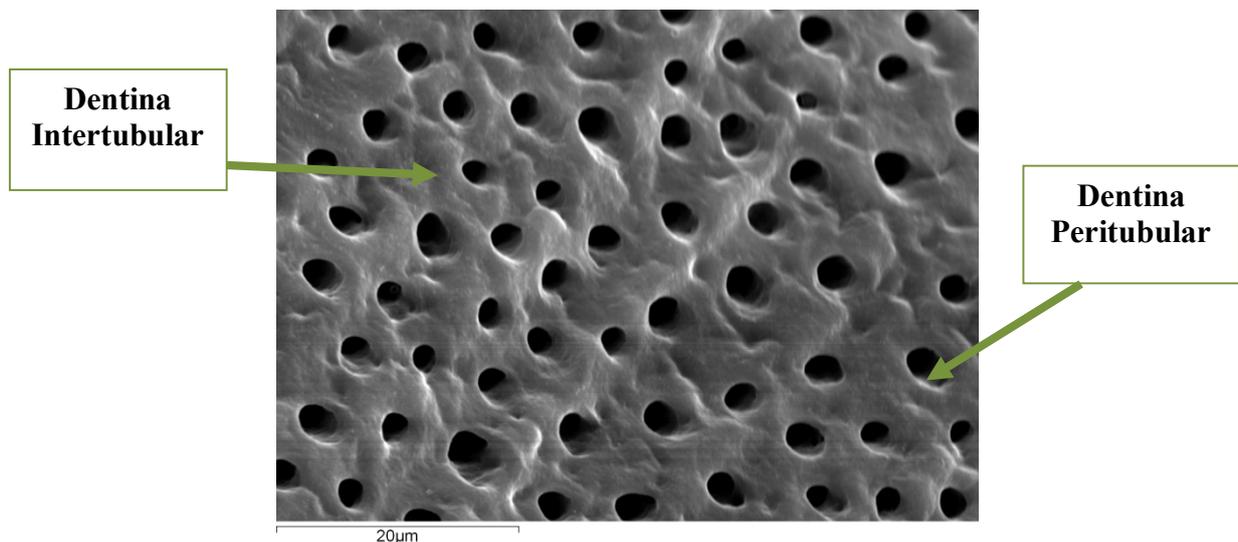


Figura 3. Imagen de un corte de la dentina humana tomada con SEM, en donde se pueden observar los túbulos dentinarios en un corte transversal. En ella se puede distinguir la dentina peritubular e intertubular.

Los túbulos dentinarios siguen un trayecto de S itálica, exceptuando a nivel de la raíz o al de los bordes incisales o cuspídeos, donde pueden llegar a ser rectilíneos (Posada y cols., 2006). En las zonas de la dentina próximas a la pulpa se encuentra la mayor cantidad de túbulos dentinarios por unidad de superficie de todo el diente (de 45.000 a 65.000 túbulos por mm²), mientras que en las regiones más externas su número es mucho más inferior (de 15.000 a 20.000 túbulos por mm²). El porcentaje de área tubular varía entre el 22% en la proximidad de la pulpa, hasta un 1% en la dentina más próxima a la unión amelodentinaria (Posada y cols., 2006; Gómez de Ferraris y cols., 2009).

1.2.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Tanto el esmalte como la dentina están compuestos de HA y materia orgánica, pero es difícil precisar la composición completa de estas estructuras, sobre todo de los denominados Elementos Traza. Dentro de la HA existen sustituciones de elementos como pueden ser: el Ca^{2+} que puede ser sustituido por el Na^+ , Mg^{2+} , o el Zn^+ entre otros; el PO_4^{3-} remplazado por el CO_3^{2-} , o el OH^- remplazado por el F^- o también por el CO_3^{2-} . Todas estas sustituciones pueden llevar a variar las propiedades de la HA, por ejemplo el cristal se volverá más susceptible a desmineralizaciones por ácidos en regiones ricas en CO_3^{2-} y pobres en Ca^{2+} ; mientras que la agregación de F^- puede aumentar la resistencia (West y Joiner, 2014; Lussi y Ganss, 2014).

Combes y cols. en 2016 elaboraron una tabla bastante completa de la proporción de estos elementos que se encuentran dentro del esmalte y la dentina en mayor y menor proporción, y aquellos denominados Elementos traza (Tabla 1).

Tabla 1. Principales elementos e iones que se pueden encontrar en el esmalte y dentina humana (Combes y cols., 2016).

	Elemento o ión	Dentina	Esmalte
Elementos Mayoritarios (% peso)	C (Total)	11,8	1,4
	CO_3^{2-}	4,6	3,2
	N	4,0	0,32
	Ca	26,9	36,6
	P	13,2	17,7
Elementos Minoritarios (% de peso)	Cl	0,065	0,37
	K	0,024	0,070
	Mg	0,74	0,29
	Na	0,76	0,77
	S	0,070	0,021
Elementos Traza (ppm)	Al	210	55
	B	-	11
	F	215	50
	Fe	44	34
	Pb	15	17
	Sr	145	173
	Zn	148	170

1.2.3.1 ELEMENTOS PRINCIPALES

Entre los elementos que aparecen en mayor cantidad, encontramos el **Nitrógeno (N)**, el cual representa la mayor parte de la matriz orgánica de estas estructuras, ya que forma la mayor parte de las proteínas (**Gomez de Ferraries y cols., 2009; Combes y cols., 2016**).

El **Calcio (Ca)**, por el contrario, representa la mayor parte de la matriz inorgánica. Un esmalte con gran contenido mineral contribuye a la mayor resistencia a la compresión pero más frágil. Un alto contenido en Ca en la saliva va a proporcionar un ambiente protector ante la caries (**Li y cols., 2014; Combes y cols., 2016**).

El **Carbono (C)** lo encontramos tanto en la matriz orgánica como en la inorgánica, y en diversas formas de carbonato. La presencia de carbonatos dentro de la HA va a tener influencias en la descomposición de su estructura (**Slósarczyk y cols., 2005; Combes y cols., 2016**).

El **Fósforo (P)** aparece como iones ortofosfatos asociados a los cristales de HA, en forma de PO_4^{3-} y HPO_4^{2-} (**Combes y cols., 2016**).

Se debe tener en cuenta la importancia de los iones de **Ca** y **P**, ya que su deposición en la superficie rugosa del esmalte, va a ayudar a la remineralización de este. (**Valencia y cols., 2013**) Al disminuir el ratio Ca/P, disminuye el carbonato en superficie y este es sustituido por iones de fluoruro los cuales mejoraran la cristalinidad de la HA. Estos cambios son muy importante para la protección del diente ante las caries (**Combes y cols., 2016**). Estos elementos se van a encontrar en la saliva y por lo tanto van a jugar un papel muy importante en la desmineralización y remineralización (**Arnold y Gaengler, 2007; Li y cols., 2014**).

Un ion muy importante, sobre todo en el esmalte dental es el **ion OH^-** , el cual puede ser observado por técnicas espectroscópicas, en dentina suele aparecer una señal muy debil. Este suele aparecer al someter al diente e a temperaturas superiores de 200°C o bien por una hidrólisis interna entre partículas de agua y PO_4^{3-} (**Combes y cols., 2016**).

1.2.3.2 ELEMENTOS MINORITARIOS Y ELEMENTOS TRAZA

Varios cationes y aniones se incorporan a la HA en las posiciones de Ca^{2+} , PO_4^{3-} Y OH^- , dentro de su matriz, tanto estos elementos minoritarios, destacar Cl y Mg; como los elementos traza:

El **Cloro (Cl)** puede sustituir al ion OH^- en el esmalte. Es un agente desinfectante muy utilizado en tratamientos dentales que disminuye la microdureza del diente (**Ballal y cols., 2015; Combes y cols., 2016**).

El **Magnesio (Mg)**, según **Okazaki y cols. (1986)**, disminuye la cristalinidad de la Hidroxiapatita, incrementa la incorporación de HPO_4^{2-} ; también tiene papeles importantes en las relaciones celulares; promoviendo la adhesión de la célula y contribuye al metabolismo de tejidos finos duros.

Son casi 40 los elementos traza de los que se tiene conocimiento en esmalte y dentina. Se han descrito desde aquellos que se encuentran en cantidades de más de 1000 ppm (Ej. Zn, Sr, Fe, Al, B, Ba, Pb, F, etc.) hasta aquellos por debajo de 100 ppm (Ej. Ni, Li, Ag, As, Se, Nb, Hg, etc.). Encontramos desde elementos necesarios para la vida, elementos tóxicos e incluso elementos sin ninguna función biológica conocida (**Reitznerivá y cols., 2000; Kang y cols., 2004; He y cols., 2008; Combes y cols., 2016**).

Se han utilizado varios métodos analíticos para la identificación de estos elementos traza en diente, entre los que se incluyen la espectrometría de absorción atómica (**Fisher y cols., 2009**), la emisión de rayos x inducida por protones (**Lane y cols., 1997**), la vaporización electrotermal inducida acoplada a un espectrómetro de masas (**Grünke y cols., 1996**), ICP-MS Láser de ablación (**Arora y cols., 2011**) o el análisis elemental de rayos x por energía dispersa (**Hueb y cols., 2010**).

Además, el esmalte y la dentina poseen diferentes concentraciones de estos elementos, por ejemplo, en el esmalte encontramos Mn, Se, Ni, Cu, Pb, Co, I, Sr y Al de manera más abundante que en la dentina, mientras en esta observamos Fe y F en mayores concentraciones. Esto nos indica que ciertos elementos traza podrían ser

incorporados por el medioambiente durante la erupción o depositados durante la calcificación (**Okazaki y cols., 1986; Ghadimi y cols., 2013**).

La presencia de estos elementos traza determina diferentes comportamientos físico-químicos y biológicos de la muestra. En relación a esta afirmación, **Schofield y cols., 2002**, observaron una alta correlación entre la dureza del diente y su contenido de **Zinc (Zn)**.

El **Flúor (F)** lo encontramos en forma de ion Fluoruro (F^-) y varía mucho dependiendo de la dieta. Durante la formación del diente puede producir fluorosis (**Combes y cols., 2016**). El F^- incorporado en HA reduce los ratios de disolución por agentes ácidos. Si la HA se introduce en una solución con concentraciones altas de F^- el cristal puede absorberlo en toda su superficie y se generará un cristal de Fluorapatita o con una composición similar denominado Fluorhidroxiapatita (FHA), que también puede generarse por medio de la formación de otras fases de fosfato cálcico, como el fosfato octacálcico o el fosfato dihidratado dicálcico. La formación de esta FHA disminuye la solubilidad de la HA (**Taube y cols., 2010; Li y cols., 2014**).

La concentración de **Aluminio (Al)** en el cuerpo aumenta con la edad y en gran cantidades de desordenes esqueléticos y cerebrales. También a nivel dental lo podemos encontrar en algunas decoloraciones del esmalte. **Ghadimi y cols. (2013)**, encontraron que con bajas cantidades de Al era más probable encontrar largas grietas en el esmalte y viceversa.

El **Manganeso (Mn)** es un elemento traza que podemos encontrar tanto en la comida, como el aire o el agua. Este Mn^{2+} puede reemplazar al Ca^{2+} dentro de la estructura de la HA, lo cual no provoca cambios significantes en la estructura del cristal, aunque parece estar asociada al tamaño del cristal de apatita (**Ghadimi y cols., 2013**).

El **Hierro (Fe)** va a modificar el contenido de CO_3^{2-} dentro de la HA. Bajas concentraciones de Fe pueden sustituir al carbonato tipo A dentro de la HA sintética (**Low y cols., 2010**).

El **Plomo (Pb)** es un elemento que, aunque estando en unas proporciones ínfimas dentro de la composición del diente, ha tenido repercusión por su aparición en grandes concentraciones en estudios sobre dientes de niños con retrasos mentales. El Pb entra en la estructura del diente sustituyendo al Ca dentro de la HA (**Lane y cols., 1996**).

Se ha relacionado en la literatura la aparición de caries con la presencia de estos elementos traza, encontrando que la presencia de F, Al, Fe, Se o Sr está asociado al bajo riesgo de caries; al contrario que el Mn, Cu y Cd, que se asocian a alto riesgo de aparición de caries. En la saliva podemos encontrar Na, Mg, K y Zn, que son también los más abundantes en el esmalte, lo que nos indica que la saliva puede influenciar la composición del esmalte (**Ghadimi y cols., 2013**).

1.2.3 ESTRUCTURA CRISTALINA

Hasta el día de hoy se conocen 7 sistemas cristalinos, sus longitudes axiales y sus ángulos, que pueden dar una geometría tridimensional a una celda unitaria (Figura 4).

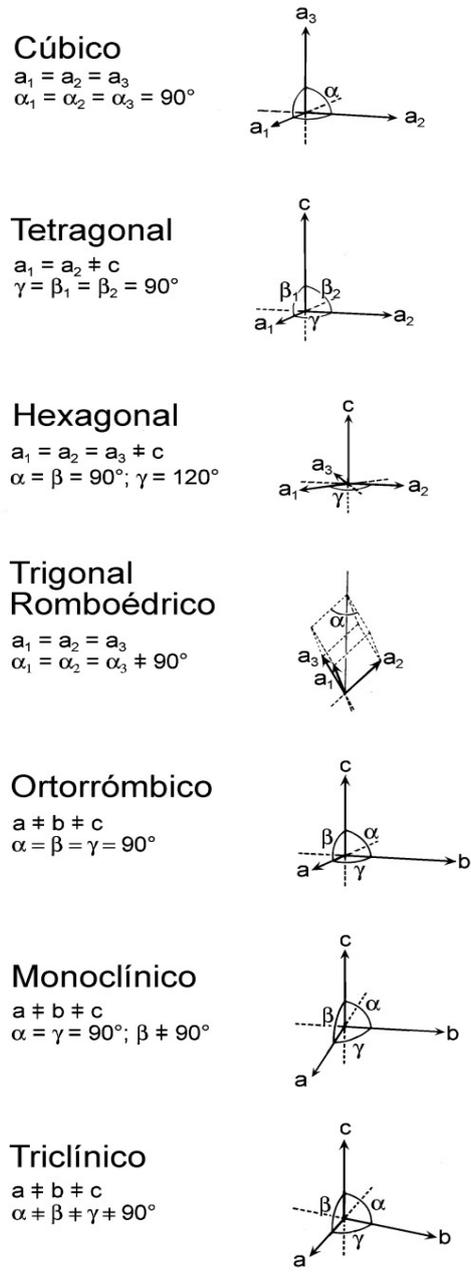


Figura 4. Sistemas cristalinos existentes. Angulaciones y disposición espacial. (<http://identificaciony caracterizacion mineral.wordpress.com> 2013)

La HA, con su fórmula química $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, presenta una estructura cristalográfica hexagonal-dipiramidal, cuyos ejes se representan en la Figura 5.

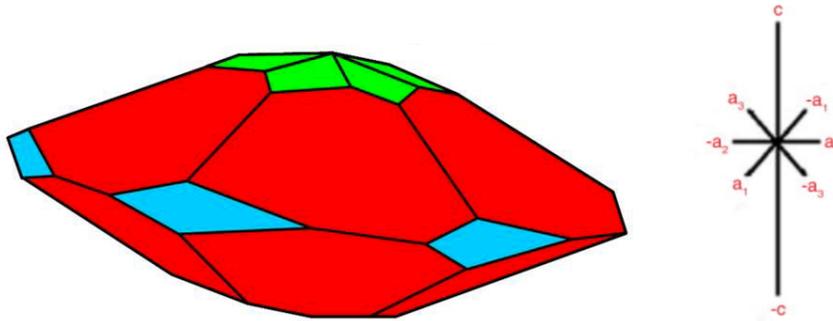


Figura 5. Disposición tridimensional de un cristal de HA. Eje- c y ejes- a en su disposición espacial (<http://webmineral.com> 2016).

La longitud del cristal viene dada por el eje c dentro de la celda unitaria hexagonal pero es complicada de determinar con exactitud. La celda unitaria aparece como un hexágono irregular de diferentes tamaños dependiendo de la especie. Se puede comparar la medida de los ejes de la HA pura (eje $a = 9,418\text{\AA}$; eje $c = 6,879\text{\AA}$) con la medida de los cristales de HA del diente (eje $a = 9,434\text{\AA}$; eje $c = 6,879\text{\AA}$) (Eimar y cols., 2012).

Al poder presentar distintas composiciones químicas, las propiedades fisicoquímicas de los cristales y de los sustratos que los contienen se ven afectadas, especialmente las cristalográficas y las mecánicas (Okazaki y cols., 1986). Ghadimi y cols. (2013) observaron que con la incorporación de elementos traza se modificaban las propiedades cristalográficas de la HA (tabla 2). Algunos elementos expanden el cristal a lo largo del eje a (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} o Sr^{2+}), mientras que otros lo hacen a expensas del eje c , encogiéndolo (SiO₄⁴⁻, CO₃²⁻, Mg²⁺, Zn²⁺ o Ti⁴⁺). Otros elementos traza van a incrementar la cristalinidad o su ordenación estructural (Co²⁺, Ni²⁺ o Cr³⁺).

Tabla 2. Resumen de la literatura de los efectos de los elementos traza en los parámetros cristalográficos de la HA sintética (Ghadimi y cols., 2013).

Parámetros cristalográficos	Elementos traza que incrementan los parámetros cristalográficos	Elementos traza que disminuyen los parámetros cristalográficos
Expansión del eje-a	Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Zn ²⁺ , Sr ²⁺	SiO ₄ ⁴⁻ , CO ₃ ²⁻ , Ti ⁴⁺
Expansión del eje-c	Fe ²⁺ , SiO ₄ ⁴⁻ , CO ₃ ²⁻ , Zn ²⁺ , Fe ³⁺ , Sr ²⁺	Mg ²⁺ , Ti ⁴⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cr ³⁺
Cristalinidad	Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cr ³⁺	SiO ₄ ⁴⁻ , CO ₃ ²⁻ , Zn ²⁺ , Fe ³⁺ , Ti ⁴⁺ , Mg ²⁺ , Ce ³⁺
Ordenación a lo largo del eje-c	Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cr ³⁺	SiO ₄ ⁴⁻ , CO ₃ ²⁻ , Zn ²⁺ , Fe ³⁺ , Ti ⁴⁺ , Mg ²⁺ , Ce ³⁺

La estructura cristalina del diente no se encuentra completa en el momento de la erupción. En su maduración juega un papel importante la saliva, la cual proporcionara todos aquellos minerales necesarios para conseguir un esmalte duro y poco permeable, además de ser rica en iones Ca y P (Valencia y cols., 2013).

Las proteínas presentes en el esmalte pueden ser de gran interés a la hora de inhibir el crecimiento de los cristales de HA, lo que explicaría el porque a mayor concentración de materia orgánica depositada en los cristales, se produzca una disminución de los ejes *a* y ejes *c*, haciéndolos más pequeños (Eimar y cols., 2012).

También juega un papel llamativo en la estructura cristalina el ion OH⁻. Pasteris y cols. (2004), mediante métodos de espectrometría, relaciona la disminución de este ion dentro de la HA estequiométrica con un incremento en la tensión de los cristales y en su tamaño.

En cuanto a la remineralización, se debe tener en cuenta que los prismas que se reparan no lo hacen con su estructura original, al aumentar la cantidad de mineral por el crecimiento de estos o su precipitación en el interior de los defectos (Valencia y cols., 2013). La presencia de Mg⁺² en las apatitas inhibe este proceso de remineralización

pero además disminuye la dimensión del eje a (**Okazaki y cols., 1986**). Por otro lado el F^- ayuda a este proceso de remineralización (**Lussi y Ganns, 2014**).

Eimar y cols. (2011), observan una relación entre la estructura cristalográfica del esmalte y sus propiedades ópticas. Existe una correlación entre el tamaño del cristal de HA del esmalte y la luminosidad o el tono del diente. También se ve influenciado el tono debido a los cambios de orientación del cristal (eje c y eje a). Por lo que parece, la matriz inorgánica afecta a las propiedades ópticas del esmalte pero no la matriz orgánica.

1.2 SUSTRATOS ANIMALES

La elección de la especie **bovina** es aceptada, generalmente, por la gran mayoría de autores. Esta especie posee 20 dientes de leche y 32 dientes permanentes, al igual que la especie ovina. En el maxilar no poseen dientes en la zona anterior, es en la zona posterior donde se encuentran las piezas dentarias, 6 premolares y 6 molares. En la mandíbula se observan 8 dientes en el sector anterior y en el sector posterior 6 premolares y 6 molares (**Fonseca y cols., 2008**).

Durante el proceso de formación dental de la especie bovina, el desarrollo del esmalte y la dentina es mucho más rápido que en el humano. Por ello, el esmalte bovino está compuesto por cristales de HA de mayor tamaño y presenta defectos en su estructura. Todo esto parece contribuir a una tensión superficial menor con respecto al humano (**Oesterle y cols., 1998**).

El diente bovino ha sido clásicamente el más utilizado como sustituto del diente humano para estudios dentales debido a la facilidad de su obtención en grandes cantidades y en buenas condiciones. Sin embargo, su composición química y su estructura no son idénticas al diente humano. Su superficie plana y de mayor extensión que la humana facilita su manipulación (**Yassen y cols., 2011**). Además, se ha demostrado que el grabado ácido en esmalte bovino provoca la formación de una superficie rugosa y los cristales de HA tienen una forma oval y estrecha, en contraposición con la forma redonda observada en el esmalte humano (**Nakamichi y**

cols., 1983). **Schilke y cols., (2000)**, no observan diferencias significativas en ni en el número ni en el diámetro de los túbulos dentinarios entre ambas especies. Aún así, en la literatura no está claro que los dientes bovinos puedan ser sustitutos de los dientes humanos (**Soares y cols., 2016**).

La elección de la especie **porcina** vino marcada por sus similitudes anatómicas y fisiológicas con los dientes humanos, así como por las ventajas económicas y los motivos éticos. Existen incluso enfermedades presentes en los humanos que desarrollan procesos similares en esta especie. El tamaño de sus dientes deciduos también es muy similar al de los humanos (Lopes y cols., 2006). Por el contrario, en la dentición permanente, los dientes porcinos son de mayor tamaño que los humanos, con una raíz que puede hasta triplicar el tamaño de su corona. Se han empleado para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en el crecimiento y la maduración de los tejidos duros dentales (**Wang y cols., 2007**).

En la dentadura porcina se observa un crecimiento permanente en sus caninos (colmillos). Los molares están recubiertos de tuberosidades de esmalte bien diferenciadas, ideales para la trituración de los alimentos (**König y cols., 2008**).

Aunque estructuralmente existan algunas diferencias entre este esmalte y el humano, como la orientación y organización de sus varillas del esmalte o del esmalte interprismático, están formados por las mismas estructuras. La dentina porcina también es similar a la humana (**Popowics y cols; 2004**).

Los dientes **ovinos** aunque no destacan por su uso en estudios de ámbito dental, sí podría ser un sustrato de elección. Se han realizado estudios aislados en raíces de dientes (**Andreasen y cols., 2006**); se han realizado estudios de filtración, presentando mayor filtración que los humanos (**Roux y cols., 2002**). **O'Brian y cols. (2014)** observaron que el esmalte no solamente encierra a la dentina sino que también penetra en la dentina formando paredes internas de esmalte separadas por finas capas de cemento, lo que dificulta su perfecta distinción, haciendo necesario el uso de microscopios ópticos a la hora de separar las muestras. La dureza y módulo de elasticidad de la dentina es muy similar al de la dentina humana (**O'Brian y cols., 2014**).

El uso de cada una de las alternativas al diente humano que se escogieron para este estudio están basados en todos aquellos estudios revisados. También en base a que los esmaltes tiene una base de HA común, y todas estas especies de mamíferos tienen la capa de dentina bajo el esmalte. Así estas alternativas fueron:

1.3 TECNICAS ANALITICAS

Desde finales de los años 20 e inicios de los años 30 del siglo pasado se comenzó a trabajar mediante diversas técnicas de rayos x sobre el esmalte y la dentina. En **1939 Gruner y cols.** hablaban ya de composición química y estructura cristalina de estas estructuras.

Una de las técnicas es la **Difracción por rayos-x (XRD)**, usada para determinar las dimensiones cristalográficas de los cristales de la HA, se obtienen así las longitudes de los ejes *c* y ejes *a* de los cristales que forman la HA (**Mahoney y cols., 2004; Tiznado-Orozco y cols., 2009; Taube y cols., 2010; Eimar y cols., 2011; Eimar y cols., 2012; Ghadimi y cols., 2013**).

La **emisión de rayos-x inducida por partículas (PIXE)**, es una de las técnicas que nos permiten identificar los diferentes elementos que componen la muestra a estudiar, conociendo también su proporción (**Lane y cols., 1996**).

La **espectrometría de fluorescencia de rayos-x de dispersión de longitud de onda (XRF)**, ha sido utilizada en diversos estudios dentales ya que es una técnica que revela los distintos elementos que componen los materiales (**Baranowska y cols., 2004; Christensen y cols., 2012; Oliveira y cols., 2012**).

Otra técnica para hallar los elementos que componen los sustratos es el **Análisis elemental de Carbono y Nitrogeno (C/N)**, que complementa técnicas como la XRF que emiten menos radiación, aunque hay muy poco escrito sobre esta técnica en los dientes (**Polo-Silva, 2012**).

La **Espectroscopía de energía dispersa de rayos-x (EDS)**, se utilizada para la detección de la estructura atómica de las sustancias por medio de una excitación de rayos-x (**Mahoney y cols., 2004; Arnold y Gaengler, 2007; Tiznado-Orozco y cols., 2009**).

La **Espectrometría de infrarrojos transformada de Fourier (FTIR)**, ha sido usada por varios investigadores sobre modelos de HA en los últimos años, con el fin de hallar todos aquellos cambios que se producen sobre la estructura estequiométrica de la HA y su composición química (**Tiznado-Orozco y cols., 2009; Taube y cols., 2010; Eimar y cols., 2011; Eimar y cols., 2012; Ghadimi y cols., 2013; Combes y cols., 2016**).

La **Espectroscopia de fotoelectrones de rayos-x (XPS)**, se utiliza como complemento de FTIR en algún estudio, para encontrar elementos en la superficie de las muestras (**Taube y cols., 2010**).

Encontramos también experimentos realizados con **Espectrofotometría**, ya que parece una técnica precisa y bastante reproducible. Se utiliza para determinar el tono de color del esmalte o la dentina (**Ghadimi y cols., 2013**).

El **Plasma de acoplamiento inductivo junto a un espectrofotómetro de emisión óptico (ICP-OES)**, se usa para hallar la concentración de los elementos traza en las muestras (**Ghadimi y cols., 2013**).

La **Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**, para comprobar, a altas magnificaciones, la ordenación de los átomos dentro de las muestras y observar las longitudes de los ejes *c* y ejes *a* que conforman los cristales de HA (**Tiznado-Orozco y cols., 2009; Eimar y cols., 2102**).

Microscopía electrónica de barrido (SEM), con la cual se pueden obtener imágenes nítidas de la microestructura de los dientes (**Schilke y cols., 2000; Clemente-Presas, 2002; Mahoney y cols., 2004; Arnold y Gaengler., 2007; He y Swain, 2008**).

El **análisis termogravimétrico (TGA)**, en ocasiones acoplado a **espectrometría de masas (TG-MS)**, es una técnica usada para la descomposición térmica de las muestras, permite hallar la fracción pesada de la HA, el colágeno y el agua (**Tiznado-Orozco y cols., 2009; Deymier-Black y cols., 2012**).

Otro método de descomposición térmica es la **Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**, que permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia al ser mantenida a temperatura constante, o cuando es calentada o enfriada en un rango de temperatura. Permite determinar la temperatura de transición vítrea entre muchas otras propiedades (**Suriñach y cols., 1992; Reyes-Gasga, 2008**).

Los estudios de **dureza** del diente también son muy habituales en la bibliografía, existiendo gran variedad de resultados al comparar tanto dientes (densidades, componentes, elementos traza, grado de cristalinidad o porosidad) como estudios entre sí (muestreo, conservación de las piezas o parámetros mecánicos) (**Eimar y cols., 2012**).

También son muy habituales los estudios de **adhesión** sobre esmalte y dentina, siendo de gran interés para los procesos restauradores y tratamientos ortodóncicos (**Atash y cols., 2005; Dutra-Correa y cols., 2007**).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO

2.1 HIPÓTESIS

El diente bovino es el más apropiado para sustituir al diente humano en los estudios experimentales in vitro.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Conocer cuál es el diente animal (bovino, ovino y porcino) más parecido al humano en base a la composición y la estructura cristalina de su esmalte y su dentina.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Objetivo 1.** Estudiar la composición que presentan el esmalte y dentina de humano, bovino, ovino y porcino mediante Análisis Elemental (C/N), Termogravimetría unida a Espectrometría de Masas (TG-MS) y Espectrometría de Fluorescencia de Rayos X por dispersión de longitud de onda (XRF).
- **Objetivo 2.** Estudiar la nanoestructura cristalina que presentan el esmalte y dentina de humano, bovino, ovino y porcino mediante Difracción de Rayos X (XRD), Espectrometría infrarroja transformada de Fourier (FTIR) y Calorimetría diferencial de barrido (DSC).
- **Objetivo 3.** Determinar cuales son los sustratos más apropiados para sustituir al esmalte y dentina humanos en los estudios experimentales in vitro, aplicando un método de toma de decisiones multicriterio (MCDM).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 GRUPOS EXPERIMENTALES. DIENTES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

Los sustratos dentales estudiados, *grupos experimentales*, fueron esmalte bovino (EB), dentina bovina (DB), esmalte ovino (EO), dentina ovina (DO), esmalte porcino (EP), dentina porcina (DP), esmalte humano (EH) y dentina humana (DH). El polvo de hidroxiapatita (HA, Reference #04238, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) fue analizada como un sustrato de control.

Para este estudio se utilizaron 400 incisivos y molares recién extraídos y libres de roturas de esmalte, caries y obturaciones: 100 humanos, 100 bovinos, 100 ovinos y 100 porcinos. Tras la extracción, los dientes fueron lavados con abundante agua destilada para eliminar cualquier traza de sangre y restos orgánicos y almacenados en agua destilada, que fue cambiada diariamente para evitar el deterioro. En ningún caso un diente permaneció almacenado más de un mes después de su extracción.

Los dientes humanos fueron extraídos por razones terapéuticas en la Clínica Odontológica de la Universidad de Murcia. Los dientes animales se obtuvieron a partir de animales sacrificados en el matadero industrial El Cabezo de la Plata, Murcia.

Los dientes fueron seccionados, separando el esmalte y la dentina mediante una fresa de diamante (Horico, Berlín, Alemania) bajo abundante irrigación acuosa. Para asegurar la correcta clasificación de los fragmentos, se observaron con un estereomicroscopio (NIKON SMZ-U, Yokohama, Japón). Las secciones de dientes fueron trituradas a mano con un mortero de ágata y las partículas más grandes de 100 μm fueron molidas con un molino de disco (HSM 100H, Herzog, Maschinen- fabrik, Osnabrick, Alemania). Durante la molienda, cada muestra se refrigeró añadiendo 2 mL de hexano (n-hexano 95%, Panreac, Barcelona, Spain), con el fin de evitar cambios estructurales.

Las muestras fueron calentadas a 60 °C durante 24 horas en un horno (UFP 500, Memmert, Nuremberg, Alemania) para poder eliminar parte de su humedad. El polvo obtenido de cada uno de los sustratos fue distribuido entre las diferentes técnicas analíticas.

3.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS COMPOSICIONAL

3.2.1. Análisis elemental (C/N)

Este análisis fue realizado con un analizador elemental automático LECO TRUSPEC CN (LECO, St. Joseph, MI, EEUU) (Figura 6). Por cada grupo experimental se utilizaron dos muestras de 0.1g pre-encapsuladas y pesadas en el instrumento cargador. Posteriormente se colocaron en la cámara de purga del instrumento, directamente en el horno. Todos los gases atmosféricos fueron eliminados durante el proceso de transferencia. Se utilizó un sensor infrarrojo no dispersivo para detectar el CO₂, optimizado para disminuir el tiempo de análisis. Los gases NO_x fueron trasferidos a través de un tubo de reducción relleno de cobre para producir N₂, el cual fue detectado usando un sensor de conductividad térmica.



Figura 6. Analizador elemental LECO TRUSPEC CN.

Con el fin de diferenciar la fracción orgánica y la inorgánica del carbono, se realizó un ataque ácido gota a gota con HCl sobre una muestra de cada grupo, hasta que se completó la descomposición de los carbonatos. Posteriormente, las muestras fueron calentadas durante 24 horas a 110 °C para eliminar el H₂O. Para determinar el carbono y nitrógeno total, las muestras no fueron pre-tratadas con ningún ácido.

3.2.2. Termogravimetría – Espectrometría de masas (TG-MS)

Por cada grupo experimental se utilizaron 10 mg que fueron calentados en un analizador termogravimétrico (modelo TGA/DSC 1 HT, Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Suiza) (Figura 7a). Las muestras fueron introducidas en crisoles de óxido de aluminio de 70 µL de capacidad y calentadas en un rango de 10 °C a 1100 °C, en una atmósfera de oxígeno (50 mL/min) que favorece la descomposición de la muestra, obteniéndose los termogramas correspondientes.

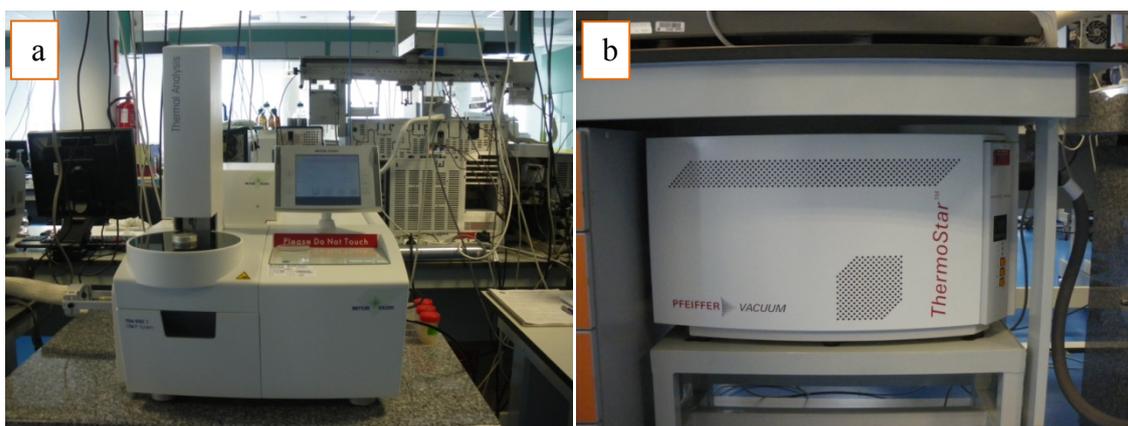


Figura 7. a) Analizador termogravimétrico modelo TGA/DSC 1 HT, Mettler-Toledo. b) Espectrómetro de masas Balzers Thermo-Star modelo QMS 300M3.

Se realizó un análisis matemático detallado de la descomposición térmica de cada muestra para conseguir las curvas termogravimétricas (Figura 8). El rango completo de temperatura se distribuyó en tres sigmoides cuyos escalones muestran la pérdida de los gases eliminados durante cada intervalo (Figura 8a). La derivada de la curva termogravimétrica (DTG) se utilizó para establecer los límites intermedios entre cada una de las descomposiciones (Figura 8b).

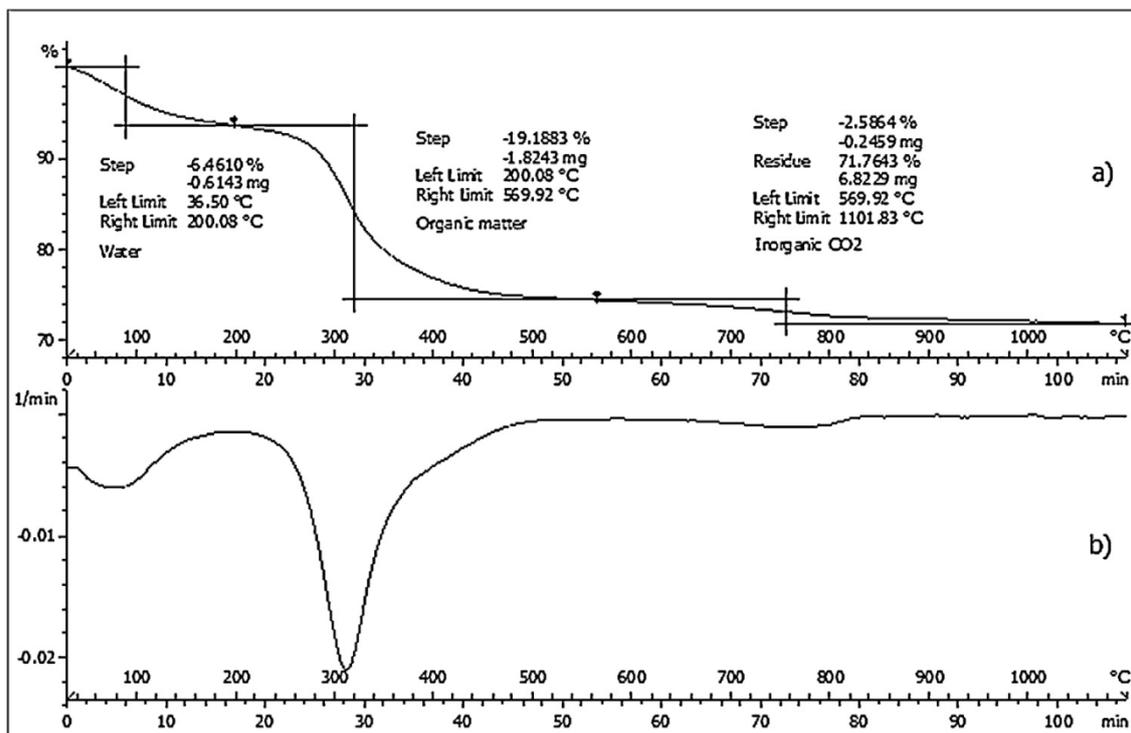


Figura 8. TG-EM. Resultado para la dentina humana: (a) curva TG. (b) curva DTG. Se muestran tres tipos de componentes de la dentina humana secuencialmente. La primera pérdida de masa se produce a temperaturas hasta 200 °C y corresponde a la mayoría de componentes volátiles (agua); de 200 °C a 560 °C se produce la combustión de la fracción orgánica para producir el CO₂, H₂O y NO_x; por encima de los 570 °C existe una pérdida gradual de los gases unidos a materia inorgánica (CO₂). La fracción residual corresponde al fosfato de calcio.

Para el estudio de los gases desprendidos durante la combustión, al analizador termogravimétrico se le acopló un espectrómetro de masas (Balzers Thermo-Star modelo QMS 300M3, Liechtenstein) (Figura 7b). La relación m/z para las especies analizadas fue: H₂O ($m/z = 18$), HCl ($m/z = 36$), CO₂ ($m/z = 44$) y SO₂ ($m/z = 64$). El tiempo de medida para cada ion fueron 10 s y el voltaje del cátodo en la fuente de iones fue de 65 V. Este análisis identificó los gases expulsados describiendo un perfil en el tiempo, proporcionando información sobre el mecanismo de descomposición (Figura 9).

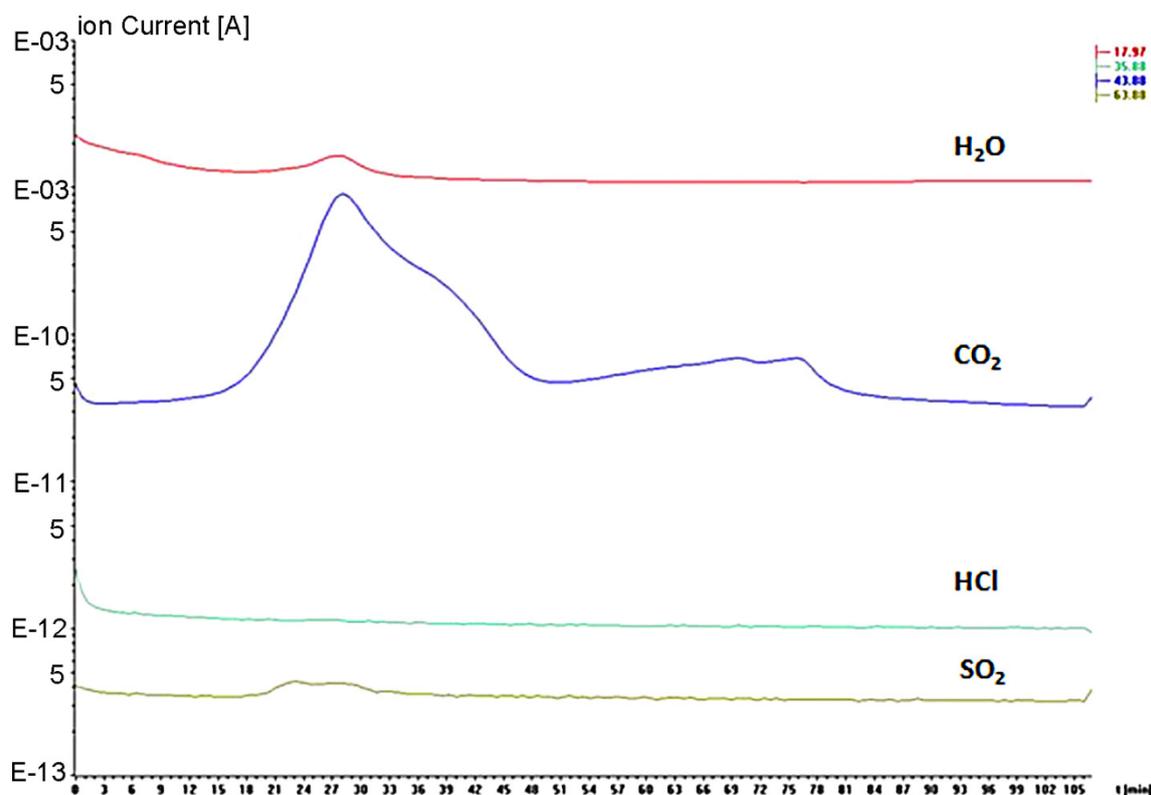


Figura 9. TG–MS. Curvas espectrométricas relativas a las masas elegidas para el análisis de los gases desprendidos en la termobalanza. El resultado mostrado corresponde a la dentina humana. Las cuatro líneas mostradas pertenecen al agua (H_2O), dióxido de carbono (CO_2), cloruro de hidrógeno (HCl) y dióxido de azufre (SO_2). En la línea de H_2O , se aprecia una inflexión inicial relativa al agua libre, además de un pico de descomposición de CO_2 y H_2O , correspondiente a la combustión de la materia orgánica. En la línea de CO_2 , se observa la diferencia entre el carbono orgánico e inorgánico. Ambas descomposiciones en dos rangos térmicos diferentes. En la muestra de HA se obtuvo un solo pico. En la línea de SO_2 , ambos picos están asociados a las proteínas, siendo más intensos en las dentinas que en los esmaltes. En la HA no aparece azufre. La línea de HCl aparece horizontal, lo que indica la ausencia de Cl unido a la materia orgánica.

3.2.3. Espectrometría de fluorescencia de rayos X por dispersión de longitud de onda (XRF)

Para realizar esta técnica se tomaron 5 g de polvo de cada sustrato para conformar un disco de 40 mm de diámetro, usando una prensa hidráulica semiautomática (Nannetti Mignon-SS, Faenza, Italia), sin necesidad de utilizar ningún aditivo consolidante.

La muestra fue optimizada a 5 g en base a un estudio previo sobre un patrón de hidroxiapatita (Referencia #04238, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). Las muestras fueron analizadas usando un espectrómetro (Bruker S4 Pioneer, Karlsruhe,

Alemania) (Figura 10) equipado con un tubo de rayos X de anticátodo de Rh (20– 60 kV, 5–150 mA, y 4 kW máximo), cinco cristales analizadores (LiF200, LiF220, Ge, PET, and XS-55), un contador proporcional sellado para la detección de elementos ligeros, y un contador de centelleo para los elementos pesados. Este espectrómetro de fluorescencia de rayos X por dispersión de longitud de onda trabaja de manera secuencial, adaptando una configuración óptica diferente para cada línea espectral. La resolución de energía y eficiencia para cada línea analítica se determinaron por la apertura del colimador y el cristal analizador correspondiente. El análisis se realizó en vacío para evitar pérdida de señal por la absorción del aire, permitiendo la detección de elementos de bajo número atómico (Z). El espectro recogido fue evaluado por el método de parámetros fundamentales, usando la aplicación SpectraPLUS asociada al espectrómetro (en concreto EVA 1.7, un paquete comercial de Bruker-AXS y Socabim, Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Alemania, 2006). Se utilizó un método sin patrones debido a la falta de materiales de referencia adecuados con concentraciones elementales en el mismo rango que los materiales inorgánicos analizados en este estudio. El uso de procedimientos semicuantitativos en el método de parámetros fundamentales ha sido descrito por **Rousseau y cols., 2001**. Los análisis fueron evaluados en forma de óxidos, como es habitual en muestras minerales.



Figura 10. Espectrómetro Bruker S4 Pioneer.

Las relaciones estequiométricas Ca/P se calcularon usando la siguiente fórmula, teniendo en cuenta sus respectivas masas: $\text{Ca (mol)/P (mol)} = [\text{Ca (\%p/p)/40.08 (g/mol)}]/[\text{P (\%p/p)/ 30.97 (g/mol)}]$.

3.3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTRUCTURAL

3.3.1. Difracción de rayos X (XRD)

1g de polvo de cada sustrato se introdujo en un difractómetro de rayos X (D8 Advance en modo θ - θ , Bruker, Karlsruhe, Alemania) (Figura 11), con radiación $\text{CuK}\alpha$, 40 kV, 30 mA, y un detector 1-dimensional súper rápido LynxEye con una ventana de 3.5° . La óptica primaria consistió en una rendija Soller de 2° , una rendija de incidencia de 1 mm y una pantalla antidispersiva para reducir la dispersión del aire, que influye sobre el fondo del difractograma a ángulos más bajos. La óptica secundaria incluyó una rendija antidispersión de 8 mm, un filtro de níquel y una rendija Soller de 2.5° .



Figura 11. Difractómetro de rayos X D8 Advance en modo θ - θ , Bruker.

Las muestras se pasaron en un rango de 10 a 70° en 2θ , a intervalos de 0.02° , 1.5 s/etapa y sin rotación, para evitar pérdidas de muestra por efecto de la fuerza centrífuga. Los especímenes se montaron en portamuestras de retrocarga, para reducir el efecto de orientación preferencial de los cristales.

Los patrones de difracción fueron evaluados con el software TOPAS (**TOPAS 4.2, 2009**) en modo de edición directa y con rutinas locales. Se analizó un patrón de corindón ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$, NIST 676) a temperatura ambiente para obtener la función de resolución instrumental del difractómetro. Esta contribución se eliminó de la anchura de pico instrumental para obtener un análisis microestructural más preciso. Se usó la aproximación de Double-Voigt (**Balzar y cols., 1999**) para realizar un análisis microestructural de la anchura del pico. Según este método, hasta 4 funciones se podrían ajustar en el mayor de los casos: las funciones lorentziana y gaussiana para el efecto del tamaño del cristalito (β_{LS} y β_{GS}), y las funciones lorentziana y gaussiana para la distorsión o efecto de la microdeformación (β_{LD} y β_{GD}). Debido a la naturaleza de las muestras se descartó el ensanchamiento del pico por efecto de la microdeformación. Una vez que β_{LS} y β_{GS} se ajustaron a los picos, se calcularon los tamaños del cristalito a partir de la anchura integral β_i (**Stokes y Wilson., 1942**), según la siguiente fórmula, que proviene de la ecuación de Scherrer (**Scherrer, 1918**):

$$\beta_i = \frac{\lambda}{\varepsilon \cdot \cos\theta}$$

dónde λ es la longitud de onda, ε es el tamaño del cristalito y θ es el ángulo de Bragg. Esta expresión es válida para un pico individual porque da exactamente la altura de la columna difractante promediada en volumen (L_{vol}) en una dirección cristalográfica (este término se conoce comúnmente como el tamaño del cristalito). Cuando esta expresión se aplica a todo el difractograma, se asume que la forma del cristalito es próxima a una esfera ideal de tal forma que el tamaño resultante del cristalito en todas las direcciones cristalográficas es casi el mismo. En particular, los especímenes analizados presentaron un ensanchamiento del pico marcadamente anisotrópico, lo que significa que las anchuras de pico dependían de la dirección cristalográfica. Este fenómeno ha sido discutido ampliamente por diferentes autores (**Hanlie y cols., 2006; Simmons y cols., 2011; Leventouri y cols., 2009**), quienes sugirieron estimar el tamaño del cristalito a lo largo de los ejes-*c* y ejes-*a* del carbonato apatito, usando los picos de Bragg 002 y 310, debido a que no solapan con otros picos.

En este caso, el ensanchamiento anisotrópico del pico se corrigió con la descripción generalizada de los armónicos esféricos (GAE). Esta aproximación se emplea generalmente para corregir el efecto de orientación preferencial en análisis de datos de difracción de polvo (**Järvinen y cols., 1993, Bunge y cols., 2013**). En particular, el ensanchamiento anisotrópico del pico se modelizó en el presente estudio con una descripción GAE de octavo orden mediante el refinamiento de 6 armónicos esféricos independientes (C_{ij}).

Como ejemplo, la Figura 12 muestra la buena concordancia entre los perfiles de difracción calculados para el esmalte porcino y la dentina ovina. Para este modelo, los tamaños de los cristales en el eje-c y el eje-a del ACE fueron estimados con precisión usando los picos de Bagg 002 y 030. La precisión está basada en el uso de una función matemática bien establecida (curvas de Lorentzian y Gaussian) que reproduce la forma de los picos. Por lo tanto, el problema del solapamiento se soluciona y en él se puede estudiar el difractograma completo en vez de hacerlo usando picos individuales. Los dos procedimientos siguientes se usaron para perfeccionar el difractograma observado sin ningún riesgo.

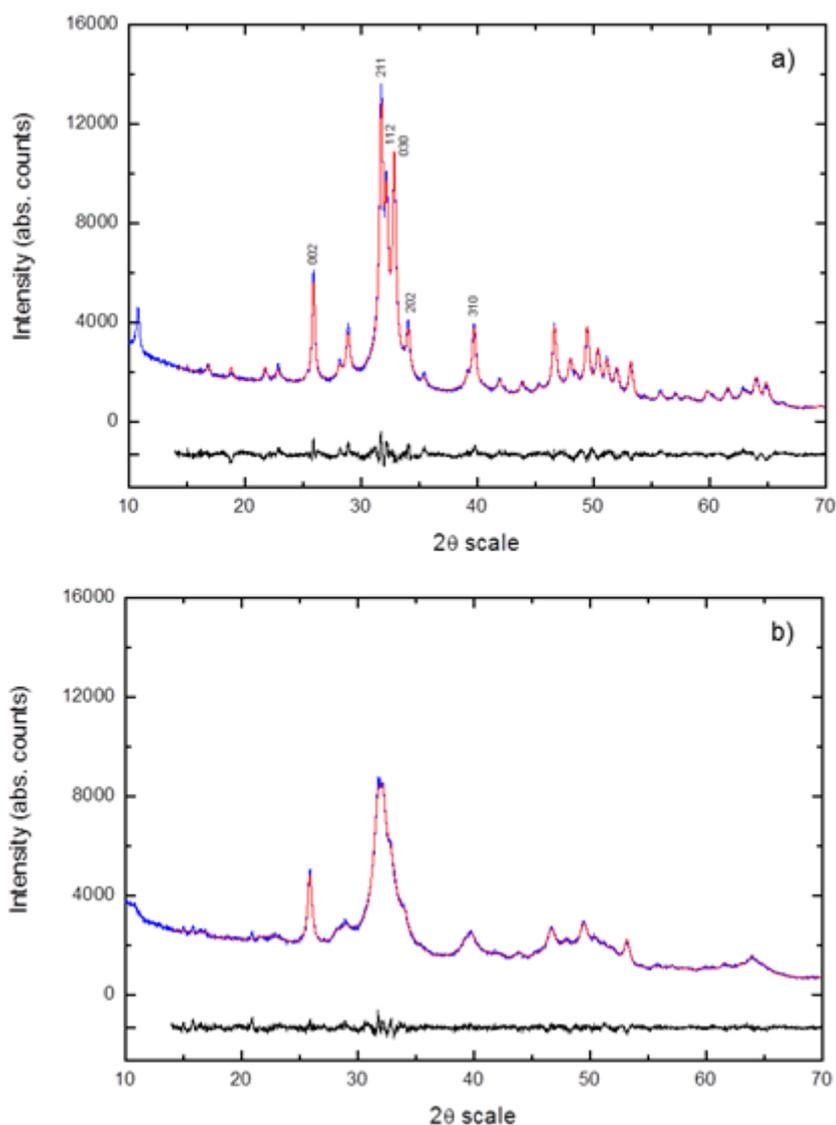


Figura 12. Medida de los patrones XRD (línea azul), patrones calculados (línea roja) y la diferencia entre ambos (línea negra en la parte inferior). Los índices de Miller de los picos de Bragg citados en este estudio aparecen en la gráfica superior. a) Esmalte porcino (EP) y b) dentina ovina (DO).

Procedimiento de descomposición total del diagrama de difracción de polvo (WPPD)

Se realizó un primer ajuste del difractograma con el llamado procedimiento WPPD, con motivo de perfeccionar los parámetros y el error cero instrumental, por el método Pawley (**Pawley, 1981**). El procedimiento WPPD no limita la intensidad de todas las refracciones cuando se introduce una estructura no cristalina. La intensidad de cualquier reflexión es ajustada para observarla, consiguiendo mejores ajustes (menor Rwp representa mayor ajuste) que el procedimiento convencional de Rietveld, donde se usan

estructuras cristalinas. Como consecuencia, la anchura del pico puede calcularse bien y de igual forma el tamaño del cristal. Sin embargo, con este procedimiento es imposible diferenciar entre la intensidad dispersa por el material cristalino y el no cristalino a menos que haya una estandarización. En este estudio, el fondo fue definido por el tercer orden del polinomio de Chebychev.

La tabla 7 muestra los parámetros de a y c , junto con el factor R_{wp} de acuerdo al procedimiento convencional de Rietveld, entre los difractogramas calculados y experimentales. Se puede observar que el tamaño del cristal era siempre mayor para los esmaltes que para las correspondientes dentinas, siendo los especímenes humanos los que poseían los tamaños mayores de cristalitos.

El índice de cristalinidad (IC) fue calculado, según **Person y col., 1995**; intentando relacionar sus valores con el tamaño de los cristalitos. IC se definió como el cociente de las intensidades de los picos integrados, considerando el fondo como una línea recta de 30 a 35° (2θ):

$$CI_{Person} = \frac{I_{112} + I_{030} + I_{202}}{I_{211}}$$

donde I_{hkl} denota la intensidad integrada (área) de la correspondiente reflexión hkl . La Tabla 7 resume el IC estimado para las muestras.

Procedimiento de Rietveld

Además, se utiliza el ajuste convencional de Rietveld (**Rietveld, 1969**) usando la estructura cristalina de la apatita de carbonato (**Fleet y cols., 2011**), la cual ha sido demostrado que es la fase más abundante en el diente humano (**Taube y cols., 2010**). Ambos factores, tanto la posición atómica, como la temperatura, son fijados a través de este ajuste. Este procedimiento limita las intensidades de reflexión en unos límites estrechos de la estructura cristalina elegida. En una muestra en polvo orientada al azar ideal, no existe un efecto de orientación preferida (OP). Desafortunadamente, esta

situación óptima no ocurre geoméricamente en reflexión, siempre aparece algún grado de de orientación en los cristalitas. El efecto de OP es mayor cuando los cristalitas se alejan de la forma esférica, cambiando la intensidad relativa de los picos en la estructura cristalina tomada.

En este caso, los cristalitas de apatita carbonatada no son esféricos, así que pueden ser estudiados de los tamaños estimados de los cristalitas en direcciones $\langle 010 \rangle$ y $\langle 001 \rangle$. Como resultado, es necesario aplicar alguna corrección al efecto de OP para conseguir un buen ajuste. El modelo de March-Dollase (**March y Krist, 1932; Dollase, 1986**), capaz de usar dos direcciones cristalográficas, se aplicó para las direcciones $\langle 010 \rangle$ y $\langle 001 \rangle$. El índice de March-Dollase de unidad significa que no hay presente OP. Un valor inferior a 1 en este índice indica hábito cristalino laminar, mientras que si es superior a 1 indica hábito cristalino acicular para una dirección cristalina específica $\langle uvw \rangle$. El fondo fue definido por el veinteavo orden del polinomio de Chebychev. Los tamaños de los cristalitas fueron calculados mediante el procedimiento WPPD.

El IC fue hallado por el ratio de intensidad entre el área difractada debajo de la fase del ACE (I_{CAP}) y el área difractada debajo del fondo (I_{bkg}), de acuerdo a la fórmula:

$$CI_{Rietveld} = \frac{I_{CAP}}{I_{bkg} + I_{CAP}} \cdot 100$$

Con forme el CI decrece, la contribución de los picos amplios para la intensidad de difracción es mayor y por otro lado la masa a dichos picos también incrementa.

3.3.2. Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Para realizar esta técnica se usaron 100 mg por cada uno de los sustratos. El espectro total de reflectancia atenuada de espectrometría infrarroja transformada de Fourier (TAR-FTIR) fue recogido mediante un espectrómetro Nicolet 5700 (Thermo Company, EEUU) (Figura 13) usando un accesorio TAR de un solo rebote (Smart

Orbit) con un elemento de reflexión interna de diamante a temperatura ambiente (25 °C). Este espectro fue estudiado en un rango de 1800 – 500 cm^{-1} mediante el uso de un software de barrido rápido OMNIC 8.0 con 40 barridos y una resolución de 4 cm^{-1} , aunque el espectro completo es de 4000 – 400 cm^{-1} (infrarrojo medio).



Figura 13. Espectrofotómetro Thermo Nicolet 5700.

Se examinaron dos regiones del espectro, la primera en el rango 1800–700 cm^{-1} , en el que se pudo determinar exhaustivamente el contenido orgánico e inorgánico de la muestra. El contenido orgánico del esmalte se representó a través de la Amida I (~ 1635 cm^{-1}) y el carbonato contenido en la matriz mineral del esmalte se obtuvo a través de v_2PO_4 el tipo A (~ 878 cm^{-1}) y el tipo B (~ 872 cm^{-1}) de acuerdo al estudio de **Eimar y cols., 2012**. El resultado fue normalizado a la absorbancia de la frecuencia v_3PO_4 en 1015 cm^{-1} (Figura 14).

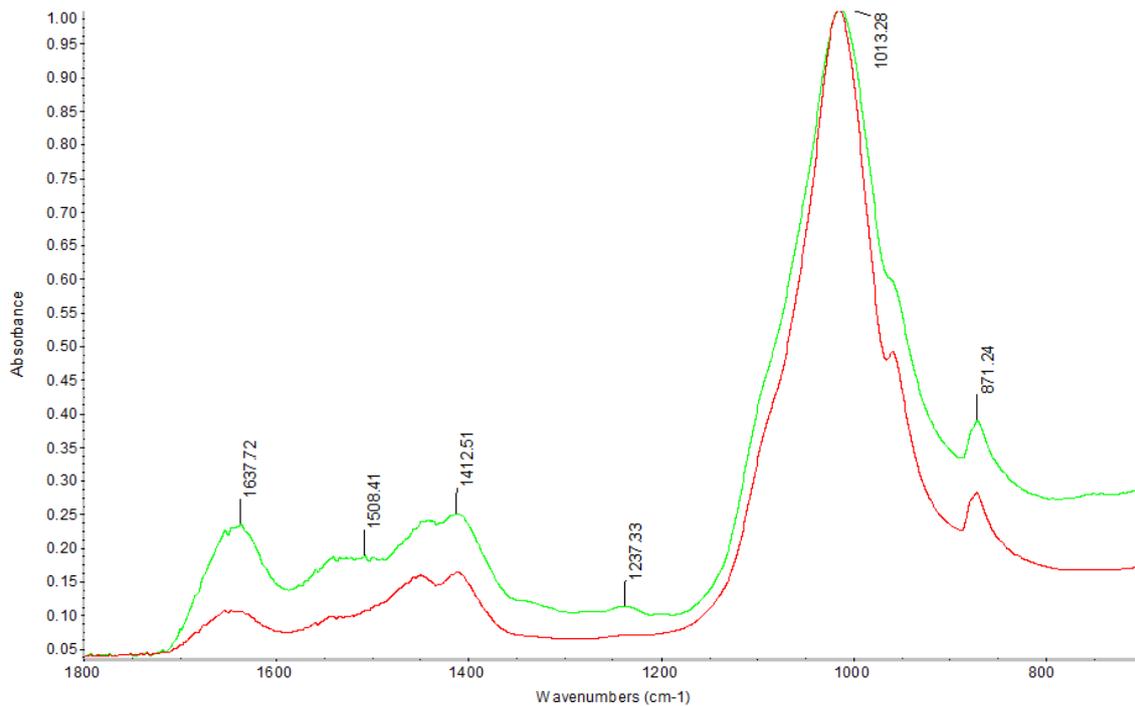


Figura 14. Representación del TAR-FTIR comprendido entre las longitudes de onda 1800–700 cm^{-1} de las muestras de esmalte y dentina ovina. En ella se resaltan los picos más significativos para diferenciar el contenido orgánico e inorgánico de la muestra. Destacan los picos a $\sim 1635 \text{ cm}^{-1}$ para la Amida I que corresponde a proteínas, $\sim 1015 \text{ cm}^{-1}$ para $\nu_3\text{PO}_4$ que corresponde a HA pobremente cristalizada, $\sim 878 \text{ cm}^{-1}$ para $\nu_2\text{PO}_4$, que corresponde al carbonato apatita tipo A, y $\sim 872 \text{ cm}^{-1}$ también para $\nu_2\text{PO}_4$, que corresponde al carbonato apatita tipo B.

La segunda parte de este estudio se llevo a cabo en el rango de 750–500 cm^{-1} (Figura 15), para distinguir lo referente a la estructura cristalina siguiendo los pasos dados por Reyes-Gasga, por el método de Weiner y Bar-Yosef (**Reyes-Gasga y cols., 2013**), consistente en un cociente para hallar el índice de cristalinidad (IC_{FTIR}), a través de las alturas de los picos 605 cm^{-1} , 565 cm^{-1} y 595 cm^{-1} , siendo la señal de 595 cm^{-1} el pico medio entre las otras dos señales, por medio de la fórmula:

$$\text{IC}_{\text{IRTF}} = (A_{565} + A_{605}) / A_{595}$$

donde A_X es la absorbancia dada en longitud de onda. De esta forma, si el tamaño del cristal aumenta, A_{565} y A_{605} también aumentan, mientras que si A_{595} disminuye, IC_{FTIR} también aumentará.

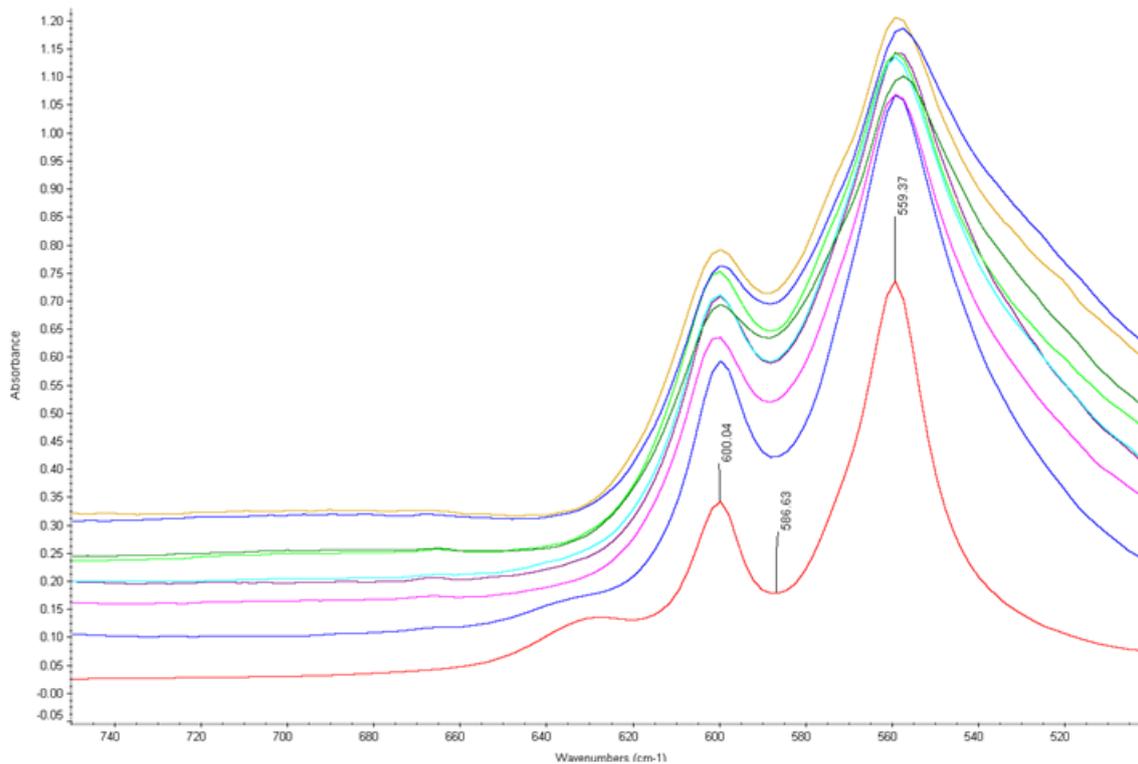


Figura 15. Representación del TAR-FTIR comprendido entre las longitudes de onda 750–500 cm^{-1} de todas las muestras de esmalte y dentina. En ella se resaltan los picos más significativos para hallar la estructura cristalina de acuerdo al método de Weiner y Bar-Yosef .

3.3.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Hemos usado la calorimetría diferencial de barrido en ambiente oxidante e inerte. En atmósfera oxidante, entre los 25 °C y los 230°C, se producen dos procesos endotérmicos (pérdida de agua y desnaturalización de proteínas). A partir de 230 °C se produce un proceso exotérmico, con la combustión de la fracción orgánica en 2 etapas. En atmosfera inerte, entre -140 °C y -10 °C, existe una zona de transición vítrea, y un proceso endotérmico entre los -10°C y los 290 °C, de pérdida de agua y desnaturalización de proteínas.

10 mg de casa sustrato se introdujeron en el calorímetro de barrido diferencial DSC 822e (Mettler-Toledo, Alemania) (Figura 16).

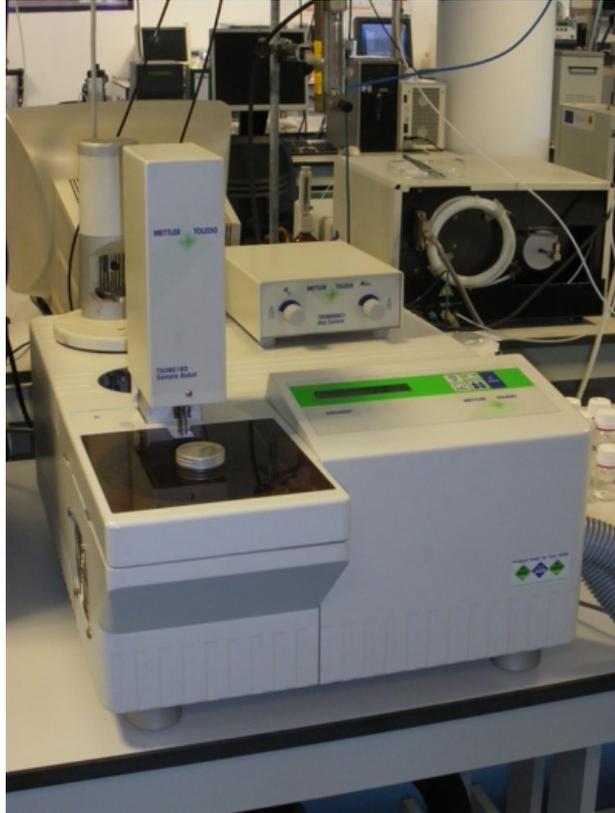


Figura 16. Calorímetro de barrido diferencial DSC 822e Mettler-Toledo.

3.4. Toma de Decisiones Multicriterio (MCDM)

Para decidir cuál va a ser el sustituto más fiable del diente humano en base a los resultados obtenidos con las diferentes técnicas utilizadas, recurrimos a metodologías de toma de decisiones multicriterio (MCDM).

La toma de decisiones es un proceso de selección entre cursos alternativos de acción, basado en un conjunto de criterios, para alcanzar uno o más objetivos (**García Cascales, 2009**).

Los problemas de toma de decisión se estructuran de la siguiente forma (Figura 17):

- Definición del problema: es el primer paso para la toma de decisiones; si no se define un problema, no habrá ni objetivo definido ni una solución veraz.

- Identificación de alternativas: es la detección de la cantidad de opciones que tiene el decisor para efectuar la decisión.
- Determinación de criterios: corresponde a las características más relevantes que los decisores han considerado para luego evaluar, en función de ellos, qué alternativa resulta más conveniente.

Estructuración del problema de decisión

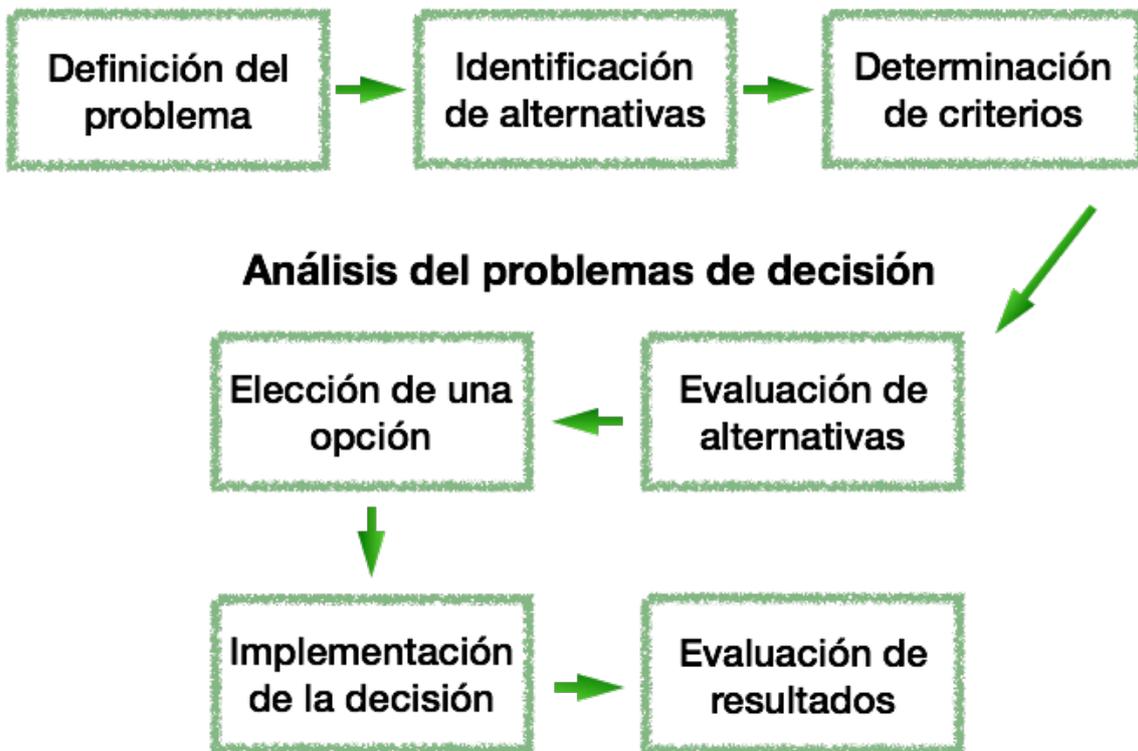


Figura 17. Representación de las fases de un proceso de decisión multicriterio.

Para nuestro estudio recurrimos a la metodología AHP (Proceso Analítico Jerárquico), para obtener el peso o coeficiente de importancia de los criterios, y el método RIM (Método de Referencia Ideal) que permite llevar a cabo un proceso de comparación de alternativas en base a una alternativa ideal. La extracción del conocimiento se llevó a cabo a través de un cuestionario enfocado a expertos para obtener el pesos de los criterios.

3.4.1. Proceso Analítico Jerárquico (AHP).

El AHP es un modelo de MCDM robusto y flexible utilizado para tratar problemas de decisión complejos (Saaty TL, 1980). El AHP intenta estimar el impacto de cada una de las alternativas sobre el objetivo de la jerarquía total.

Los pasos a seguir en el método AHP son los siguientes:

- **Paso 1: estructurar el problema como una jerarquía.**

El primer paso del método AHP consiste en modelar el problema de decisión que se pretende resolver como una jerarquía.

La jerarquía adopta la siguiente forma (Figura 18):

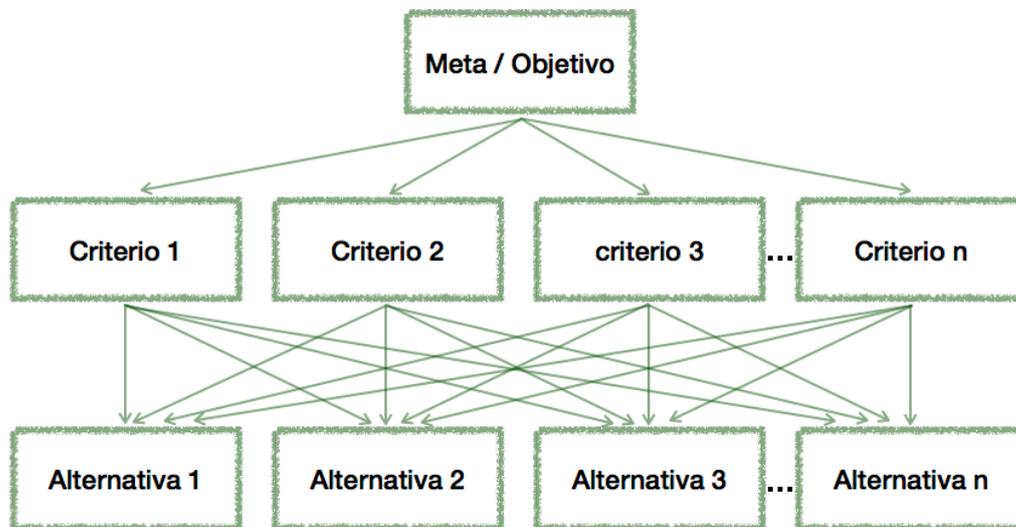


Figura 18. Interrelación entre criterios y alternativas en el proceso de AHP.

En el vértice superior de la jerarquía se sitúa la meta u objetivo que se pretende alcanzar. El problema de decisión consiste en elegir la alternativa que mejor contribuye a la consecución de la meta del nivel superior de la jerarquía.

En el siguiente nivel, en orden descendente desde la meta, se sitúan los criterios. Estos criterios corresponden a aspectos tales como atributos, objetivos o parámetros que constituyen los ejes fundamentales a partir de los cuales el decisor justifica, transforma y argumenta sus preferencias. La selección adecuada de los criterios

constituye una etapa fundamental en cualquier proceso de toma de decisión, ya que un planteamiento inadecuado de los mismos puede llevar a resultados poco satisfactorios o incluso a invalidar todo el proceso: se deben definir los criterios que son importantes en el problema.

Finalmente, en el último nivel de la jerarquía, se sitúan las alternativas, que son el conjunto de posibles opciones definidas sobre las que la unidad decisora realiza una decisión. El AHP pretende ser una herramienta de ayuda al decisor en el proceso de elección de la alternativa que mejor contribuye a alcanzar la meta del problema planteado.

- **Paso 2 – Establecimiento de las prioridades entre los criterios.**

El objetivo de este paso es construir un vector de prioridades o pesos que evalúe la importancia relativa que la unidad decisora otorga a cada criterio. El problema clave que se plantea en este punto es responder a cómo se puede asignar un valor numérico a cada criterio que represente, del modo más ajustado posible, la preferencia del decisor de un criterio frente a otro.

El decisor sólo tiene que realizar una valoración sobre la importancia del criterio verbalizada en términos cualitativos y después acudir a una escala, que previamente ha sido establecida, para obtener los valores numéricos que se corresponden con su valoración. Por tanto, como paso previo a la resolución del problema de asignación de pesos, se debe definir la correspondencia entre valoración cualitativa del decisor y la asignación numérica.

Se asume que los juicios cuantificables escogidos por la toma de decisiones para un par de criterios (C_i, C_j) son entradas de una matriz C de orden n . La matriz debe ser positiva y simétrica con su principal diagonal que contiene 1s. Por lo tanto, solo se necesita la toma de decisiones para proporcionar juicios de valor para completar sobre una matriz triangular. Tal y como la escala de Saaty (**Saaty TL, 1989**) indica los valores asignados para cada entrada C_{ij} normalmente se encuentran entre los intervalos del 1 a 9 o sus recíprocos, como muestra la tabla 3.

Tabla 3. Escala de evaluación en el proceso de comparación entre pares (Saaty TL, 1989).

<i>Niveles</i>	<i>Juicios verbales de referencia entre los criterios i y j</i>	<i>Escala Saaty</i>
(EI)	C_i y C_j tienen la misma importancia	1
(S+I)	C_i es ligeramente más importante que C_j	3-1/3
(St+I)	C_i es fuertemente más importante que C_j	5-1/5
(VSt+I)	C_i es mucho más importante que C_j	7-1/7
(Ex+I)	C_i es extremadamente más importante C_j	9-1/9

El AHP permite ponderar criterios, que no tienen porque tener la misma importancia, a través de un cuestionario realizado a un grupo de expertos (Anexo I). Éste permite llevar a cabo un análisis de consistencia obteniendo *el ratio de consistencia*, que es un término matemático para saber si las opiniones de los expertos son consistentes o si por el contrario habría que descartarlo.

Nuestro cuestionario divide en dos los campos a valorar:

- a) Por un lado se sitúan como criterios las técnicas usadas para obtener la información en cuanto a la composición de los sustratos:
- C_1 – C/N Analysis. Resultados obtenidos de esta técnica.
 - C_2 – TG-MS. Resultados obtenidos con esta técnica.
 - C_3 – WDXFR₁. Resultados obtenidos con esta técnica en un rango de 100 – 10% de peso.
 - C_4 – WDXFR₂. Resultados obtenidos con esta técnica en un rango de 1000 – 1 ppm.

A continuación se pregunta sobre la importancia de dichos criterios/técnicas. Solamente cabe la respuesta de SI o No a la pregunta de si los criterios tienen el mismo valor a la hora de tomar la decisión.

Se continua con un ranking de criterios, debiendo posicionar cada criterio en función de la mayor o menor importancia, pudiéndose repetir el orden en caso de que 2 o más criterios deban poseer el mismo ranking de importancia.

Por último, se les demanda a los expertos que elijan qué criterio debe ser el más importante en comparación con los demás a través de niveles de una escala lingüística que comprende: igual de importante, débilmente más importante, fuertemente más importante, muy fuertemente más importante y absolutamente más importante.

- b) Por otro lado se toman como criterios las técnicas usadas para obtener la información **estructural** de los sustratos:
- S1 – DSC1. Resultados obtenidos con esta técnica bajo atmosfera inerte.
 - S2 – DSC2. Resultados obtenidos con esta técnica bajo atmósfera oxidante.
 - S3 – FTIR. Resultados obtenidos con esta técnica.
 - S4 – XRD. Resultados obtenidos con esta técnica.

Se procede de igual forma que en el campo relativo a la composición.

3.4.2. Método de Referencia Ideal (RIM):

El concepto de alternativa ideal se utiliza en diversos campos de la investigación, pero fue Zeleny (**Zeleny M, 1982**), en los años ochenta, quien lo erige en pieza central de su propuesta de solución de compromiso, en el sentido de la alternativa más próxima al ideal. Para este autor, el concepto de ideal y de solución de compromiso es una hipótesis sobre la racionalidad subyacente en los procesos humanos de decisión.

El método RIM (Cables y cols., 2016) es un algoritmo matemático que permite llevar a cabo un proceso de comparación de alternativas. Las dos principales características del método son:

- **Rango**: es un intervalo, un conjunto de valores que pertenecen a un dominio D.
- **Referencia ideal**: también es un intervalo, un conjunto de valores que representa la máxima importancia o relevancia en un rango dado.

Su proceso se divide en 7 pasos:

- Paso 1 – Definición del contexto del trabajo.
- Paso 2 – Obtención de matriz de valores.
- Paso 3 – Normalizar los valores de la matriz con la referencia ideal.
- Paso 4 – Calcular el peso de la matriz normalizada.
- Paso 5 – Calcular la variación de la referencia ideal normalizada para cada alternativa.
- Paso 6 – Calcular el índice relativo de cada alternativa.
- Paso 7 – Ranking de alternativas en orden descendiente.

No siempre, a la hora de aproximarnos a la alternativa ideal (esmalte y dentina humana), los valores de los criterios que influyen en el proceso de comparación deben alcanzar valores máximos o mínimos, sino que pueden estar localizados dentro de un intervalo donde se encuentra el valor de la alternativa ideal.

En nuestro caso se aplicará la metodología RIM con el objetivo de comparar los esmaltes y dentinas utilizando como alternativa ideal los resultados de las muestras de esmalte y dentina humanos.

4. RESULTADOS

4.1. TÉCNICAS DE ANÁLISIS COMPOSICIONAL

4.1.1. Análisis elemental (C/N)

Los resultados del análisis elemental mostraron (tabla 4) que la concentración de carbono orgánico fue mayor en dentinas que en esmaltes. Las concentraciones más altas las mostraron las dentinas ovina (11.50 g/100g) y porcina (11.10g/100g) y las más bajas los esmaltes humano (1.60g/100g) y bovino (4.40g/100g).

Entre todos los substratos analizados, el esmalte ovino es el que contiene la mayor concentración de carbono inorgánico (3.44g/100g) y el esmalte porcino la menor (0.41g/100g).

Las concentraciones de Nitrógeno fueron mayores en dentinas que en esmaltes. La concentración más baja de nitrógeno se encontró en los esmaltes bovino (1.68g/100g) y humano (0.55g/100g).

Tabla 4. Resultados de la técnica de Análisis elemental (C/N).

MUESTRA	N (g/100g)	Ci (g/100g)	Co (g/100g)	Ct (g/100g)
EB	1.68	1.73	4.40	6.13
DB	2.72	1.85	8.35	10.20
EO	2.54	3.44	6.34	9.78
DO	2.90	1.10	11.50	12.60
EP	2.29	0.41	7.95	8.36
DP	2.93	0.90	11.10	12.00
EH	0.55	0.76	1.60	2.36
DH	2.64	0.93	9.97	10.90
HA	0.07	0.07	0.07	0.14

(N: Nitrógeno, Ci: Carbono inorgánico, Co: Carbono orgánico, Ct: Carbono total, EB: esmalte bovino, DB: dentina bovina, EO: esmalte ovino, DO: dentina ovina, EP: esmalte porcino, DP: dentina porcina, EH: esmalte humano, DH: dentina humana, HAS: hidroxiapatita sintética).

4.1.2. Termogravimetría - Espectrometría de masas (TG-MS)

Las curvas de descomposición termal en atmósfera oxidante muestran tres patrones bien diferenciados (Figura 19). La descomposición termal del esmalte humano muestra gran similitud con la HAS, pero es muy diferente de los esmaltes bovino, ovino y porcino. Las curvas de descomposición termal de la materia orgánica en dentinas se caracterizan por un gran escalón. Las dentinas humana y bovina presentan un comportamiento similar.

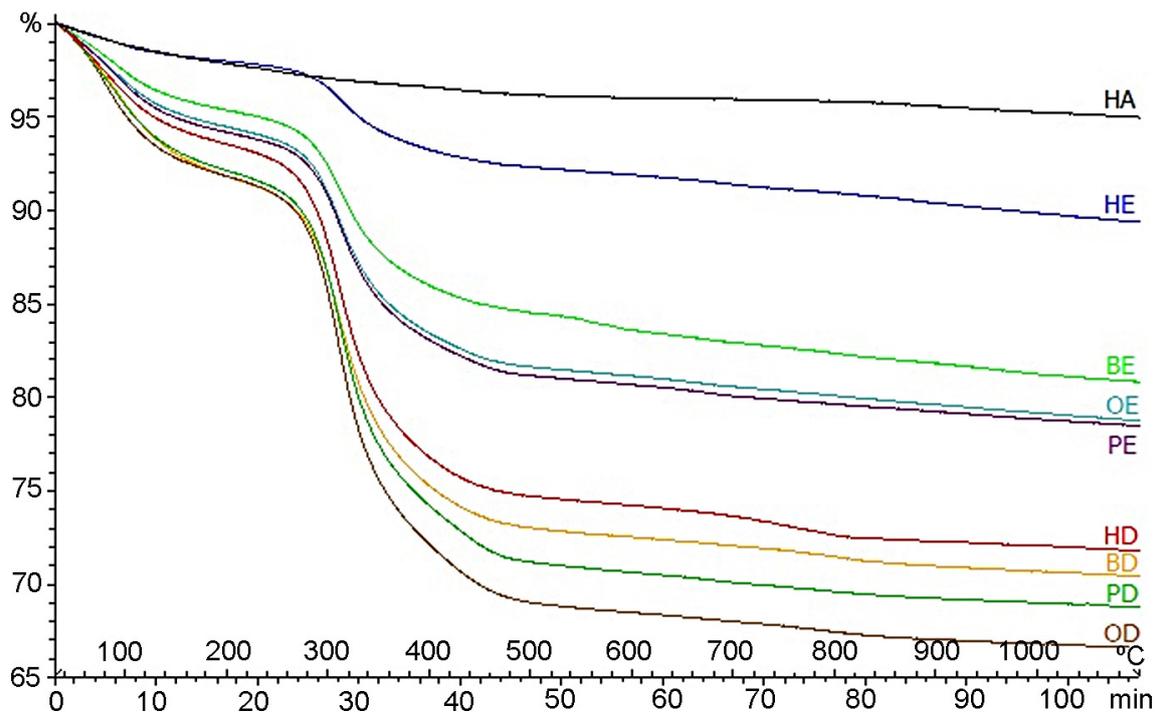


Figura 19. TG-MS. La figura ilustra tres patrones de descomposición termal en atmósfera oxidante bien diferenciados. La HA, que tiene un origen geológico, no muestra apenas pérdidas termogravimétricas. Las muestras de esmalte presentaron un nivel medio de descomposición ($EH < EB < EO < EP$), debido a su alto grado de mineralización. Entre todas ellas, el esmalte humano muestra gran similitud con la HAS. En las dentinas se observaron niveles altos de descomposición ($DH < DB < DO < DP$) debido a la mayor presencia de materia orgánica en su composición. Las dentinas humana y bovina mostraron un comportamiento muy similar (HA: Hidroxiapatita sintética; EH: Esmalte Humano; DH: Dentina Humana; EB: Esmalte Bovino; DB: Dentina Bovina; EO: Esmalte Ovino; DO: Dentina Ovina; EP: Esmalte Porcino; DP: Dentina Porcina).

De las pérdidas de peso termogravimétricas totales (Tabla 5), la HA presentó un 5.04% sobre el total del rango de temperatura. Las dentinas mostraron altos niveles de descomposición térmica (28.24% – 33.45%). Los esmaltes mostraron un nivel medio (10.64% – 21.54%), por encima de la HA pero por debajo de las dentinas.

Los esmaltes presentaron menores porcentajes de agua liberada y de materia orgánica que las dentinas. El agua liberada en el esmalte humano (2.03%) fue similar a la HA (2.16%). La materia orgánica presente en la dentina bovina (19.20%) fue similar a la de la dentina humana (19.19%).

Los esmaltes mostraron mayores concentraciones de carbonatos (CO₂ inorgánico) que las dentinas. La mayor concentración de carbonato fue observada en el esmalte bovino (3.65%) y fue la más parecida a la del esmalte humano (2.91%).

Tabla 5. Muestra los resultados obtenido por la técnica de TG-MS. Indica la pérdida total de agua, materia orgánica, y carbonato (CO₂ inorgánico).

MUESTRA	HUMEDAD (%)	Mo (%)	CARBONATO	PÉRDIDA TOTAL
EB	4.63	10.90	3.65	19.18
DB	8.16	19.20	2.24	29.60
EO	5.54	12.89	2.83	21.26
DO	8.17	23.23	2.05	33.45
EP	5.83	13.07	2.64	21.54
DP	7.87	21.35	2.03	31.25
EH	2.03	5.70	2.91	10.64
DH	6.46	19.19	2.59	28.24
HA	2.16	1.79	1.09	5.04

(HA: Hidroxiapatita sintética; EH: Esmalte Humano; DH: Dentina Humana; EB: Esmalte Bovino; DB: Dentina Bovina; EO: Esmalte Ovino; DO: Dentina Ovina; EP: Esmalte Porcino; DP: Dentina Porcina).

En el Anexo II podemos observar todas las gráficas obtenidas en este experimento: las graficas que contienen la descomposición termogravimétrica de la muestra y la derivada de la curva; y las graficas con las curvas espectrométricas relativas a las masas elegidas para el análisis de los gases desprendidos en la termobalanza.

4.1.3. Espectrometría de Fluorescencia de Rayos X por dispersión de longitud de onda (XRF)

La información detallada de la composición química y las ratios Ca/P de todos los sustratos se recoge en la Tabla 6.

En general, todas las dentinas contienen mayores cantidades de Mg, S, Sr y Zn que sus esmaltes correspondientes, a excepción del esmalte humano que contiene menores cantidades de Zn y Sr que la dentina humana.

Todos los esmaltes contienen mayores cantidades de P, Ca, Cl, Cu y K que las dentinas, así como mayor ratio Ca/P. El esmalte y la dentina humanos contienen mayores cantidades de P y Ca y mayor ratio Ca/P que las otras especies. También mayores cantidades de Cl y Cu, y menores cantidades de Mg, S y Zn.

El EB es el que presentó una composición química más próxima al EH y la DB a la DH.

Tabla 6. Análisis químico (wt %) de los diferentes sustratos obtenido por la técnica de FRX. Los valores de humedad, materia orgánica y CO₂ inorgánico incorporados en esta tabla son los obtenidos por la técnica de TG-MS.

Composición (%)	EB	DB	EO	DO	EP	DP	EH	DH	HA
Humedad	4.63	8.16	5.54	8.17	5.83	7.87	2.03	6.46	2.16
Materia Orgánica	10.90	19.20	12.89	23.23	13.07	21.35	5.70	19.19	1.79
CO₂ inorgánico	3.65	2.24	2.83	2.05	2.64	2.03	2.91	2.59	1.09
O	33.8804	28.9800	32.2504	27.5346	32.1989	28.4269	36.1166	29.3280	38.5695
Na	0.7160	0.5960	0.7380	0.5720	0.7190	0.5870	0.8110	0.9020	0.1140
Mg	0.5360	1.0360	0.6969	1.0680	0.9117	1.0990	0.2910	0.7158	0.2860
Al	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0190
Si	0.0150	-	0.0072	-	-	0.0065	0.0130	0.0180	0.0350
P	15.2900	13.5800	15.1800	13.0300	15.1900	13.4400	16.8000	13.6400	17.8500
S	0.0444	0.0710	0.0524	0.0663	0.0425	0.0629	0.0209	0.0697	0.0181
Cl	0.1550	0.0312	0.1330	0.0250	0.1400	0.0405	0.3170	0.0593	0.0160
K	0.0335	0.0245	0.0336	0.0157	0.0352	0.0244	0.0282	0.0257	0.0150
Ca	31.1100	26.0300	29.6100	24.1800	29.1900	25.0200	34.9100	26.9600	37.9900
Mn	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0084
Fe	0.0138	0.0048	0.0052	0.0049	0.0051	0.0065	0.0061	0.0055	0.0214
Cu	0.0017	0.0013	0.0018	0.0013	0.0016	0.0012	0.0023	0.0013	0.0020
Zn	0.0073	0.0121	0.0097	0.0138	0.0098	0.0161	0.0183	0.0132	-
Sr	0.0169	0.0191	0.0218	0.0264	0.0162	0.0190	0.0256	0.0215	0.0156
Ba	-	0.0140	-	0.0120	-	-	-	-	-
Ca/P (mol/mol)	1.57	1.48	1.51	1.43	1.48	1.44	1.61	1.53	1.64

(HA: Hidroxiapatita sintética; EH: Esmalte Humano; DH: Dentina Humana; EB: Esmalte Bovino; DB: Dentina Bovina; EO: Esmalte Ovino; DO: Dentina Ovina; EP: Esmalte Porcino; DP: Dentina Porcina).

4.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTRUCTURAL

4.2.1. Difracción de rayos X (XRD)

La Tabla 7 muestra los parámetros de celda a y c ajustados, el factor de concordancia convencional, entre los difractogramas experimentales y los calculados, de Rietveld (R_{wp}), los índices de cristalinidad (IC), los coeficientes de March-Dollase para la corrección de la orientación preferente en las direcciones $\langle 010 \rangle$ and $\langle 001 \rangle$. Como ya se indicó anteriormente, los valores de R_{wp} obtenidos por el procedimiento de Rietveld fueron ligeramente peores que los obtenidos por el procedimiento WPPD. El análisis de Rietveld usa una estructura cristalina que limita la intensidad relativa de los picos, decreciendo el grado de libertad del ajuste. Sin embargo, se observó una mejor estimación del IC por medio de este procedimiento.

El tamaño del cristalito fue siempre mayor para los esmaltes que para las dentinas de su misma especie. Los sustratos humanos presentaron siempre el mayor tamaño de cristalitos.

La HAS presentó el mayor $CI_{Rietveld}$ (48.99). Las HAs en los esmaltes obtuvieron mayores $CI_{Rietveld}$ que las dentinas de sus correspondientes especies. De todos los sustratos DH y EH mostraron el mayor CI seguido por EO y DO.

Tabla 7. XRD. Parámetros de celda a y c ajustados, índice de cristalinidad calculado (IC) a partir de las intensidades integradas usando los métodos de Person (WPPD) y Rietveld, tamaños de los cristalitas calculados - $L_{vol}(nm)$ y PO (sin unidades) - en las direcciones $\langle 010 \rangle$ y $\langle 001 \rangle$ (desde las reflexiones 030 y 002, respectivamente), y factor de concordancia convencional (R_{wp}). Los valores en paréntesis son las desviaciones estándar estimadas desde el ajuste y corresponden al último dígito significativo. En negrita aparecen enfatizados los mejores ajustes estimados para cada método.

MUESTRA	a (Å)	c (Å)	IC Person	$L_{vol} \langle 010 \rangle$ (nm)	$L_{vol} \langle 001 \rangle$ (nm)	R_{wp}
EB	9.4462(7)	6.8894(6)	1.81(1)	22.98	23.65	3.40
DB	9.451(5)	6.890(4)	1.46(4)	6.55	12.73	2.84
EO	9.447(1)	6.888(1)	1.64(2)	16.97	20.04	3.48
DO	9.448(3)	6.895(2)	1.53(5)	4.93	15.73	2.80
EP	9.448(1)	6.884(8)	1.65(1)	17.57	22.25	3.22
DP	9.456(5)	6.889(4)	1.56(4)	6.30	13.37	2.79
EH	9.4486(3)	6.8863(2)	1.57(1)	35.65	43.12	3.60
DH	9.439(3)	6.886(2)	1.60(3)	7.97	17.06	3.02
HA	9.4160(6)	6.8866(5)	1.57(1)	12.97	29.33	2.90
MUESTRA	a (Å)	c (Å)	IC Rietveld	PO $\langle 010 \rangle$	PO $\langle 001 \rangle$	R_{wp}
EB	9.4494(5)	6.8924(4)	33.63	1.90(4)	1.18(3)	4.62
DB	9.456(1)	6.892(1)	27.11	1.09(6)	1.8(1)	3.19
EO	9.4490(5)	6.8896(4)	35.41	1.43(5)	1.28(4)	4.00
DO	9.452(1)	6.895(1)	30.87	1.19(4)	1.8(1)	2.92
EP	9.4525(6)	6.8871(4)	31.99	0.63(5)	0.79(1)	3.90
DP	9.459(1)	6.892(1)	27.66	1.13(5)	1.8(1)	3.02
EH	9.4471(3)	6.8854(3)	45.25	1.90(9)	0.94(2)	5.99
DH	9.444(1)	6.890(1)	35.07	1.05(3)	1.8(1)	3.56
HA	9.4154(6)	6.8852(4)	48.99	1.02(8)	1.2(1)	5.41

(a : Longitud del eje a ; c : Longitud del eje- c ; IC Person: Índice de Cristalinidad de Person; IC Rietveld: Índice de cristalinidad de Rietveld; Å: Amstrong HA: Hidroxiapatita sintética; EH: Esmalte Humano; DH: Dentina Humana; EB: Esmalte Bovino; DB: Dentina Bovina; EO: Esmalte Ovino; DO: Dentina Ovina; EP: Esmalte Porcino; DP: Dentina Porcina).

4.2.2. Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La tabla 8 muestra los valores en el intervalo de longitud de onda $1800-700\text{cm}^{-1}$, necesarios para estudiar el contenido orgánico e inorgánico de cada muestra. El cociente entre la Amida I (contenido orgánico $\sim 1635\text{cm}^{-1}$) y $\nu_3\text{PO}_4$ (HA pobremente cristalizada $\sim 1015\text{cm}^{-1}$), fue realizado para obtener el contenido orgánico relativo en cada muestra. Se obtuvieron los siguientes valores: 0.119 en EB, 0.185 en DB, 0.102 en EO, 0.243 en DB, 0.126 en EP, 0.242 en DP, 0.061 en EH, 0.183 en DH, y 0.029 en HA (Figura 20). Tras la HAS los esmaltes presentaron menor contenido proteico que las dentinas. El EH presentó el valor más bajo.

Tabla 8. Análisis FTIR en el rango 1800–700 cm^{-1} para estudiar los contenidos orgánico e inorgánico en los diferentes sustratos. Los valores de absorbancia se normalizaron con el pico $\nu_3\text{PO}_4$ en cada caso.

Longitud de onda (cm^{-1})	Pico asignado	Característica	EB	DB	EO	DO	EP	DP	EH	DH	HA
~ 872	$\nu_2\text{PO}_4$	Carbonato tipo B	0.343	0.332	0.281	0.399	0.312	0.394	0.253	0.332	0.070
~ 878	$\nu_2\text{PO}_4$	Carbonato tipo A	0.329	0.320	0.271	0.385	0.304	0.383	0.246	0.318	0.072
~ 1015	$\nu_3\text{PO}_4$	HA poco cristalizada	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
~ 1635	Amida I	Proteína	0.119	0.185	0.102	0.243	0.126	0.242	0.061	0.183	0.029

(EB: esmalte bovino, DB: dentina bovina, EO: esmalte ovino, DO: dentina ovina, EP: esmalte porcino, DP: dentina porcina, EH: esmalte humano, DH: dentina humana, HAS: hidroxapatita sintética).

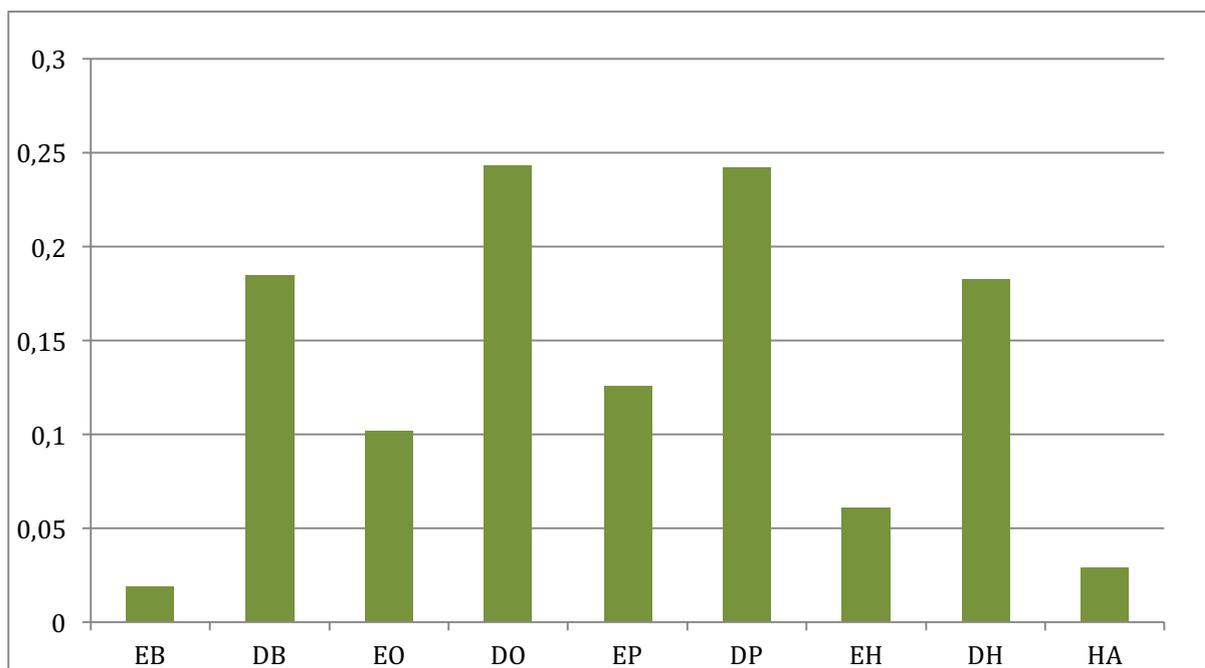


Figura 20. Contenido orgánico relativo de los nueve sustratos estudiados. Cociente entre Amida I ~ 1635 y $\nu_3\text{PO}_4 \sim 1015$.

Tras analizar todos los sustratos en el rango de longitud de onda de 750 – 500 cm^{-1} , se calculó el CI_{FTIR} usando los valores picos de 605 cm^{-1} , 565 cm^{-1} , and 595

cm^{-1} (tabla 9) siguiendo el método descrito por Weiner y Bar-Yosef (Weiner and Bar-Yosef, 1990). Los valores CI_{FTIR} calculados fueron: 3.052 en EB, 2.769 en DB, 3.168 en EO, 2.750 en DO, 3.034 en EP, 2.753 en DP, 3.725 en EH, 2.863 en DH, y 5.139 en HAS (Figura 21). El CI_{FTIR} y el tamaño de los cristales del esmalte fueron siempre mayores que en las dentinas correspondientes para todas las especies. El mayor CI_{FTIR} se encontró en la HAS seguido por el EH y el EO.

Tabla 9. Análisis FTIR en el rango $750\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ para determinar el índice de cristalinidad con el método de Weiner y Bar-Yosef (1990).

Longitud de onda (cm^{-1})	Pico asignado	EB	DB	EO	DO	EP	DP	EH	DH	HA
~ 565	$\nu_4\text{PO}_4$	0.936	0.903	0.878	0.986	0.931	0.970	0.877	0.936	0.617
~ 595	$\nu_4\text{PO}_4$	0.502	0.537	0.447	0.599	0.504	0.584	0.371	0.547	0.180
~ 605	$\nu_4\text{PO}_4$	0.596	0.584	0.538	0.661	0.598	0.638	0.505	0.630	0.038

(EB: esmalte bovino, DB: dentina bovina, EO: esmalte ovino, DO: dentina ovina, EP: esmalte porcino, DP: dentina porcina, EH: esmalte humano, DH: dentina humana, HAS: hidroxiapatita sintética).

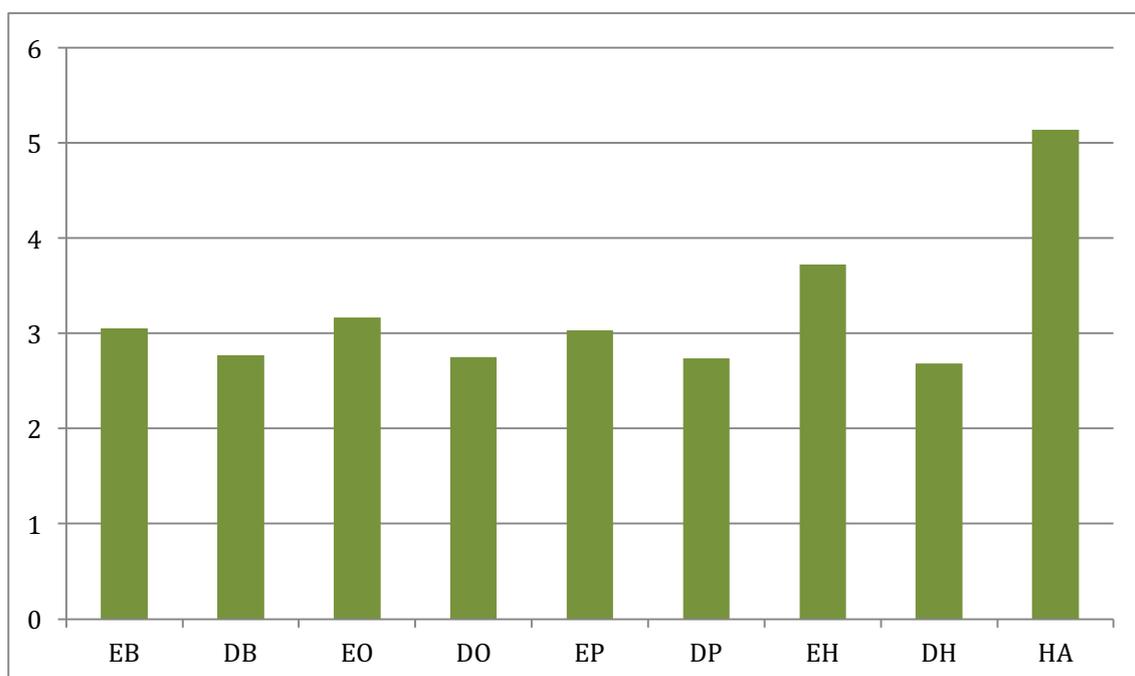


Figura 21. Relación del IC_{EITF} medido con el método de Weiner y Bar-Yosef.

Las gráficas de los espectros de cada sustrato se encuentran en el ANEXO III

4.2.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En atmósfera oxidante (Tabla 10; Figura 22) se observa un proceso endotérmico entre los 25°C y los 230°C y un proceso exotérmico entre los 230 °C and 550 °C. El proceso endotérmico se corresponde con la pérdida de volátiles (principalmente agua) y la desnaturalización de proteínas, de forma que las muestras con más agua y materia orgánica mostró una mayor entalpía. El proceso exotérmico se corresponde con la combustión de la materia orgánica (proteínas), de tal forma que los sustratos con mayor contenido orgánico presentaron una mayor entalpía.

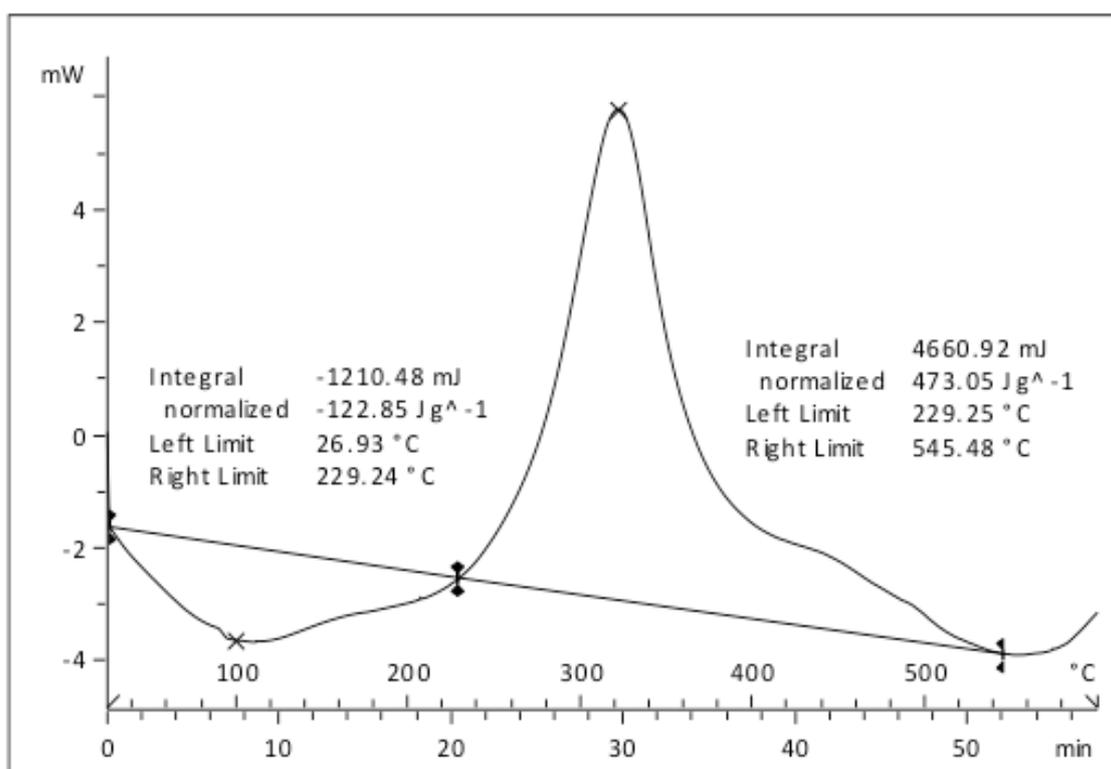


Figura 22. Curva DSC en atmósfera oxidante correspondiente al EH. El proceso endotérmico (27–229 °C) se corresponde con la pérdida de la fracción volátil y la desnaturalización de proteínas. El proceso exotérmico (229–545 °C) se relaciona con la combustión de la materia orgánica.

En atmosfera inerte (Tabla 11; Figura 23), todos los sustratos presentaron una zona de Transición vítrea (T_g) entre los -140°C y los -10°C , y un proceso endotérmico entre los -10°C y los 290°C . Este proceso endotérmico corresponde con la pérdida de agua y la desnaturalización de proteínas. Las temperaturas de la T_g son extremadamente bajas, por lo que nos está indicando que existe una elasticidad en las muestras.

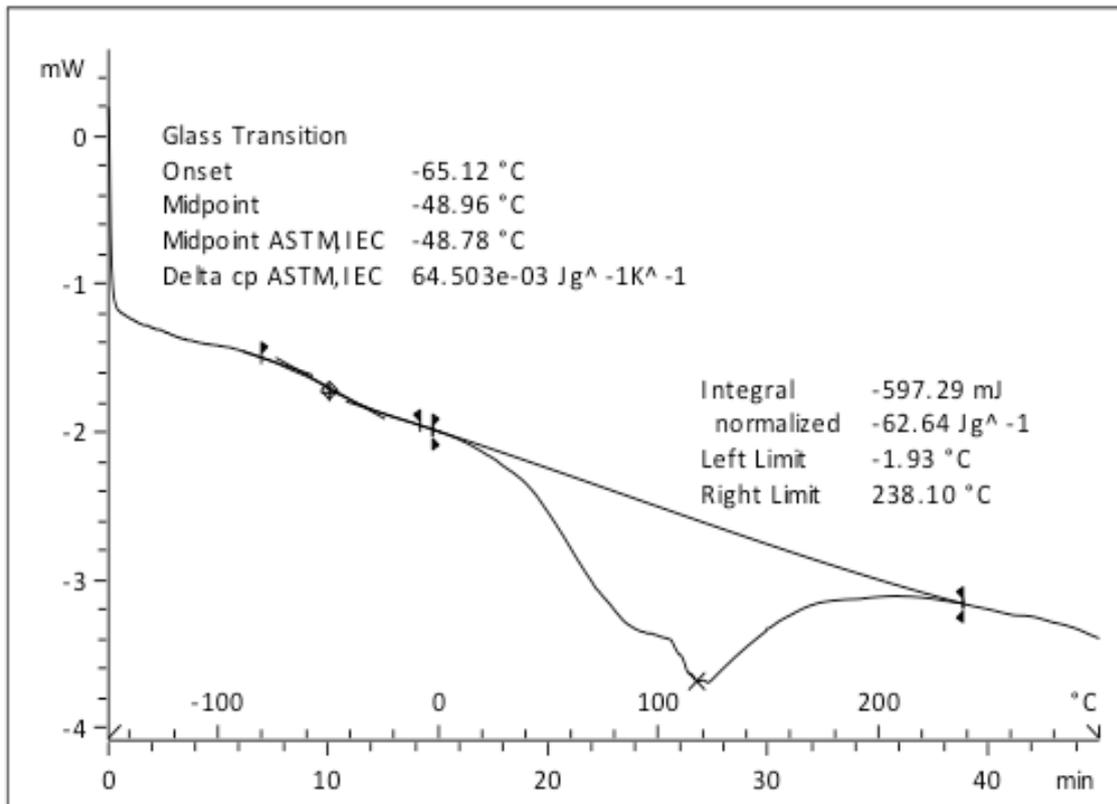


Figura 23. Curva DSC del EH bajo atmósfera inerte. El proceso de transición vítrea se observó entre a bajas temperaturas [-80 –(-8°C)]. El proceso endotérmico (-2 – 238°C) se corresponde con la pérdida de la fracción volátil y la desnaturalización de proteínas.

El cambio de la capacidad calorífica durante la transición vítrea (ΔC_p) (Tabla 11) en dentinas fue mayor que en los esmaltes a excepción de la DB. El valor ΔC_p de los esmaltes y dentinas no mostró homogeneidad entre especies. Los valores más cercanos al diente humano, con un valor en esmalte de $0.065 \text{ J/g}\cdot\text{K}$ y un valor en dentina de $0.162 \text{ J/g}\cdot\text{K}$, fueron obtenidos por la especie porcina, presentando ΔC_p de $0.032 \text{ J/g}\cdot\text{K}$ y $0.109 \text{ J/g}\cdot\text{K}$, respectivamente.

Tabla 10. Estudio DSC en atmósfera oxidante de los sustratos en el rango 25–600 °C. El proceso endotérmico se corresponde a la pérdida de las fracciones volátiles y la desnaturalización de las proteínas. El proceso exotérmico se corresponde con la combustión de la material orgánica.

Especimen	Proceso Endotérmico		Proceso Exotérmico	
	Cambios Entalpia(J/g)	Rango Temperatura °C	Cambios Entalpia (J/g)	Rango Temperatura °C
EB	-211.30	26.63 – 233.29	1126.04	223.29 – 551.33
DB	-412.47	26.95 – 234.85	1953.68	234.85 – 539.71
EO	-250.64	27.05 – 225.83	1332.18	225.83 – 546.06
DO	-326.73	26.73 – 224.76	2580.79	224.76 – 576.62
EP	-215.34	27.53 – 220.79	1439.55	220.79 – 562.50
DP	-330.42	26.95 – 227.28	2283.71	227.28 – 576.62
EH	-122.85	26.98 – 229.24	473.05	229.24 – 545.48
DH	-310.10	26.70 – 224.22	2098.64	224.22 – 547.63
HA	-119.71	27.17 – 230.91	15.48	230.91 – 498.62

(EB: esmalte bovino, DB: dentina bovina, EO: esmalte ovino, DO: dentina ovina, EP: esmalte porcino, DP: dentina porcina, EH: esmalte humano, DH: dentina humana, HAS: hidroxapatita sintética).

Tabla 11. Estudio CDB de los diferentes sustratos en atmosfera inerte en el rango de temperatura de -150 – 300 °C. En la tabla están recogidos los parámetros referentes a la temperatura de transición vítrea (T_g), evaluados según ASTM D-3418 (2003). El proceso endotérmico se corresponde con la pérdida de la fracción volátil y la desnaturalización de proteínas.

Especimen	Temperatura de transición vítrea			Proceso Endotérmico		
	Inicio (°C)	Punto medio (°C)	ΔC_p (J/g•k)	Rango Temperatura °C	Cambios Entalpia (J/g)	Rango Temperatura °C
EB	-106.85	-84,51	0.163	-124.66–(-34.26)	-143.97	-26.11–264.28
DB	-101.85	-73.82	0.001	-136.08–(-18.06)	-261.43	-10.68–284.37
EO	-105.39	-98.20	0.011	-129.95–(-56.78)	-173.64	-25.59–263.77
DO	-115.17	-96.43	0.329	-128.41–(-29.70)	-232.01	-20.45–267.40
EP	-70.91	-56.41	0.032	-114.27–(-30.44)	-180.26	-21.47–264.29
DP	-64.60	-45.34	0.109	-86.97–(-13.33)	-235.36	-6.56–277.81
EH	-65.12	-48.96	0.065	-80.06–(-8.44)	-62.64	-1.93–238.10
DH	-119.11	-99.79	0.162	-129.95–(-48.04)	-207.19	-24.04–274.63
HA	-106.85	-84.51	0.163	-129.04–(-42.43)	-43.40	-20.04–209.30

(EB: esmalte bovino, DB: dentina bovina, EO: esmalte ovino, DO: dentina ovina, EP: esmalte porcino, DP: dentina porcina, EH: esmalte humano, DH: dentina humana, HAS: hidroxiapatita sintética).

El comportamiento térmico de las muestras en atmósfera inerte nos indica una similitud entre la especie humana y la porcina, tanto en esmalte como en dentina. Sin embargo, en atmósfera oxidante no hay un sustrato claramente similar al humano.

En el ANEXO IV se pueden observar las graficas obtenidas por los experimentos de DSC en atmósfera oxidante y atmósfera inerte sobre todas las muestras.

4.3. TOMA DE DECISIONES

Tras la aplicación de la metodología AHP basada en el cuestionario proporcionado a expertos y considerando que todos los expertos tenían igual importancia, se obtuvieron los pesos o coeficientes de importancia de los criterios mediante una media aritmética (Tabla 12)

Tabla12. Pesos de los criterios que influyen en la decisión

	PESOS (M.ARITMÉTICA)	ORDEN DE PRIORIDAD
C1	14.99	3°
C2	9.48	4°
C3	52.20	1°
C4	23.33	2°
S1	10.09	3°
S2	9.39	4°
S3	22.07	2°
S4	58.45	1°

(C1 – C4: Criterios utilizados para el cuestionario en relación a los experimentos composicionales. S1 – S4: Criterios utilizados para el cuestionario en relación a los experimentos estructurales).

Entre las técnicas usadas para los estudios composicionales, la más importante según el cuestionario realizado a los expertos fue la XRF de elementos principales y minoritarios; en segundo lugar la XRF de elementos traza; en tercer lugar el C/N y por último la TG-MS.

En cuanto a las técnicas usadas para el estudio estructural de las muestras, el más importante a la hora de tomar decisiones según los expertos fue el XRD, seguido del FTIR, siendo el DSC bajo atmósfera inerte el tercero y el DSC bajo atmósfera oxidante el último.

Una vez obtenidos los pesos de los criterios, estos fueron introducidos en el algoritmo RIM, con el objetivo de llevar a cabo el proceso de comparación con las alternativas de referencia ideal (EH y DH). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla13. Clasificación de alternativas.

MUESTRA	Ri	ORDEN DE PRIORIDAD
EB	0,3053	1°
EO	0,2514	2°
EP	0,1707	3°
DB	0,4316	1°
DO	0,2820	3°
DP	0,3277	2°

(Ri. Proximidad a la solución ideal, EB: Esmalte Bovino, EO: Esmalte Ovino, EP: Esmalte Porcino, DB: Dentina Bovina, DO: Dentina Ovina, DP: Dentina Porcina)

En cuanto a los esmaltes, según el análisis RIM, el esmalte más próximo al esmalte ideal (EH; $R_i=1$) fue el EB con un valor R_i de 0,3053; el segundo, con un valor R_i de 0,2514, fue el EO; y el más alejado del ideal, con un valor R_i de 0,1707 fue el EP.

Al introducir las dentinas en el algoritmo RIM se obtuvo, que con respecto a la dentina ideal (DH; $R_i=1$), las más próxima, con un valor R_i de 0,4316 fue la DB; seguida de la DP, con un valor R_i de 0,3277; y por último la DO con un valor R_i de 0,2820.

5. DISCUSIÓN

Muchos autores han dado por sentado que el diente bovino era el ideal para sustituir al diente humano en pruebas in vitro sin haberse llevado a cabo un estudio comparativo con otras especies. Ciertamente es que el diente humano es difícil de obtener en suficiente cantidad y calidad como para realizar estudios sobre él y el diente bovino se puede adquirir en cualquier matadero con mínimos requerimientos legales y éticos. Pero sin embargo, los dientes de otros mamíferos, como pueden ser los porcinos u ovinos también encontramos que son de muy fácil obtención. En la revisión de la literatura de **Ghaeth y cols., 2011**, encontramos estudios que comparan el diente humano y bovino, para todo tipo de estudios.

5.1. TÉCNICAS DE ANÁLISIS COMPOSICIONAL

En esta parte del estudio se emplearon tres técnicas analíticas que fueron: análisis elemental (C/N), termogravimetría y espectrometría de masas (TG-MS) y espectrometría de fluorescencia de rayos X de dispersión de longitud de onda (XRF).

XRF evalúa cada elemento en base a óxidos, lo cual es un método muy útil para la evaluación de muestras mineralógicas, así como de la matriz de HA. Esta técnica espectrométrica mide con precisión elementos pesados pero no elementos ligeros como son el C, H, O o N, ya que estos elementos no emiten suficiente radiación para permitir una captación efectiva por este método. Por esta razón, se hace necesario el uso de otras técnicas, como el C/N y TG-MS, para evaluar estos elementos ligeros. Ambas técnicas adicionales están basadas en reacciones de combustión, la diferencia entre las dos la encontramos en que el C/N obtiene resultados cuantitativos a partir de un calibrado estándar para cada elemento, mientras que TG-SM se puede considerar como una técnica semicuantitativa al no contar con patrones de referencia (**Paztor, 1997**).

Los resultados obtenidos por estas tres técnicas ofrecen información detallada sobre la composición química de estos tejidos calcificados (Tabla 4 - 6). Los rangos de

fracción inorgánica en esmaltes van del 81 al 92%, en dentinas ocupan del 69 al 74%, y para la HA estándar es del 96%. Los dientes humanos son los más mineralizados y muy cerca de ellos se sitúan los bovinos, tanto en los valores del esmalte como en los de la dentina. A pesar de que los datos obtenidos por XRF se evalúan en base a óxidos, lo cual es común para el estudio de muestras minerales, los datos obtenidos fueron listados como elementos, agrupando el oxígeno estequiométrico de cada óxido en una cantidad total. El CO₂ inorgánico es hallado por la descomposición parcial de la fracción inorgánica, principalmente apatita carbonatada (**Devièse y cols, 2010**). La presencia de carbonatos distorsiona la red cristalina original, provocando una apatita carbonatada más débil que la HA. Todas las muestras de esmalte están más carbonatadas que las correspondientes dentinas; los valores de las muestras humanas se caracterizan por un alto contenido de carbonato, y se hallaron similitudes entre las muestras de esmalte humano y esmalte ovino, y también entre las muestras de dentina humana y dentina bovina.

Para todas las especies estudiadas, el porcentaje de carbono orgánico y nitrógeno, evaluados por el C/N, mostró ser más alto en dentina que en esmalte (Tabla 4). Esto es una confirmación de que existe mayor porcentaje, en peso, de material orgánico en dentina que en esmalte, como ya se ha demostrado (**Gomes de Ferraris y cols., 2009**). El esmalte humano fue el más mineralizado de todos, con valores de C y N cercanos a la HA pura. El esmalte y la dentina bovina presentaron los valores de C y N más parecidos a los del esmalte y dentina humana.

Los elementos químicos más abundantes en esmalte y dentina de las cuatro especies fueron el calcio y el fósforo. La relación molar Ca/P fue aproximadamente de 1.67 para la HA pura (**Taube y cols., 2010**). El resto de apatitas biológicas parecen tener deficiencia de calcio. La relación molar Ca/P fue mayor en esmalte que en dentina, como se esperaba. En esmalte humano esta fue de 1.61, el más cercano a la HA pura. El esmalte bovino se situó cerca del humano con 1.57, seguido del ovino con 1.51 y por último el porcino con 1.48. En dentina, la relación Ca/P fue mayor, también, en humanos con 1.53, seguida otra vez de la dentina bovina con 1.48, y esta vez la siguiente fue la dentina porcina con 1.44 y posteriormente la ovina con 1.43. De esta forma, el esmalte y la dentina humana mostraron los grados más elevados de

mineralización, y de nuevo, la especie bovina obtuvo los ratios más cercanos al diente humano.

La HA puede presentar numerosas sustituciones; cationes metálicos como K^+ , Na^+ , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} o Zn^{2+} pueden ocupar la posición del Ca^{2+} , complejos aniónicos como AsO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} o SiO_4^{4-} pueden reemplazar al PO_4^{3-} , y aniones como el Cl^- o F^- pueden reemplazar al grupo OH^- en la estructura cristalina. Estos iones, encontrados como elementos traza, proceden de los capilares de la pulpa dental y, durante el proceso pre-eruptivo, se van incorporando a la dentina o a las capas de esmalte próximas a la unión amelodentinaria (**Curzon y Featherstone, 1983**). Estos pueden proceder, también, del medioambiente que rodea al diente, principalmente de la saliva, y han sido incorporados después de la erupción a una profundidad de 150 μm desde la superficie del esmalte (**Lane y cols., 1997; Reitznerová y cols., 2000**). La incorporación de estos elementos traza a la estructura cristalina modifica la fisico-química, las propiedades mecánicas y la solubilidad de los cristales de HA (**Schofield y cols., 2002**).

Con el uso de XRF en el presente estudio, se detectaron los elementos químicos como se detalla en la Tabla 6. El Cl, el cual indica la cantidad de sal y agua en cada muestra, presenta mayores concentraciones en esmaltes que en dentinas para las cuatro especies; el diente humano muestra las concentraciones más altas. **Gutiérrez-Salazar y Reyes-Gasga, 2003**; observaron mayores concentraciones en las capas superficiales usando espectroscopia de rayos X de energía dispersa, pero no encontraron nada de Cl en dentina humana.

Con respecto al zinc, en los dientes no humanos se encontraron mayores concentraciones de este en dentina que en esmalte, al contrario de lo que ocurrió en el diente humano. El estroncio (Sr) mostró el mismo comportamiento que el Zn. Esto puede provocar sustituciones dentro de la red cristalina de la apatita, ya que un ion de Sr puede reemplazar a 10 iones de Ca (**Oliveira y cols., 1998**).

El azufre (S), no fue relevante para el esmalte humano, pero si se encontró en las otras especies animales, mostrando mayores concentraciones en dentina que en esmalte, lo que se relaciona con el contenido proteico. El cobre (Cu) mostró el comportamiento

opuesto, con mayores concentraciones en esmalte que en dentina, y mayores concentraciones en las muestras humanas que en las animales.

El magnesio (Mg) mostró un comportamiento similar al Zn y al Sr, con mayores concentraciones en dentina que en esmalte para todas las especies estudiadas, como podemos observar en otros estudios (**Gutiérrez-Salazar y Reyes-Gasga, 2003**). La gran presencia de estos tres elementos en dentina explica porqué el ratio Ca/P es menor en esta, y con concentraciones mayores en humanos que en animales.

Aunque algunos autores han descrito concentraciones fijas y ordenadas de elementos traza como una característica habitual en las estructuras dentales ($Sr > Mg > Zn > Pb > Fe > Cu$) (**Curzon y Featherstone, 1983; Kang y cols., 2004**), estos elementos y su ordenación por concentraciones han sido calculadas teniendo en cuenta los dientes completos, incluyendo esmalte, dentina y pulpa. En el estudio de **Ghadimi y cols., 2013**; se lleva a cabo la diferenciación de los elementos traza del esmalte, en donde el Na, al igual que en este estudio era el más abundante, y el Mg se encuentra como uno de los principales elementos de la composición del diente; pero a diferencia de este, **Ghadimi** encontró mayores cantidades de S que el presente trabajo, donde se encontró mayores concentraciones de Cl.

Según **Reitznerová y cols., 2000**; Ca, P, Mg y Na son los iones metálicos básicos y más abundantes dentro de la estructura de los tejidos dentales mineralizados. Además, estos cuatro elementos fueron encontrados en el presente estudio como los más abundantes para los esmaltes y dentinas de las cuatro especies analizadas. Sin embargo, el orden de las concentraciones de los otros elementos no coincidió con lo descrito por **Curzon y Featherstone., 1983**; además, las concentraciones fueron diferentes entre esmalte y dentina para las cuatro especies analizadas. De hecho, las concentraciones de elementos traza varían entre estudios (**Lane y cols., 1997; Reitznerová y cols., 2000; Gutiérrez-Salazar y Reyes-Gasga, 2003; Baranowska y cols., 2004**) y también se ha observado que varían con la edad, el género, el tipo de diente (incisivo, premolar o molar), la nutrición, la contaminación del medioambiente e incluso entre dientes deciduos y permanentes (**Baranowska y cols., 2004; Fischer y cols., 2009**). Además, en un diente en particular, la concentración varía en relación a la profundidad de sus capas. **Reitznerová y cols., 2000**; usando FAAS, ETA AAS, ICP-AES y ICP-MS,

determinó la presencia de siete elementos (Cu, Fe, Mg, Mn, Pb, Sr y Zn) en todas las capas y cerca de la superficie del esmalte en dientes extraídos sin caries. A excepción del Sr y el Mg, todos los elementos mostraron altas concentraciones en las capas superficiales. Ocurre un efecto marea, por el cual los cristalitas del esmalte se disuelven y después se recristalizan, y la composición de los elementos traza de las capas del esmalte se pueden ver afectados por la saliva en el proceso de de- y re- mineralización, hasta 100-150 μ m de la superficie.

La presencia de flúor (F) no ha sido nombrada en este estudio debido a la falta de sensibilidad de las técnicas instrumentales escogidas para detectar la composición del diente (XRF). La cromatografía iónica podría ser usada para determinar el F total por medio de la descomposición por microondas de los especímenes en ácido nítrico. En este caso, descomposición y después dilución 1:100, no debería excluir la buena detección de este ion, debido al bajo límite de detección de esta técnica para los análisis, cerca de 1 ppm. Además, se podría encontrar algún extracto de F en lixiviación a 1:10 (peso/volumen) de muestras sólidas en agua durante 24h, de acuerdo al test de lixiviación 38414-S4.

Si nos fijamos en el estudios de **Soares y cols., 2012**, sobre la composición de la dentina humana, podemos observar que por medio de XFR y aunque realizan el experimento con saliva artificial y diferentes componentes mezclados con la muestra de dentina, los valores obtenidos no difieren mucho de los relatados en este estudio: Para el Ca entre 25,6 y 25,9 % en relación con el 26,9 % que se obtuvo en este estudio. Con respecto al P, entre 14,2 y 14,3 %, en comparación con el 13,6 % que se observo en este estudios.

Aunque el objetivo de este estudio fue determinar la composición elemental del esmalte y la dentina de las cuatro especies, el conocimiento de estas macroestructuras y microestructuras es esencial para entender las excelentes propiedades fisicoquímicas y el comportamiento mecánica del diente (**He y cols., 2008**). A pesar de esto, aunque el alto contenido mineral proporciona al diente dureza mecánica y alta resistencia al desgaste (**Low y cols., 2008**), **Kinney y cols., 2003**; dicen que el módulo de Young, la tensión y las fuerzas compresivas, y la resistencia a la fractura son propiedades que dependen tanto de la composición como de la microestructura.

5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTRUCTURAL

Para esta parte del estudio se emplearon 3 técnicas de análisis estructural que fueron: la difracción de rayos X (XRD), la espectrometría de infrarrojos por transformadas de Fourier (FTIR) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los resultados hallados por estas técnicas nos ofrecen información acerca de la estructura cristalina de las muestras, del tamaño y orientación de sus cristalitas, y también se puede corroborar los resultados acerca de las matrices físico-químicas que poseen.

Se ha comprobado que por medio de la técnica de XRD, se obtuvieron los tamaños de los cristalitas del ACE, y se observó que eran de mayor tamaño lo de los esmaltes que los de las dentinas para todas las especies, al realizar el ajuste por el método WPPD. Hecho que se confirma con los resultados de la técnica de FTIR cuando se lleva a cabo en el rango de longitud de onda de $750 - 500 \text{ cm}^{-1}$.

Al realizar el ajuste de Rietveld dentro del estudio de XRD, se obtiene el IC Rietveld, donde resalta sobre todo, la similitud entre los patrones cristalinos (tamaño del cristallito) del esmalte humano y la HA, diferenciándose del resto de muestras, afirmación realizada ya anteriormente por **Eimar y cols., 2012**; en el cual también se comenta el hallazgo de que la dureza del esmalte se encuentra relacionada con el tamaño del cristallito del ACE en el eje-c. Por lo cual, haciendo caso a este hallazgo, podríamos afirmar según la tabla 7 de XRD y fijándonos en la columna de $L_{\text{vol}} \langle 001 \rangle$ (nm) que el más duro sería el esmalte humano, y con valores muy lejanos a este el resto de esmaltes de las otras especies.

Los parámetros más pequeños fueron encontrados en la muestra de HA, debido a su bajo contenido en carbonato (1.1%) en comparación con los demás sustratos, los cuales se encontraban en el rango de 2.0 – 3.7% de carbonato (**Teruel y cols., 2015**). Estos resultados coinciden con los parámetros encontrados en la literatura para la HA (ICDD PDF 04-014-8416, $a = 9.412 \text{ \AA}$, $c = 6.853 \text{ \AA}$) y carbonato apatita (ICDD PDF 01-072-9863, $a = 9.472 \text{ \AA}$, $c = 6.897 \text{ \AA}$). También fue notable el alto IC de la HA, lo cual era de esperar debido a que era una muestra sintética.

A través de la técnica FTIR se han obtenido, por un lado la relación de contenido orgánico de cada muestra, cuando esta técnica se ha realizado en el rango de longitud de onda de $1500 - 700 \text{ cm}^{-1}$. Con estos resultados se certifican los obtenidos por el estudio de TG-MS, el cual afirmaba que el contenido orgánico es mayor en las muestras de dentina de todas las especies que en sus respectivos esmaltes (**Teruel y cols., 2015**). Este hecho también es contrastable con la técnica de DSC, en la que los resultados obtenidos en su experimento sobre atmósfera oxidante nos indican la mayor cantidad de componentes orgánicos en dentinas que en esmaltes para todas las especies.

Tanto en el estudio de **Eimar y cols., 2012**; como en de **Reyes-Gasga y cols., 2013**; se utilizan tanto la técnica de XRD como FTIR, para hallar las dimensiones cristalográficas del esmalte humano, pero no las comparan con los esmaltes de otras especies, Los picos de referencia para el estudio del FTIR, fueron tomados de estos autores.

Un dato que llama la atención con respecto a los datos obtenidos por el estudio de FTIR es la cercanía entre los valores de contenido orgánico relativo de la dentina bovina (0.185) y la dentina humana (0.183). Lo que lleva a poder afirmar que en aquellos estudios sobre dientes in vitro en los que intervenga la fracción orgánica, el mejor sustituto de la dentina humana sería la dentina bovina.

Por otro lado, se puede obtener el IC_{EITF} relativo al grado de deformación geométrica de las bandas moleculares de la estructura de apatita, este IC variará de acuerdo a la composición del cristal y a la temperatura a la que se expone. Se lleva a cabo en el rango de $750 - 500 \text{ cm}^{-1}$. A tenor de los resultados obtenidos, se observa que estructuralmente ninguna especie es similar a su esmalte al esmalte humano, aunque al observar las dentinas todos los valores son muy similares entre especies.

Con la técnica DSC se puede valorar la cantidad de componentes orgánicos y el H_2O presentes en las muestras, si se realiza el experimento en atmósfera oxidante, y también, datos referentes a la estructura cristalina de la muestra, si se realiza el experimento en atmósfera inerte, en este caso se ha tenido en cuenta el periodo de Transición vítrea ($T_g \Delta C_p$).

En lo referente al experimento en atmósfera oxidante de DSC, además de ser coherentes los resultados obtenidos con los hallados en TG-MS (Teruel y cols., 2015) y FTIR, también ofrece comparaciones entre las cantidades de componentes orgánicos y agua de las muestras de esmalte y dentina de la especie humana con la bovina. Lo que viene a certificar lo antes mencionado acerca de que el mejor sustituto para estudios *in vitro*, ya no solo sobre dentina sino también sobre esmalte, en los que intervenga la fase orgánica y el agua, como pueden ser los estudios de adhesión, el mejor sustituto del diente humano es el diente bovino, el cual está siendo utilizado en la mayoría de estudios realizados (Soares y cols., 2016). Aunque no parece ser una técnica muy concluyente para establecer una especie en particular como sustituta de la humana.

Sin embargo, en el experimento en atmósfera inerte de DSC, la muestra de esmalte y dentina con valores más parecidos a la especie humana, con respecto a T_g ΔC_p , son los de la especie porcina. Esto viene a indicar que en el ordenamiento de los cristalitas de ACE que forman estas estructuras son similares. Luego, para aquellos estudios en los cuales nuestro criterio de elección sea la ordenación del ACE, como pueden ser los de translucidez o dureza, se recomienda usar el esmalte y la dentina porcina como sustitutos de los humanos.

5.3. TOMA DE DECISIONES

Con el propósito de conocer el sustrato ideal para sustituir el esmalte y la dentina humanos en estudios experimentales *in vitro*, hemos recurrido a MCDM, concretamente los procesos AHP y RIM (Cables y cols., 2016). Tras realizar una búsqueda bibliografía sobre este método, no se encontró ningún trabajo en el que se usara este método en el campo de la odontología. Los sustratos bovinos, esmalte y dentina, son los que presentaron los valores RIM más cercanos al 1, valor dado arbitrariamente a los sustratos ideales, el esmalte y dentina humanos.

Nuestros resultados, basados en 6 técnicas experimentales y en la valoración de expertos en esas técnicas, vienen a confirmar que el diente bovino es el más parecido al

humano en composición y nanoestructura y es el que debe usarse para estudios experimentales in vitro.

Soares y cols., (2016) revisando los resultados obtenidos en estudios de adhesión a esmalte y dentina llegan a la misma conclusión: el diente bovino (esmalte y dentina) puede ser un sustituto válido del diente humano.

6. CONCLUSIONES

Conclusión 1. El esmalte mostró, en la descomposición térmica, un comportamiento similar a la hidroxiapatita sintética, pero la dentina, que posee un alto contenido orgánico (carbonato orgánico y nitrógeno), mostró un comportamiento térmico significativamente diferente. Todos los sustratos estudiados mostraron bajos niveles de calcio y una relación Ca/P menor que la HA. El esmalte y la dentina humana fueron las muestras más mineralizadas. El C/N, la TG-MS y la XRF mostraron que el esmalte y la dentina humana presentaban grandes similitudes con el esmalte y la dentina bovina. Por todo ello, en base a su composición química, los dientes bovinos deberían ser la primera elección para sustituir a los dientes humanos en estudios de investigación.

Conclusión 2. El tamaño del cristalito fue siempre mayor para los esmaltes que para las dentinas de su misma especie. Los sustratos humanos presentaron siempre el mayor tamaño de cristalitos. La HAS presentó los mayores IC (CI_{Rietveld} y CI_{FTIR}). Las HAS en los esmaltes obtuvieron mayores CI que las dentinas de sus correspondientes especies. De todos los sustratos el EH mostró el mayor CI seguido por EO. Tras la HAS los esmaltes presentaron menor contenido proteico que las dentinas y de ellos el EH presentó el valor más bajo. El comportamiento térmico de las muestras en atmósfera inerte nos indica una similitud entre la especie humana y la porcina, tanto en esmalte como en dentina. Sin embargo, en atmósfera oxidante no hay un sustrato claramente similar al humano.

Conclusión 3. El método MCMD nos indica que la primera alternativa al diente humano es el diente bovino. El orden de similitud respecto del esmalte humano fue el bovino, el ovino y el porcino. El orden de similitud respecto de la dentina humana fue la bovina, la porcina y la ovina.

Aceptamos la hipótesis de nuestro trabajo. En base a nuestros resultados podemos asegurar que el diente bovino es el más adecuado para sustituir al diente humano en estudios experimentales in vitro, aunque no llega a ser el ideal.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Alonso JA, Lamata MT. Consistency in the analytic hierarchy process: a new approach. *International Journal of Uncertainty, Fuzziness and Knowledge-Based Systems*. 2006;14(4):445–59.
2. Abuabara A, Santos AJ, Aguiar FH, Lovadino JR. Evaluation of microleakage in human, bovine and swine enamels. *Braz Oral Res*. 2004;18(4):312–6.
3. Almeida KG, Scheibe KG, Oliveira AE, Alves CM, Costa JF. Influence of human and bovine substrate on the microleakage of two adhesive systems. *J Appl Oral Sci*. 2009;17(2):92–6.
4. Andreasen JO, Munksgaard EC, Bakland LK. Comparison of fracture resistance in root canals of immature sheep teeth after filling with calcium hydroxide or MTA. *Dent Traumatol*. 2006;22(3):154–6.
5. Ariyatnam MT, Wilson MA, Mackie IC, Blinkhorn AS. A comparison of surface roughness and composite/enamel bond strength of human enamel following the application of the Nd:YAG laser and etching with phosphoric acid. *Dent Mater*. 1997;13(1):51–5.
6. Arora M, Hare D, Austin Ch. Smith DR, Doble P. Spatial distribution of manganese in enamel and coronal dentine of human primary teeth. *Sci Total Environ*. 2011;409(7):1315–9.
7. Arnold W.H, Gaengler P. Quantitative analysis of the calcium and phosphorus content of developing and permanent human teeth. *Ann Anat*. 2007;189:183-90.
8. Atash R, Van Den Abbeele A. Bond strengths of eight contemporary adhesives to enamel and to dentine: an in vitro study on bovine primary teeth. *Int J Paediatr Dent*. 2005;15(4):264–73.
9. Ballal N.V, Khandewal D, Karthikeyan S, Somayaji K, Foschi F. Evaluation of chlorine dioxide irrigation solution on the microhardness and surface roughness of root canal dentin. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2015;23(4):173-8.
10. Balzar D. Voigt-function model in diffraction line-broadening analysis. *International Union of Crystallography. Monographs on Crystallography*. 1999;10:94–126.
11. Baranowska I, Barchański L, Bak M, Smolec B, Mzyk Z. X-ray fluorescence spectrometry in multielemental analysis of hair and teeth. *Pol J Environ Stud*. 2004;13(6):639–46.
12. Barrancos MJ, Barrancos P. *Operatoria Dental. Integración clínica*. 4ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006:262–267.

13. Bunge HJ. *Texture analysis in materials science: mathematical methods*. Elsevier 2013.
14. Cables E, Lamata M.T, Verdegay J.L. RIM-reference ideal method in multicriteria decision making. *Inform Sciences*. 2016;337-338:1-10.
15. Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, de Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod*. 2007;33(4):422–6.
16. Camargo MA, Marques MM, de Cara AA. Morphological analysis of human and bovine dentine by scanning electron microscope investigation. *Arch Oral Biol*. 2008;53(2):105–8.
17. Christensen A.M, Smith M.A, Thomas R.M. Validation of x-ray fluorescence spectrometry for determining osseous or dental origin of unknown material. *J Forensic Sci*. 2012;57(1):47-51.
18. Clemente-Presas A, Garcia-Molina J.A, Carvahlho-Lobato P, Belmonte-Calderón A, Serra-Renom I, Manzanares-Céspedes M.C. Análisis semicuantitativo del calcio y fósforo en el esmalte y la dentina. *Biomec*. 2002;10(2):14-9.
19. Combes C, Cazalbou S, Rey C. Apatite Biominerals. *Minerals*. 2016;6,34.
20. Curzon MEJ, Featherstone JDB. Chemical composition of enamel. In: Lazari EP, Levy BM, editors. *CRC handbook of experimental aspects of oral biochemistry*. CRC Press; 1983. p. 123–35.
21. De Haro F, González S, Navajas J.M. (1998). Protocolo experimental para el estudio de la adhesión a dentina. *RCOE*. 1998;3(5):447–58.
22. De Munck J, Vargas M, Iracki J, Van Landuyt K, Poitevin A, Lambrechts P et al. One-day bonding effectiveness of new self-etch adhesives to bur-cut enamel and dentin. *Oper Dent*. 2005;30(1):39–49.
23. Devièse T, Colombini MP, Regert M, Stuart BH, Guerbois JP. TGMS analysis of archaeological bone from burials of the late Roman period. *J Therm Anal Calorim*. 2010;99(3):811–3.
24. Deymier-Black A.C, Almer J.D, Stock S.R, Dunand D.C. Variability in the elastic properties of bovine dentin at multiple length scales. *J Mech Behav Biomed*. 2012;5:71-81.
25. Dollase WA. Correction of intensities for preferred orientation in powder diffractometry: application of the March model. *J Appl Crystallog*. 1986;19(4):267–72.

26. Dutra-Correa M, Anauate-Netto C, Arana-Chavez VE. Density and diameter of dentinal tubules in etched and non-etched bovine dentine examined by scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol.* 2007;52(9):850–5.
27. Eimar H, Marelli B, Nazhat S.N, Nader S.A, Amin W.M, Torres J, de Albuquerque Jr. R.F, Tamimi F. The role of enamel crystallography on tooth shade. *J Dent.* 2011;39S:e3-e10.
28. Eimar H, Ghadimi E, Marelli B, Vali H, Nazhat S.N, Amin W.M, Torres J, Ciobanu O, Albuquerque Junior R.F, Tamimi F. Regulation of enamel hardness by its crystallographic dimensions. *Acta Biomater.* 2012 Sep;8(9):3400–10.
29. Enax J, Prymak O, Raabe D, Epple M. Structure, composition, and mechanical properties of shark teeth. *J Struct Biol.* 2012;178:290–9.
30. Erickson RL, Glasspoole EA. Adhesión a la estructura dentaria: Comparación de los ionómeros de vidrio y los composites. *J Esthet Dent.* 1998;5(2):1–26.
31. Falla-Sotelo FO, Rizzutto MA, Tabacniks MH, Added N, Barbosa MDL. Analysis and discussion of trace elements in teeth of different animal species. *Brazilian Journal of Physics.* 2005;35(3B):761–2.
32. Featherstone J.D.B, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:66-76.
33. Fischer A, Wiechuła D, Postek-Stefańska L, Kwapuliński J. Concentrations of metals in maxilla and mandible deciduous and permanent human teeth. *Biol Trace Elem Res.* 2009;132:19–26.
34. Fleet ME, Liu X, Liu X. Orientation of channel carbonate ions in apatite: Effect of pressure and composition. *Am Mineral.* 2011;96(7):1148–57.
35. Fonseca RB, Haiter-Neto F, Carlos HL, Soares CJ, Sinhoreti MA, Puppini-Rontani RM et al. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. *Arch Oral Biol.* 2008;53(11):1023–9.
36. Fuentes Fuentes M.V. Propiedades mecánicas de la dentina humana. *Av. Odontoestomatol.* 2004;20-2:79-83.
37. García Barbero J. Patología y terapéutica dental. Madrid: editorial Síntesis; 1997:42-8.
38. Garcia Cascales M, S. Métodos para la comparación del alternativas mediante un Sistema de Ayuda a la Decisión (S.A.D.) y “Soft Computing”. Tesis Doctoral 2009.
39. Ghadimi E, Eimar H, Marelli B, Nazhat S.N, Asgharian M, Vali H, Tamimi F. Trace element can influence the physical properties of tooth enamel. *SpringerPlus.* 2013;2:499.

40. Giachetti L, Scaminaci Russo D, Bertini F, Pierleoni F, Nieri M. Effect of operator skill in relation to microleakage of total-etch and self-etch bonding systems. *J Dent.* 2007;35(4):289–93.
41. Goldbert M, Kulkarni A.B, Young M, Boskey A. Dentin: Estructure, composition and mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012;3:711-35.
42. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental.* 3ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2009:256–331.
43. Gotliv BA, Veis A. The composition of bovine peritubular dentin: matching TOF-SIMS, scanning electron microscopy and biochemical component distributions. *New light on peritubular dentin function.* *Cells Tissues Organs.* 2009;189(1-4):12–9.
44. Grünke K, Stärk HJ, Wennrich R, Franck U. Determination of traces of heavy metals (Mn, Cu, Zn, Cd and Pb) in microsamples of teeth material by ETV–ICP–MS. *Fresen J Anal Chem.* 1996;354:633–5.
45. Gutiérrez-Salazar MP, Reyes-Gasga J. Microhardness and chemical composition of human tooth. *Mater Res.* 2003;6(3):367–73.
46. Gruner J.W, Mc Connell D, Armstrong W.D. The relationship between crystal structure and chemical composition of enamel and dentine. *J Biol Chem.* 1937;121:771-81.
47. Hart P.S, Hart T.C. Disorders of human dentin. *Cells Tissues Organs.* 2007;186:70-7.
48. Hanlie H, Liyun T, Tao J. The crystal characteristics of enamel and dentin by XRD method. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater Sci.* 2006;21(1)9–12.
49. He LH, Swain MV. Understanding the mechanical behavior of human enamel from its structural and compositional characteristics. *J Mech Behav Biomed.* 2008;1:18–29.
50. Hueb DeMenezes Oliveira MA, Paes Torres C, Miranda Gomes-Silva J, Chinelatti MA, Hueb De Menezes FC, Guenka Palma-Dibb R, et al. Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. *Microsc Res Tech.* 2010;73:572–7. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.20796>.
51. Järvinen M. Application of symmetrized harmonics expansion to correction of the preferred orientation effect. *J Appl Crystallog.* 1993;26(4)525–31.
52. Jiménez A, Llamas R. Sistemas adhesivos. En *Tratado de Odontología.* Tomo II. Bascones A. Smithkline Beecham. Madrid 1998;1749–65.

53. Jung M, Wehlen LO, Klimek J. Surface roughness and bond strength of enamel to composite. *Dent Mater.* 1999;15(4):250–6.
54. Kang D, Amarasiriwardena D, Goodman AH. Application of laser ablation–inductively coupled plasma–mass spectrometry (LA–ICP–MS) to investigate trace metal spatial distributions in human tooth enamel and dentine growth layers and pulp. *Anal Bioanal Chem.* 2004;378:1608–15.
55. Kemp-Scholte CM, Davidson CL. Marginal integrity related to bond strength and strain capacity of composite resin restorative systems. *J Prosthet Dent.* 1990;64:658–64.
56. Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(1):13–29.
57. König E, Liebech HG. Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas en color. Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso (Tomo II). 2ª Edición. Madrid: Médica Panamericana; 2008:33–35.
58. Lane DW, Peach DF. Some observations on the trace element concentrations in human dental enamel. *Biol Trace Elem Res.* 1997;60:1–11.
59. Laurance-Young P, Bozec L, Gracia L, Rees G, Lippert F, Lynch RJ. A review of the structure of human and bovine dental hard tissues and their physicochemical behaviour in relation to erosive challenge and remineralisation. *J Dent.* 2011;39(4):266–72.
60. Legeros RZ, Legeros JP. Phosphate minerals in human tissues. In: Nriagu JO, Moore PB, editors. *Phosphate minerals.* Berlin, Heidelberg: Springer; 1984. p. 351–85.
61. Leventouri T, Antonakos A, Kyriacou A, Venturelli R, Liarokapis E, Perdikatsis V. Crystal structure studies of human dental apatite as a function of age. *Int J Biomat.* 2009;ID 698547.
62. Li X, Wang J, Joiner A, Chang J. The remineralisation of enamel: a review of the literature. *J Dent.* 2014;42S1:S12–S20.
63. Lopes FM, Markarian RA, Sendyk CL, Duarte CP, Arana-Chavez VE. Swine teeth as potential substitutes for in vitro studies in tooth adhesion: a SEM observation. *Arch Oral Biol.* 2006;51(7):548–51.
64. Lopes MB, Sinhoreti MA, Gonini Júnior A, Consani S, McCabe JF. Comparative study of tubular diameter and quantity for human and bovine dentin at different depths. *Braz Dent J.* 2009;20(4):279–83.

65. Low IM, Duraman N, Mahmood U. Mapping the structure, composition and mechanical properties of human teeth. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2008;28:243–7.
66. Low M, Ritter C, White T. Crystal structure refinements of the 2H and 2M pseudomorphs of ferric carbonate-hydroxyapatite. *Dalton Trans*. 2010;39:6488-95.
67. Lussi A, Ganss C. Erosive tooth wear. *Monogr Oral Sci*. 2014;25:163-79.
68. Magne D, Guicheux J, Weiss P, Pilet P, Daculsi G. Fourier Transform Infrared Microspectroscopic Investigation of the Organic and Mineral Constituents of Peritubular Dentin: A Horse Study. *Calcif Tissue Int*. 2002;71:179–85.
69. Mahoney E.K, Rohanizadeh R, Ismail F.S.M, Kilpatrick N.M, Swain M.V. Mechanical properties and microstructure of hypomineralised enamel of permanent teeth. *Biomaterials*. 2004;25:5091-100.
70. Mahoney P. Human deciduous mandibular molar incremental enamel development. *Am J Phys Anthropol*. 2011;144:201-14.
71. March A, Krist Z. Mathematische Theorie der Regelung nach der Korngestalt Bei affiner Deformation 1932;81:285–97.
72. Mota CS, Demarco FF, Camacho GB, Powers JM. Tensile bond strength for four resin luting agents bonded to bovine enamel and dentin. *J Prosthet Dent*. 2003;89(6):558–64.
73. Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama T. Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. *J Dent Res*. 1983;62:1076–81.
74. O'Brian S, Keown A.J, Constantino P, Xie Z, Bush M.B. Revealing the structural and mechanical characteristics of ovine teeth. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 2014;30:176–85.
75. Oesterle LJ, Shellhart WC, Belanger GK. The use of bovine enamel in bonding studies. *Am J OrthodDentofacialOrthop*. 1998;114(5):514–9.
76. Okazaki M, Takakashi J, Kimura H. Unstable Behavior of Magnesium-Containing Hydroxyapatites. *Caries Research* 1986;20(4)324-31.
77. Oliveira JP, Querido W, Caldas RJ, Campos APC, Abracadado LG, Farina M. Strontium is incorporated in different levels into bones and teeth of rats treated with strontium ranelate. *Calcif Tissue Int*. 2012;91(3):186–95.
78. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO). Vacas, ovejas, cabras y búfalos. En: FAO. ed. Manual para el personal auxiliar de sanidad animal primaria. Roma: editorial; 1995:32–3.

79. Pasteris J.D, Wopenka B, Freeman J.J, Rogers K, Valsami-Jones E, van der Houwen J, Silva M.J. Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: Implications for bone and biomaterials. *Biomaterials* 2004; 25: 229-38.
80. Pawley G. Unit-cell refinement from powder diffraction scans. *J Appl Cryst.* 1981;14:357–61.
81. Pasztor AJ. Thermal analysis techniques. In: Settle FA, editor. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*. Prentice Hall PTR; 1997. p. 909–31.
82. Person A, Bocherens H, Saliege JF, Paris F, Zeitoun V, Gerard M. Early diagenetic evolution of bone phosphate: an X-ray diffractometry analysis. *J Archaeol Sci.* 1995;22:211–21.
83. Polo-Silca C.J, Galván-Magaña F, Delgado-Huertas A. Tropic inferences of blue shark in the Mexican Pacific from stable isotope analysis in teeth. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2012;26:1631-8.
84. Pongprueksa P, Kuphasuk W, Senawongse P. Effect of elastic cavity wall and occlusal loading on microleakage and dentin bond strength. *Oper Dent.* 2007;32:466–75.
85. Popowics TE, Rensberger JM, Herring SW. Enamel microstructure and microstrain in the fracture of human and pig molar cusps. *Arch Oral Biol.* 2004;49(8):595–605.
86. Posada MC, Sánchez CF, Gallego GJ, Vargas AP, Restrepo LF, López JD. Dientes de bovino como sustituto de dientes humanos para su uso en la odontología. Revisión de la literatura. *Revista CES Odontología* 2006;19(1).
87. Reitznerová E, Amarasiriwardena D, Kopčáková M, Barnes RM. Determination of some trace elements in human tooth enamel. *Fresen J Anal Chem.* 2000;367(8):748–54.
88. Reyes-Gasga J, Garcia-Garcia R, Arellano-Jimenez M.J, Sanchez-Pastor E, Tiznado-Orozco G.E, Gila-Chavarria I.M, Gómez-Gasga G. Structural and thermal behavior of human tooth and three synthetic hydroxyapatites from 20 to 600 °C. *J Phys D Appl Phys.* 2008;41:225407(11pp).
89. Reyes-Gasga J, Martinez-Piñeiro E.L, Rodriguez-Álvarez G, Tiznado-Orozco G.E, Garcia-Garcia R, Brès E.F. XRD and FTIR crystallinity indices sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. *Mat Sci Eng.* 2013;33:4568–74.
90. Rietveld H. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. *J Appl Crystallog.* 1969;2(2):65–71.

91. Rousseau RM. Detection limit and estimate of uncertainty of analytical XRF results. *Rigaku J.* 2001;18(2):33–47.
92. Roux D, Doméjean-Orliaquet S, Saade M. Leakage associated with intermediate restorative material and glass-ionomer cement retrograde fillings: a human and sheep teeth comparison with 2 different aging procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93(1):81–7.
93. Rüttermann S, Braun A, Janda R. Shear bond strength and fracture analysis of human vs. bovine teeth. *Plos One.* 2013;8(3):1–6.
94. Saaty, T.L. *The Analytic Hierarchy Process* (McGraw-Hill, New York, 1980).
95. Saaty, T.L. *Group decision making and the AHP* (Springer, New York, 1989).
96. Sabatoski MA, Maruo IT, Camargo ES, Filho OG, Tanaka OM, Maruo H. Influence of natural bovine enamel roughness on bond strength after etching. *Angle Orthod.* 2010;80(3):562–9.
97. Scherrer P. Bestimmung der grösse und der inneren struktur von kolloidteilchen mittels röntgenstrahlen. *Nach. Akad. Wiss Göttingen II Math Phys Klasse* 1918;2-98.
98. Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol.* 2000;45(5):355–61.
99. Schofield RMS, Nesson MH, Richardson KA. Tooth hardness increases with zinc-content in mandibles of young adult leaf-cutter ants. *Naturwissenschaften* 2002;89:57983.
100. Sen Tunc E, Bayrak S, Tuloglu N, Ertas E. Evaluation of microtensile bond strength of different fissure sealants to bovine enamel. *Aust Dent J.* 2012;57(1):79–84.
101. Simmons LM, Al-Jawad M, Kilcoyne SH, Wood DJ. Distribution of enamel crystallite orientation through an entire tooth crown studied using synchrotron X-ray diffraction. *Eur J oral Sci.* 2011;119(s1)19–24.
102. Slósarczyk A, Paszkiewicz Z, Paluszkiewicz C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *J Mol Struct.* 2005;744–747:657–61.
103. Smith T.M, Olejniczak A.J, Reid D.J, Ferrell R.J, Hublin J.J. Modern human enamel thickness and enamel-dentine junction shape. *Ach Oral Biol.* 2006;51:974-95.
104. Soares F.Z.M, Follak A, Da Rosa L.S, Montagner A.F, Lenzi T.L, Rocha R.O. Bovine tooth is a substitute for human tooth on bond strenght studies: A

- systematic review and meta-analysis of in vitro studies. *Dent Mater.* 2016; 32: 1385-93.
105. Stokes AR, Wilson AJC. 1942. A method of calculating the integral breadths of Debye-Scherrer lines. In *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* 1942;38(03):313–22.
 106. Suriñach S, Baro MD, Bordas S, Clavaguera N, Clavaguera-Mora MT. La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. *Bol Soc Esp Ceram Vidr.* 1992;31:11–7.
 107. Tanumiharja M, Burrow MF, Tyas MJ. Microtensile bond strengths of seven dentin adhesive systems. *Dent Mater.* 2000;16(3):180–7.
 108. Taube F, Ylmén R, Shchukarev A, Nietzsche S, Norén JG. Morphological and chemical characterization of tooth enamel exposed to alkaline agents. *J Dent.* 2010;38(1):72–81.
 109. Teruel JD, Alcolea A, Hernández A, Ortiz AJ. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol.* 2015;60(5):768–75.
 110. Tiznado-Orozco GE, García-García R, Reyes-Gasga J. Structural and thermal behaviour of carious and sound powders of human tooth enamel and dentine. *J Phys D Appl Phys.* 2009;42:235408.
 111. TOPAS 4.2, 2009. TOPAS, General profile and structure analysis software for powder diffraction data. Karlsruhe, Germany: Bruker AXS GmbH.
 112. Valencia R, Espinosa R, Ceja I, Marín A. Características estructurales de los cristales del esmalte humano: Mecanismos de remineralización. *Rodyb volumen II NUMERO 3 SEPTIEMBRE – DICIEMBRE 2013.*
 113. Wang S, Liu Y, Fang D, Shi S. The miniature pig: a useful large animal model for dental and orofacial research. *Oral Dis.* 2007;13(6):530–7.
 114. West X.N, Joiner A. Enamel mineral loss. *J Dent.* 2014;42S1:S2-S11.
 115. Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci.* 2011;53(3):273–82.
 116. Zeleny M. Multiple criteria decision making. McGrawHill 1982. New-York.

ANEXO I

SURVEY FOR THE SUITABILITY EVALUATION OF INSTRUMENTAL TECHNIQUES

Introduction

The intention of this study is to assess the suitability of several instrumental tools to explain separately compositional/structural parameters in tooth tissues—enamel and dentin—of different species, namely: human, bovine, porcine, and ovine. Both categories of parameters will help us to establish the most appropriate substrate for substituting human dentin and enamel for the purposes of *in vitro* experimental studies.

Each group of analytical tests is a decision criterion to be weighed for ranking purposes, according to the Multi-Criteria Decision-Making (MCDM) approach.

Decision criteria (C_i) to be assessed. Suitability of the instrumental technique/procedure to get compositional information from the specimens.

- **(C_1) CN analyzer:** Carbon and nitrogen analyzer which quantitatively measures these elements by combustion of the specimens and later determination of the evolving gases by infrared spectroscopy (carbon is measured as CO_2) or thermal conductivity (nitrogen is measured as N_2 after a reduction step).
- **(C_2) TG-MS:** Thermogravimetric analyzer (TG) combined with a mass spectrometer (MS). Thermogravimetric analysis is a quantitative technique used to measure the change in weight of a sample as a function of temperature under a controlled atmosphere. The combination with a mass spectrometer provides an identification of the gases evolved during the thermogravimetric decomposition. In this way, moisture, organic matter, and carbonate contents can be determined.
- **(C_3) WDXRF₁:** Wavelength-dispersive X-ray fluorescence spectrometry for the standardless measurement of the main elements of $Z > 10$ (ranging 100–10 wt.%, such as Ca and P) and the minor elements (ranging 10–0.1 wt.%, such as Mg, Na, and Cl).
- **(C_4) WDXRF₂:** Wavelength-dispersive X-ray fluorescence spectrometry for the standardless measurement of the trace elements of $Z > 10$ (in particular the micro-fraction range, 1000–1 ppm, such as S, K, Sr, Al, Si, Ba, Zn, Mn, Fe, Ag, and Cu).

Survey 1. Suitability to get compositional information.

CRITERIA ASSESSMENT FOR EACH ALTERNATIVE

1.1. Do you think that all the decision criteria as described above are equally important when assessing and determining which tooth substrate has similar composition to human teeth?

Yes No

1.2. Please mark in the squares below to determine the relevance order that you consider appropriate for each decision criteria (C_i) when assessing and determining which tooth substrate has similar composition to human teeth. Note that several criteria may be chosen to be equally important.

C_1	<input type="checkbox"/>	1st	<input type="checkbox"/>	2nd	<input type="checkbox"/>	3rd	<input type="checkbox"/>	4th
C_2	<input type="checkbox"/>	1st	<input type="checkbox"/>	2nd	<input type="checkbox"/>	3rd	<input type="checkbox"/>	4th
C_3	<input type="checkbox"/>	1st	<input type="checkbox"/>	2nd	<input type="checkbox"/>	3rd	<input type="checkbox"/>	4th
C_4	<input type="checkbox"/>	1st	<input type="checkbox"/>	2nd	<input type="checkbox"/>	3rd	<input type="checkbox"/>	4th

1.3. Please compare the decision criterion chosen to be in the first place with the rest, using the following labels as a linguistic scale for importance:

EI: Equally important.
 WMI: Weakly more important.
 SMI: Strongly more important.
 VSMI: Very strongly more important.
 AMI: Absolutely more important.

1st → 2nd:	<input type="checkbox"/>	EI	<input type="checkbox"/>	WMI	<input type="checkbox"/>	SMI	<input type="checkbox"/>	VSMI	<input type="checkbox"/>	AMI
1st → 3rd:	<input type="checkbox"/>	EI	<input type="checkbox"/>	WMI	<input type="checkbox"/>	SMI	<input type="checkbox"/>	VSMI	<input type="checkbox"/>	AMI
1st → 4th:	<input type="checkbox"/>	EI	<input type="checkbox"/>	WMI	<input type="checkbox"/>	SMI	<input type="checkbox"/>	VSMI	<input type="checkbox"/>	AMI

Decision criteria (S_i) to be assessed. Suitability of the instrumental technique/procedure to get structural information from the specimens.

- (S_1) **DSC₁**: Differential scanning calorimetry under inert atmosphere (N_2). This thermoanalytical technique allows us to study possible glass transition temperatures, while heating the samples from -150 to 300 °C.
- (S_2) **DSC₂**: Differential scanning calorimetry under oxidizing atmosphere (O_2). This thermoanalytical technique lets us to study the combustion profiles of the specimens, while heating them from 25 to 600 °C.
- (S_3) **FTIR**: Fourier-transform infrared spectroscopy, which enables us to get the vibrational spectra of the specimens. This information is used to obtain a crystallinity index of the material, as well as to distinguish between carbonate-apatite types A and B.
- (S_4) **XRD**: X-ray diffraction of crystalline powder. Fitting of the diffractograms with several mathematical procedures helps us to estimate crystallite sizes and crystallinity indices.

Survey 2. Suitability to get structural information.

CRITERIA ASSESSMENT FOR EACH ALTERNATIVE

1.4. Do you think that all the decision criteria as described above are equally important when assessing and determining which tooth substrate has similar structure to human teeth?

Yes No

1.5. Please mark in the squares below to determine the relevance order that you consider appropriate for each decision criteria (S_i) when assessing and determining which tooth substrate has similar structure to human teeth. Note that several criteria may be chosen to be equally important.

S_1	<input type="checkbox"/> 1st	<input type="checkbox"/> 2nd	<input type="checkbox"/> 3rd	<input type="checkbox"/> 4th
S_2	<input type="checkbox"/> 1st	<input type="checkbox"/> 2nd	<input type="checkbox"/> 3rd	<input type="checkbox"/> 4th
S_3	<input type="checkbox"/> 1st	<input type="checkbox"/> 2nd	<input type="checkbox"/> 3rd	<input type="checkbox"/> 4th
S_4	<input type="checkbox"/> 1st	<input type="checkbox"/> 2nd	<input type="checkbox"/> 3rd	<input type="checkbox"/> 4th

1.6. Please compare the decision criterion chosen to be in the first place with the rest, using the following labels as a linguistic scale for importance:

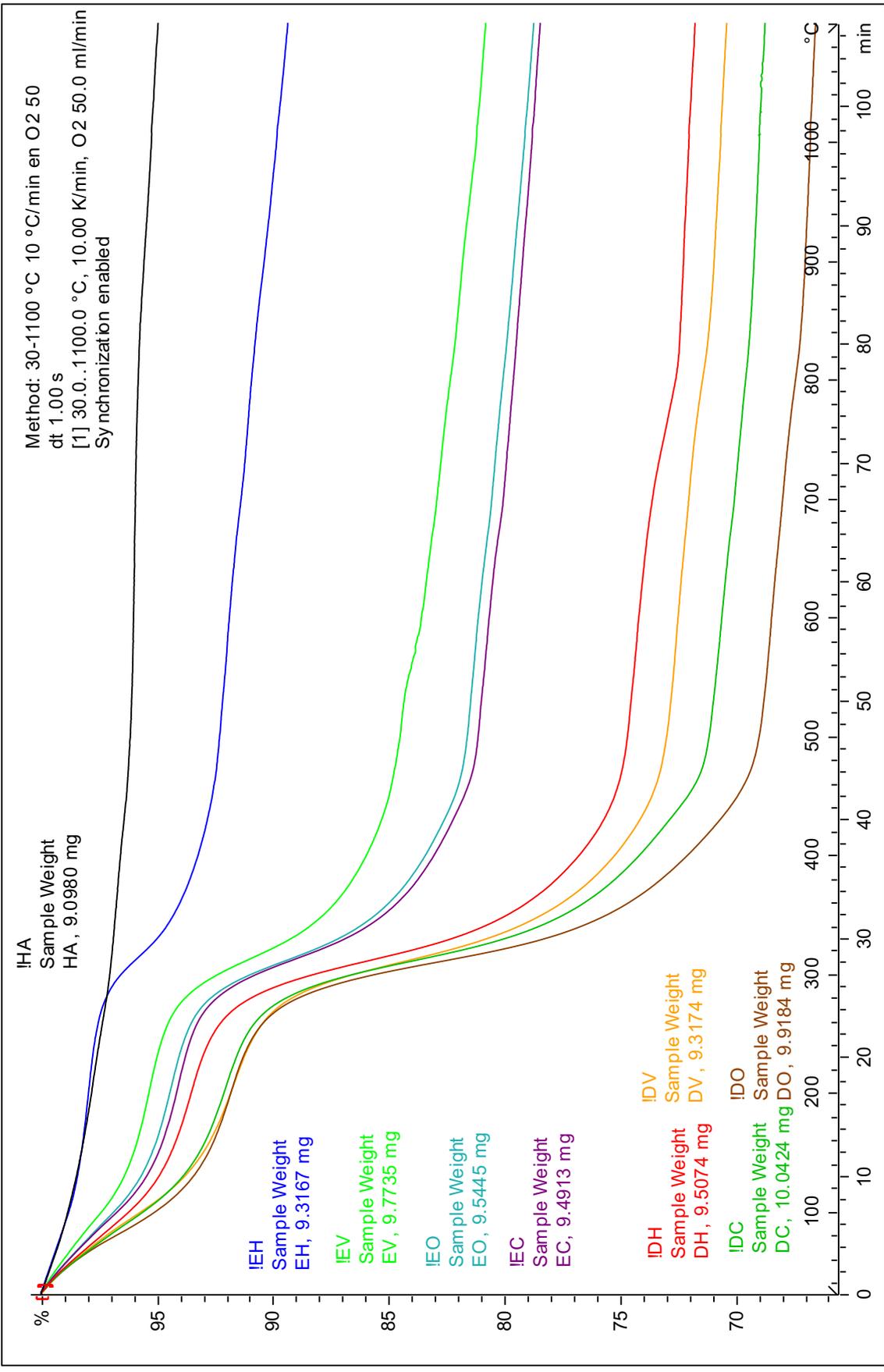
EI: Equally important.
 WMI: Weakly more important.
 SMI: Strongly more important.
 VSMI: Very strongly more important.
 AMI: Absolutely more important.

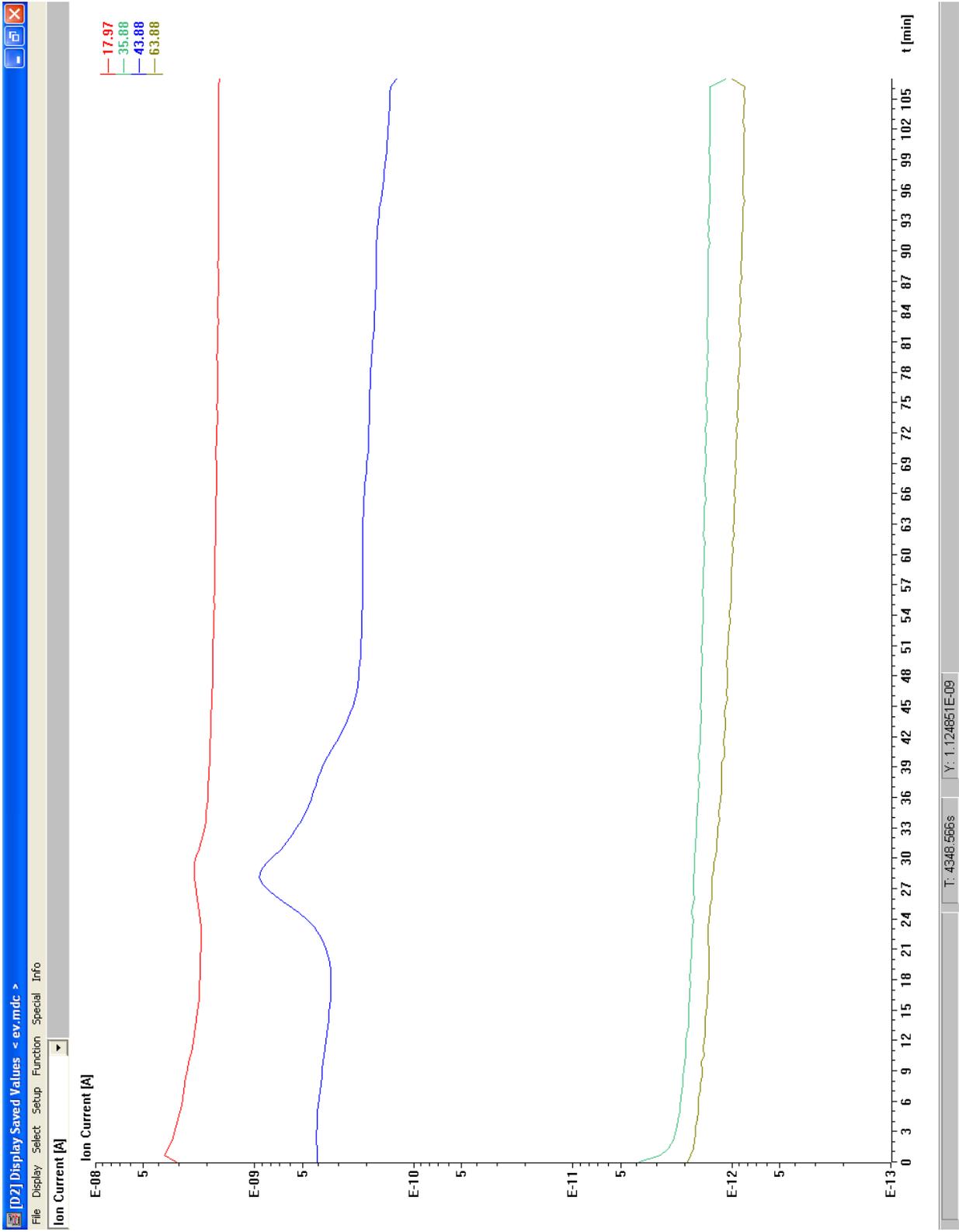
1st → 2nd:	<input type="checkbox"/> EI	<input type="checkbox"/> WMI	<input type="checkbox"/> SMI	<input type="checkbox"/> VSMI	<input type="checkbox"/> AMI
1st → 3rd:	<input type="checkbox"/> EI	<input type="checkbox"/> WMI	<input type="checkbox"/> SMI	<input type="checkbox"/> VSMI	<input type="checkbox"/> AMI
1st → 4th:	<input type="checkbox"/> EI	<input type="checkbox"/> WMI	<input type="checkbox"/> SMI	<input type="checkbox"/> VSMI	<input type="checkbox"/> AMI

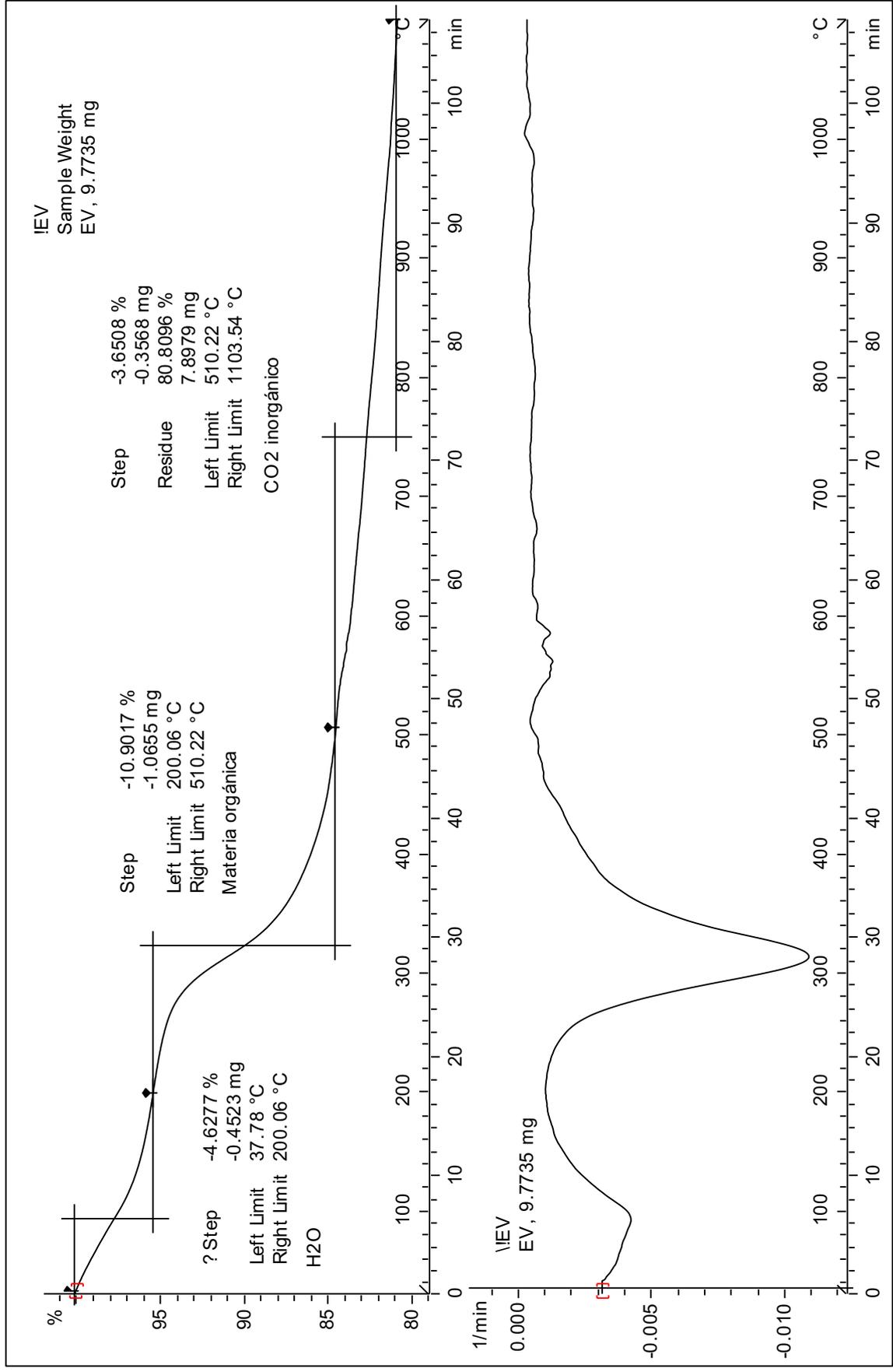
ANEXO II

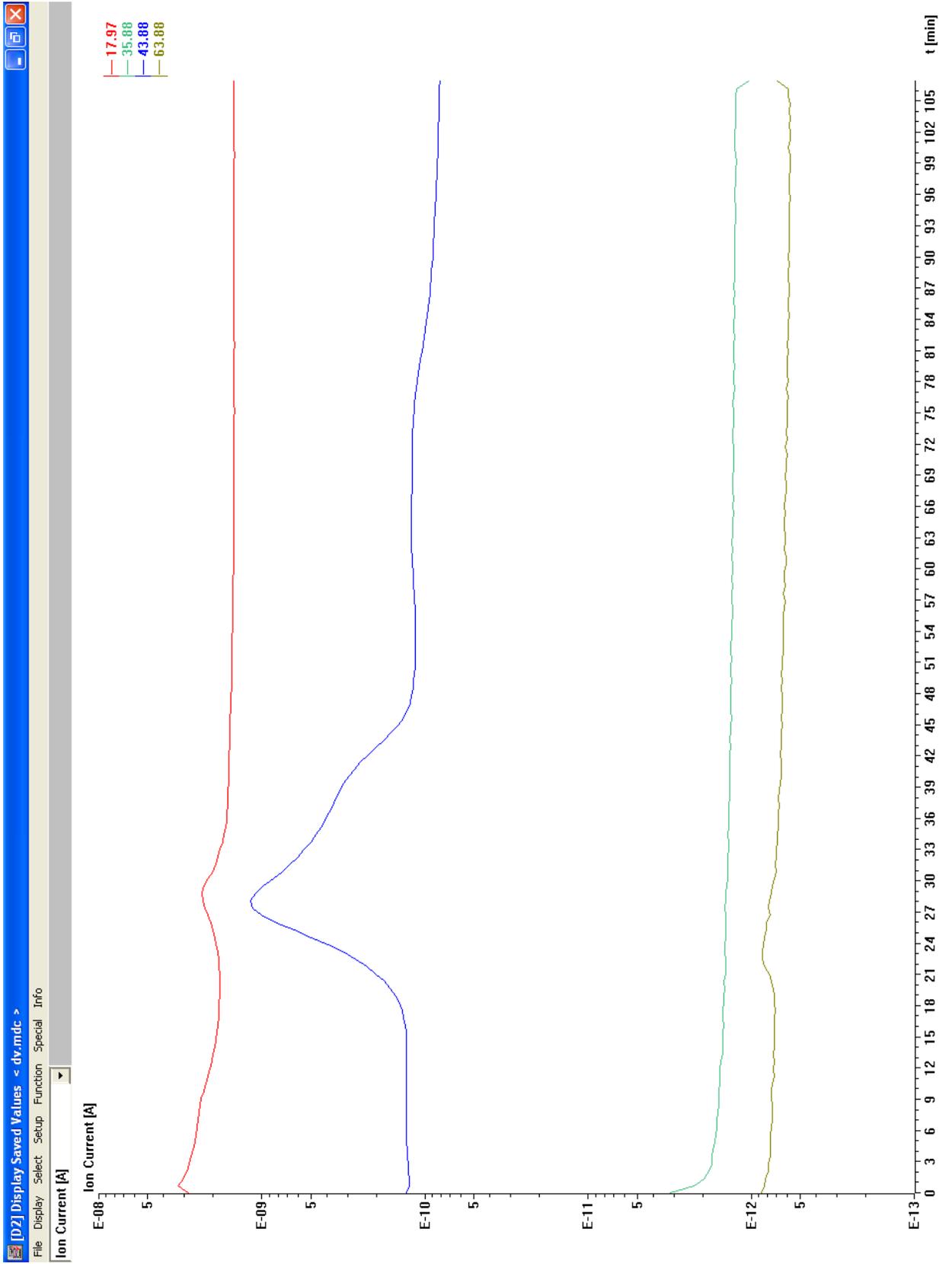
Dientes e hidroxiapatito patrón

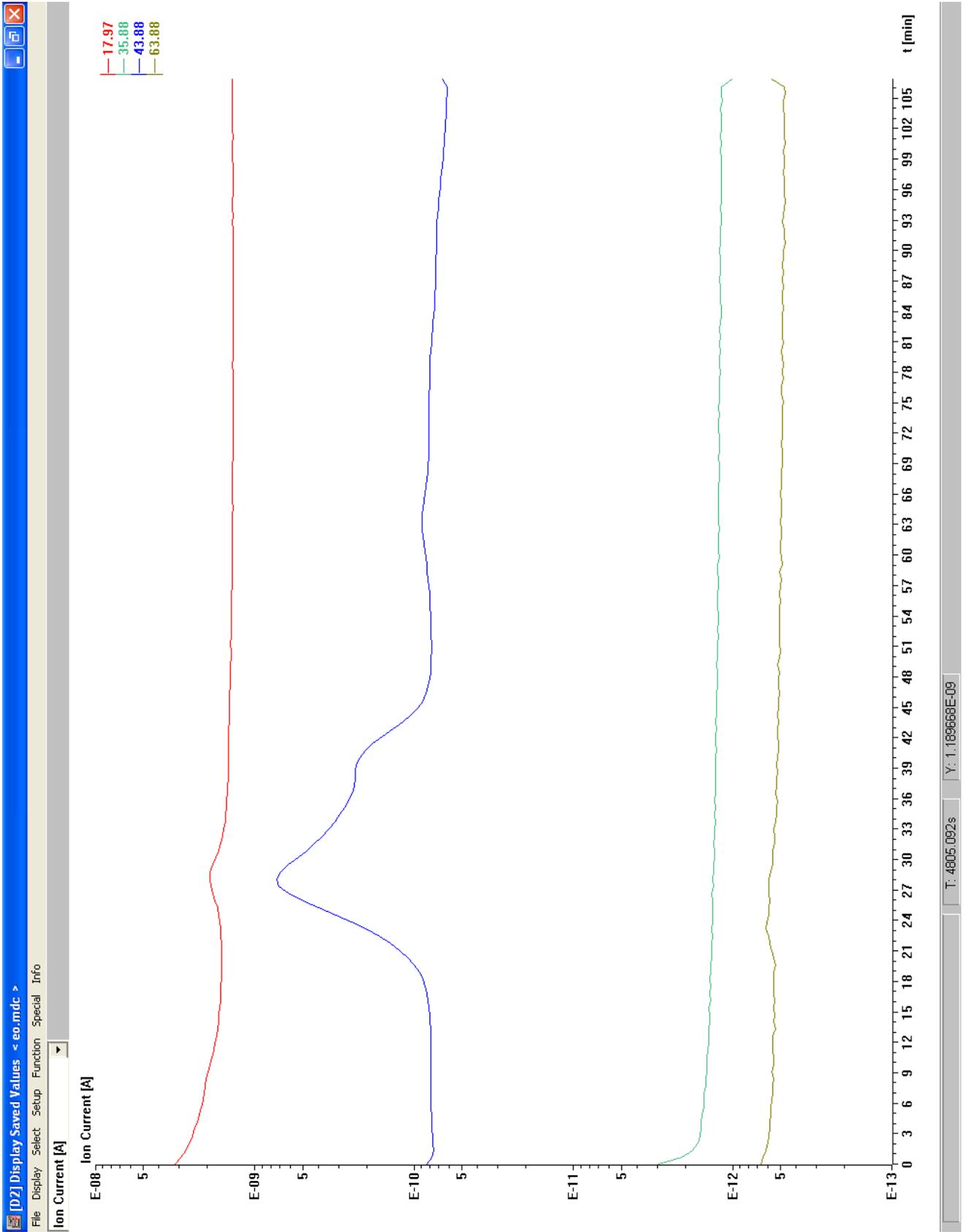
Δexo

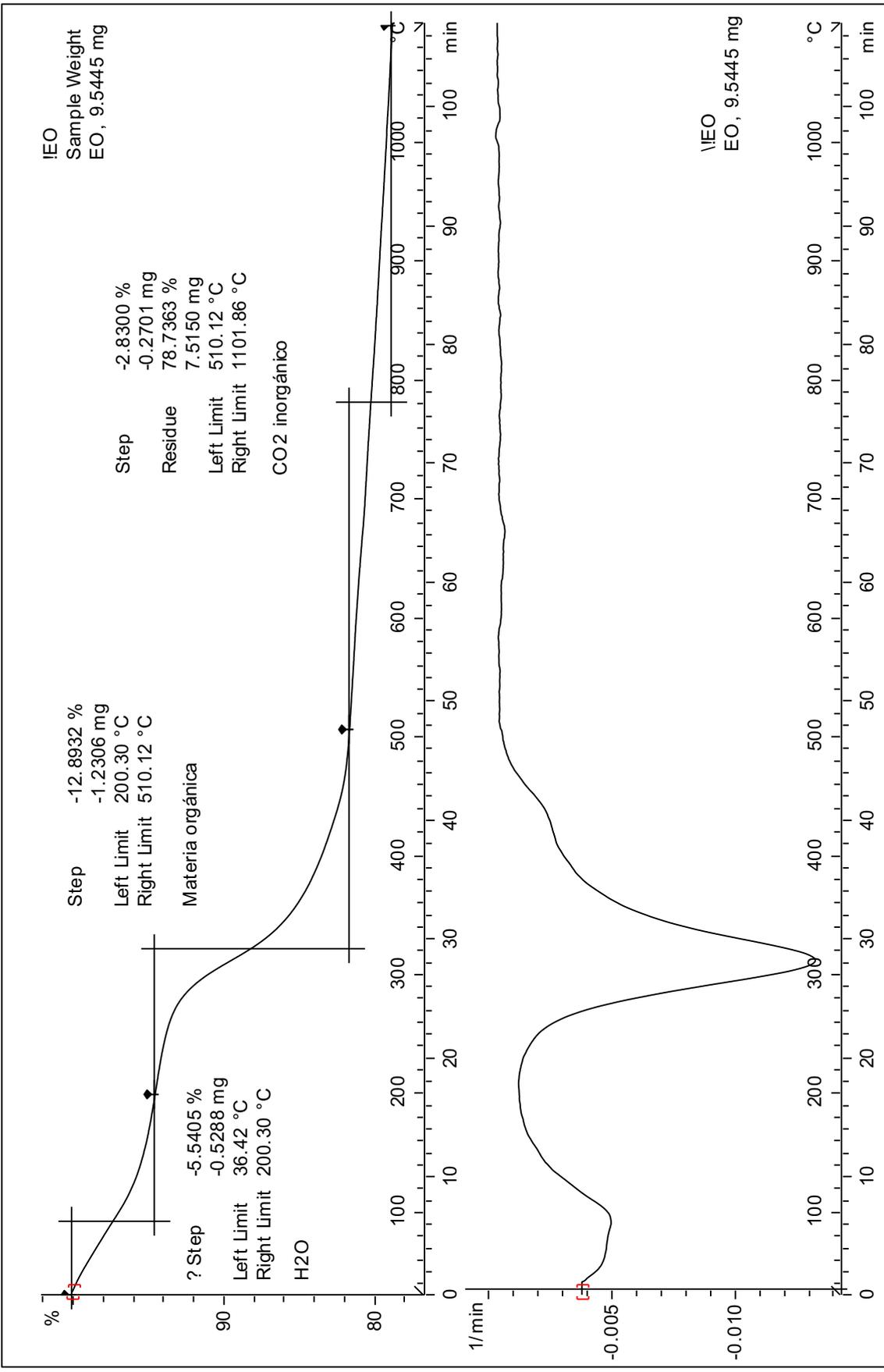


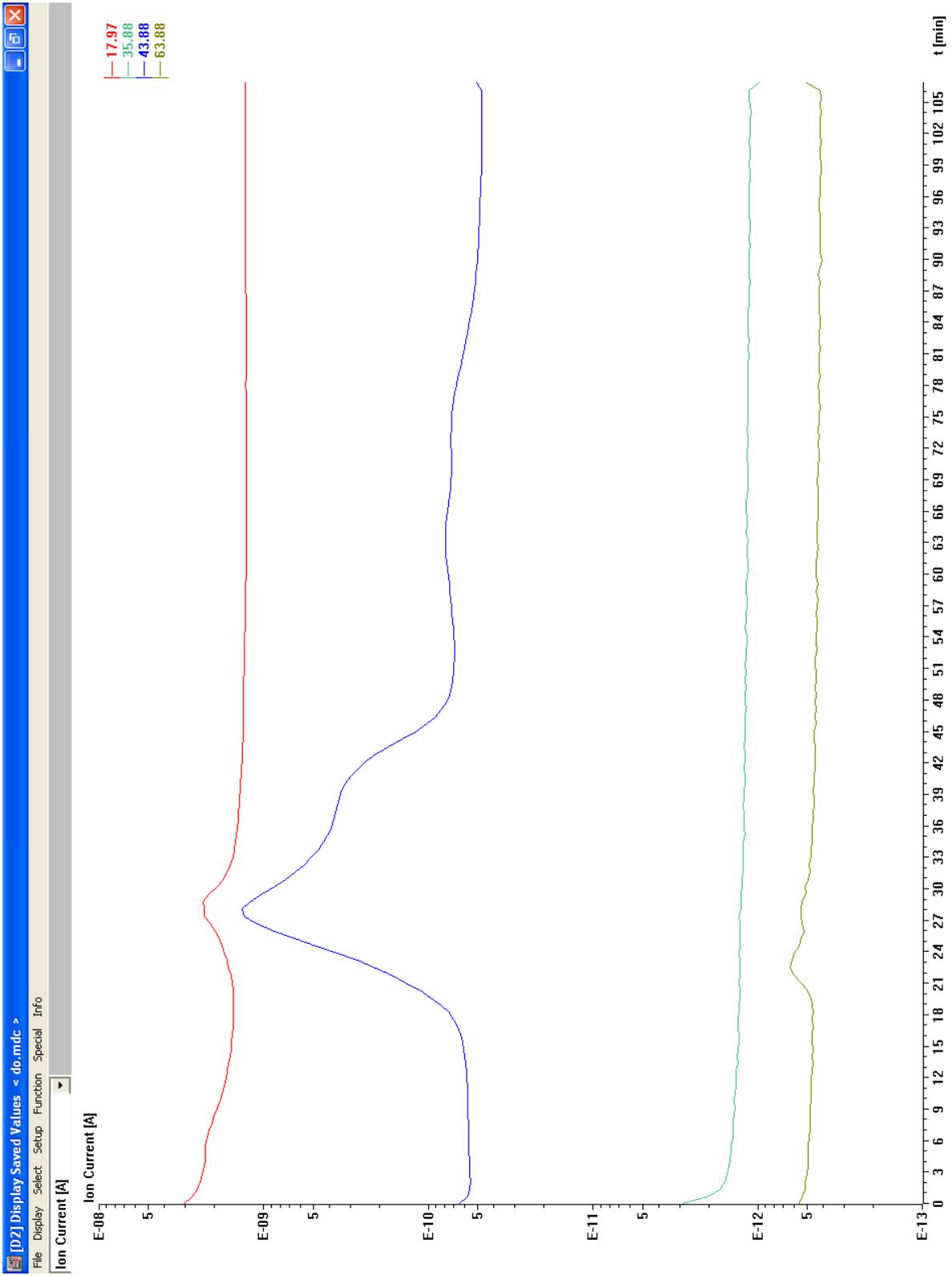








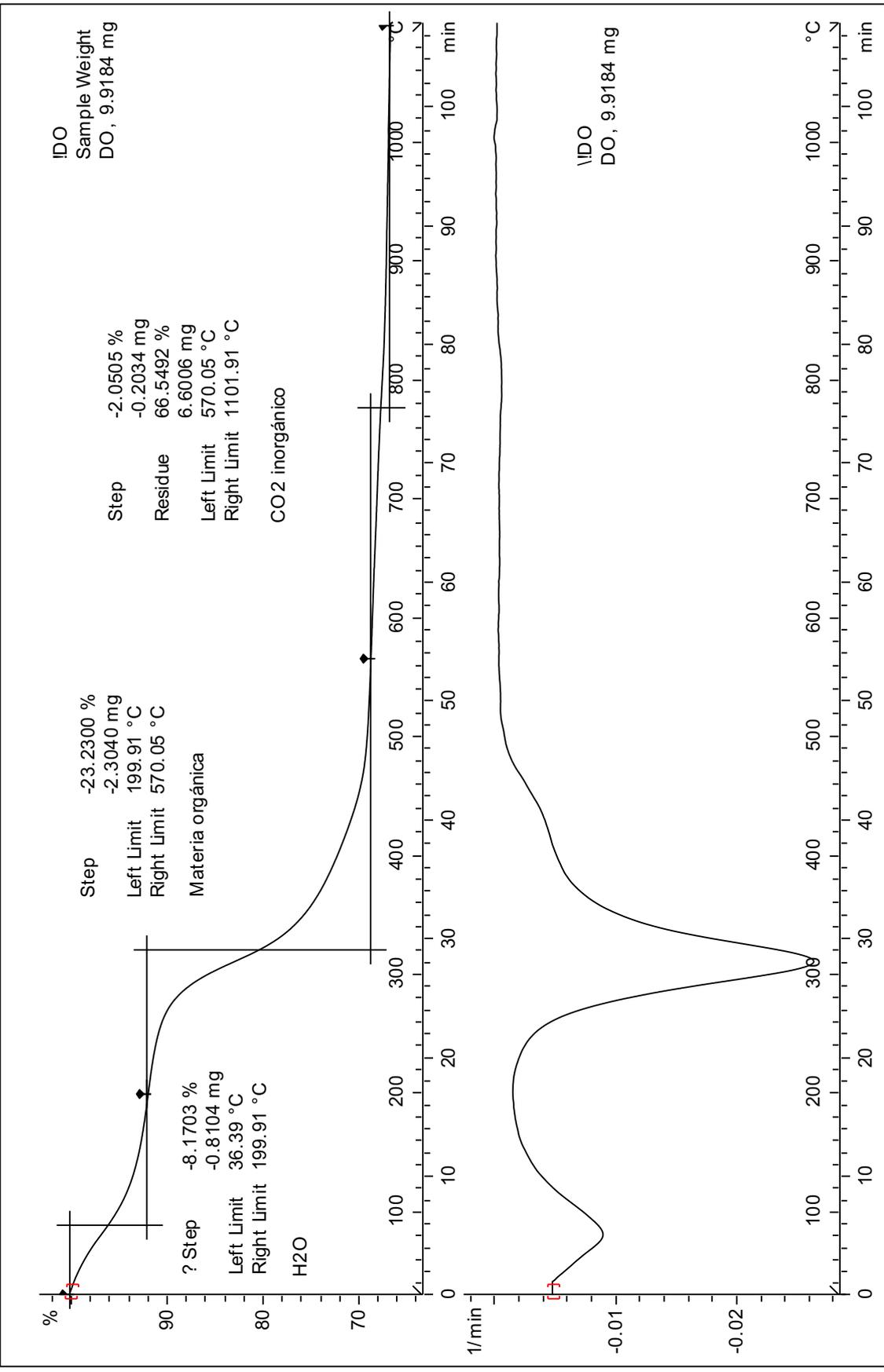




^exo

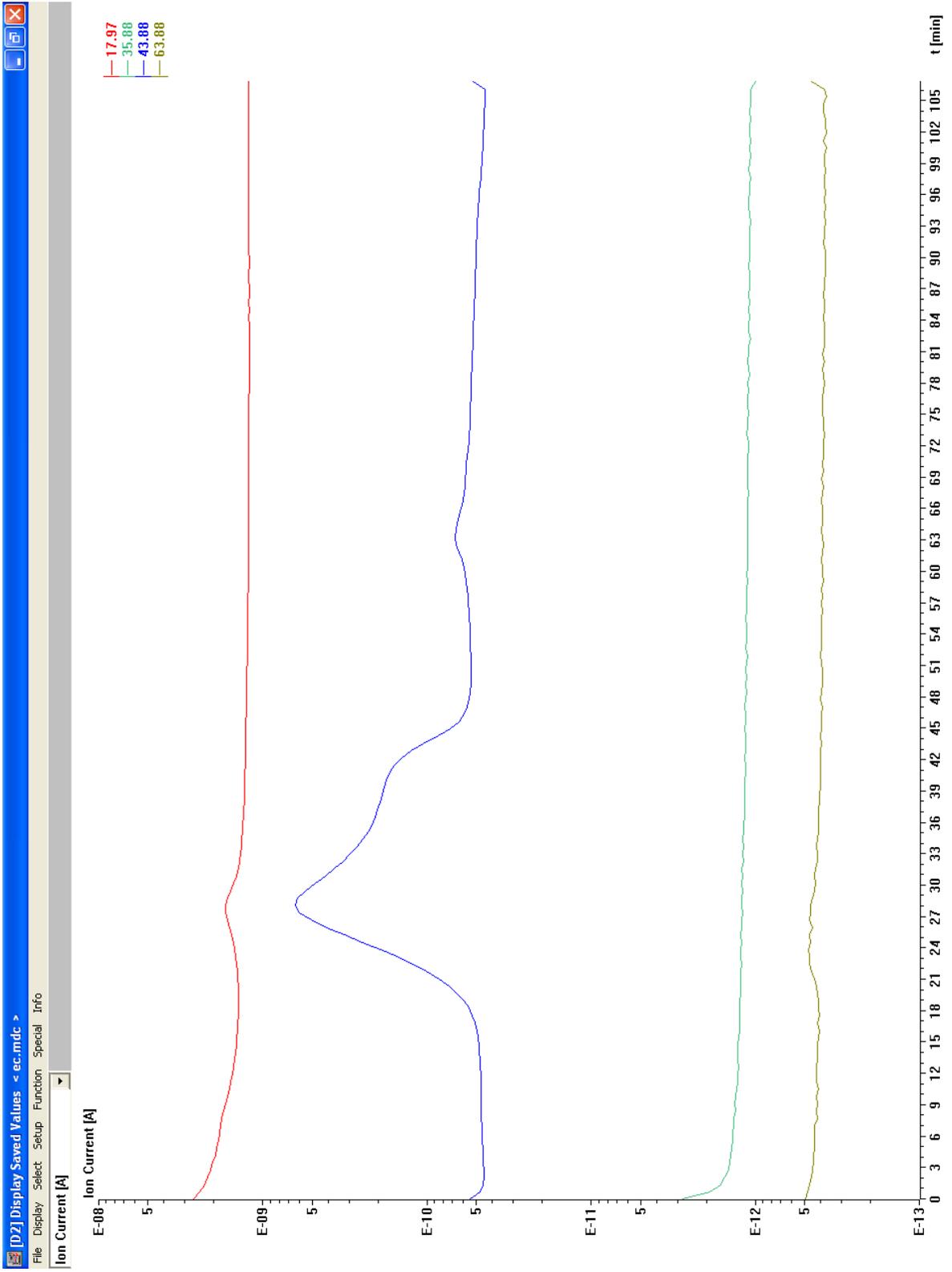
DO

08.06.2012 15:04:42



Lab: SAIT

STAR® SW 10.00

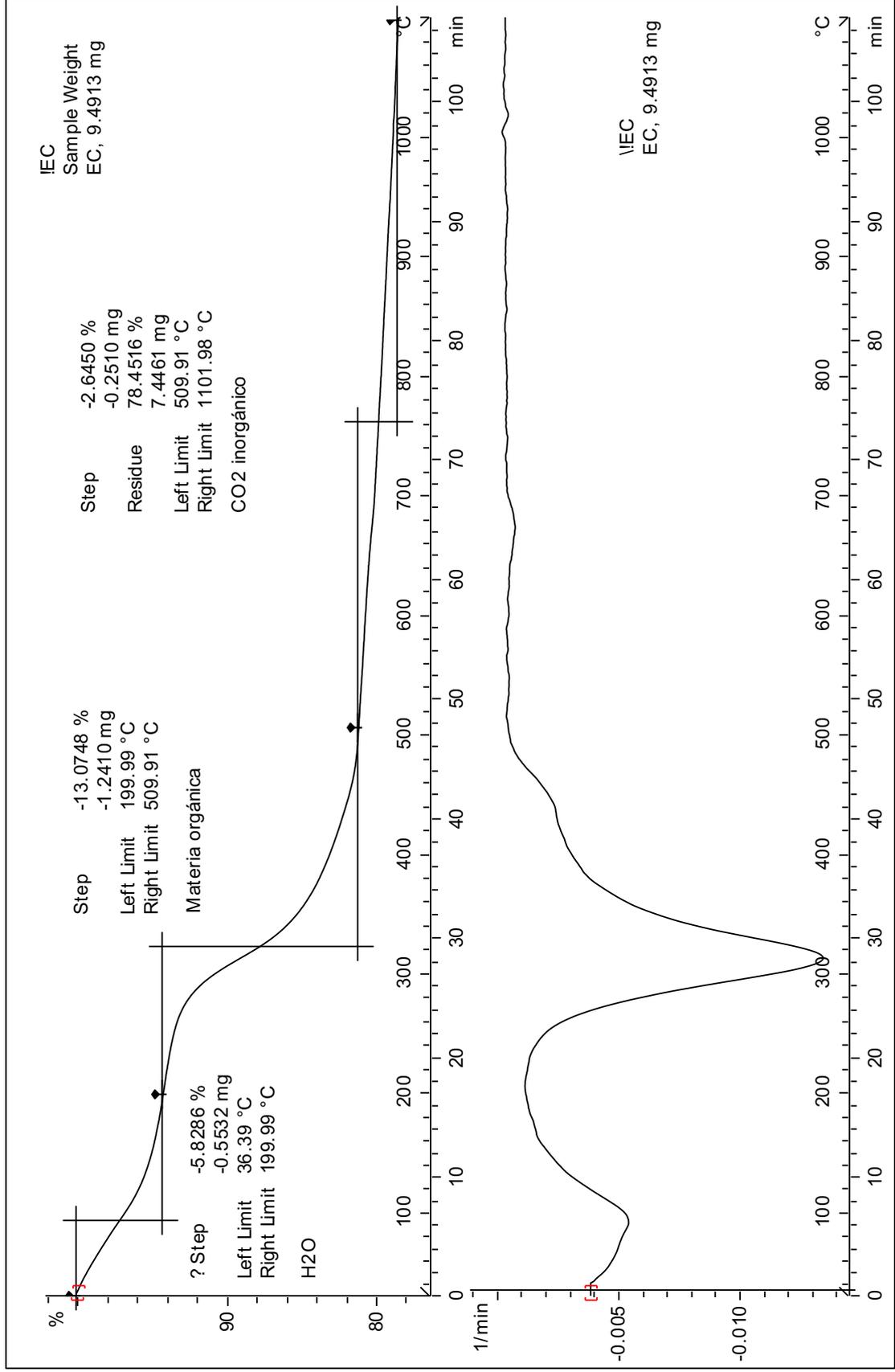


T: 5234.024s Y: 1.189668E-09

^exo

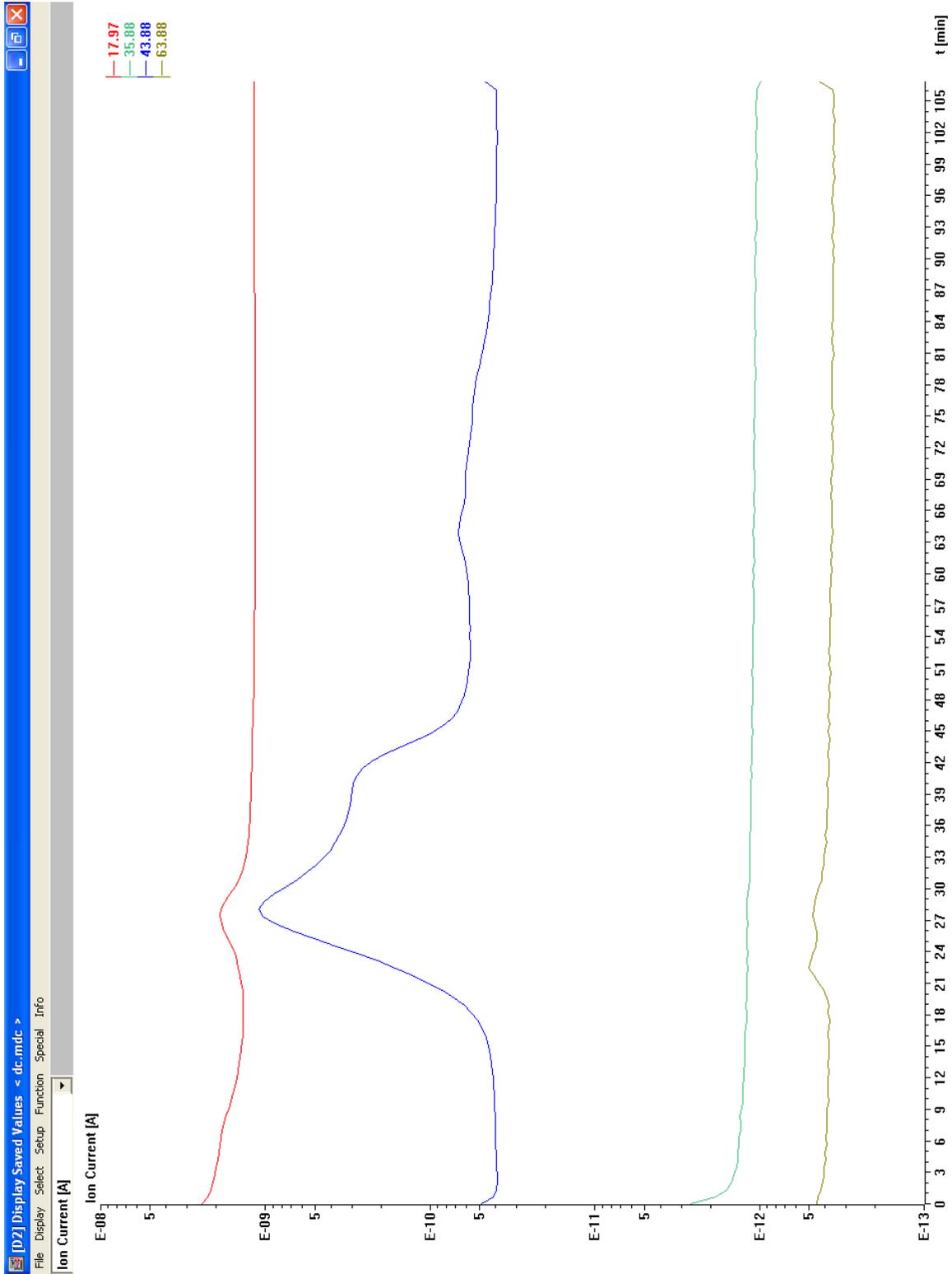
EC

08.06.2012 15:21:33

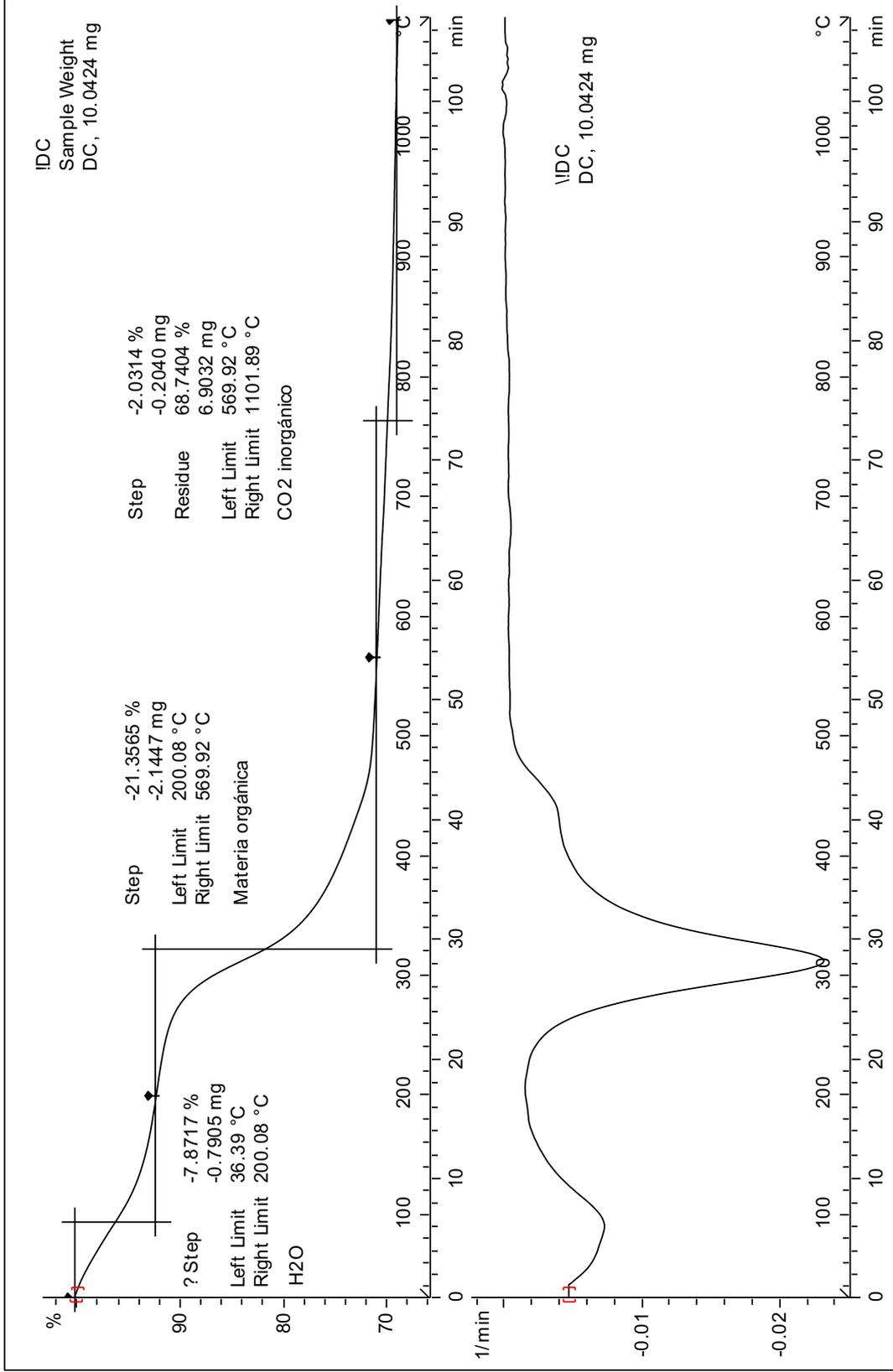


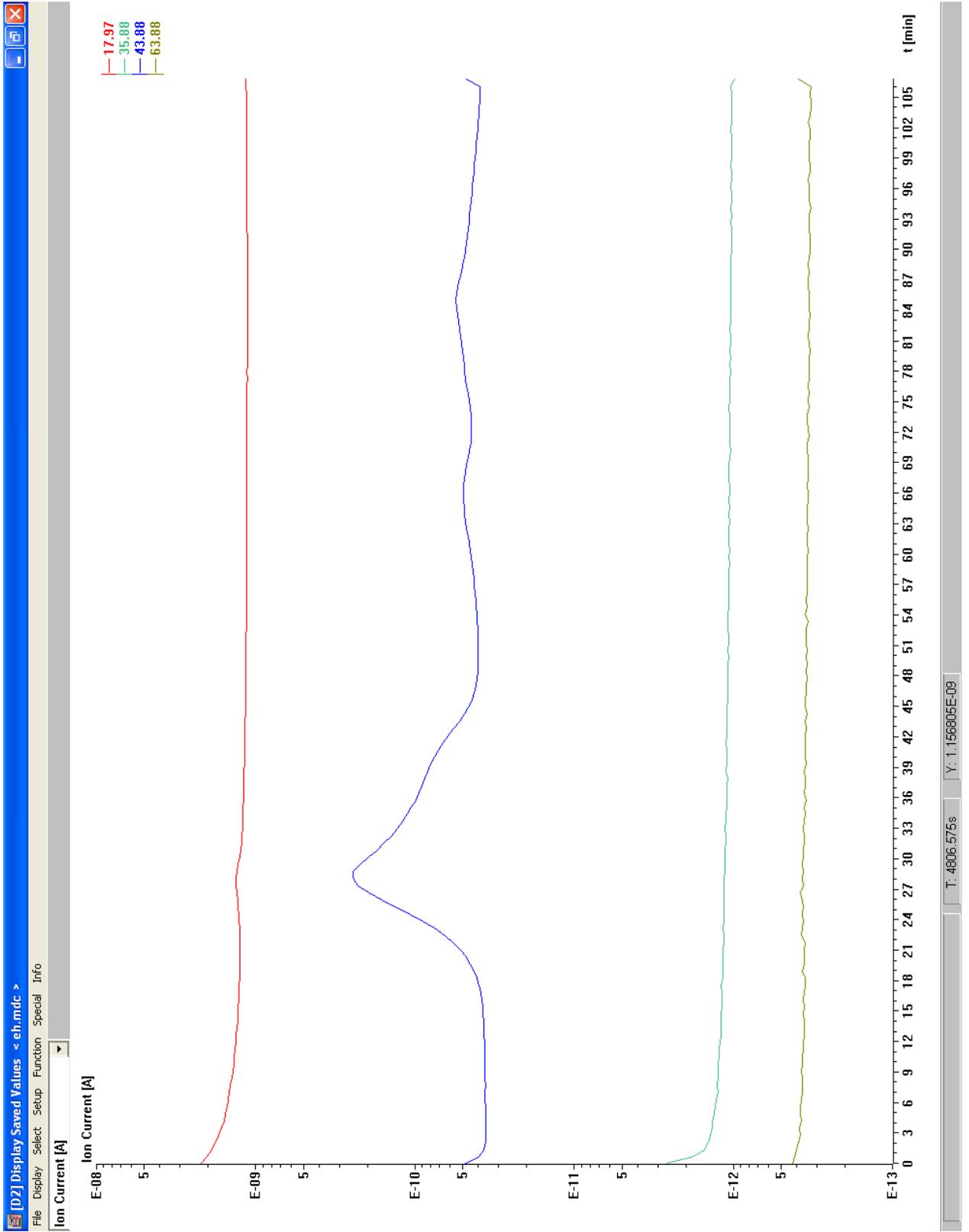
Lab: SAIT

STAR® SW 10.00



T: 4993.009s Y: 1.367628E-09

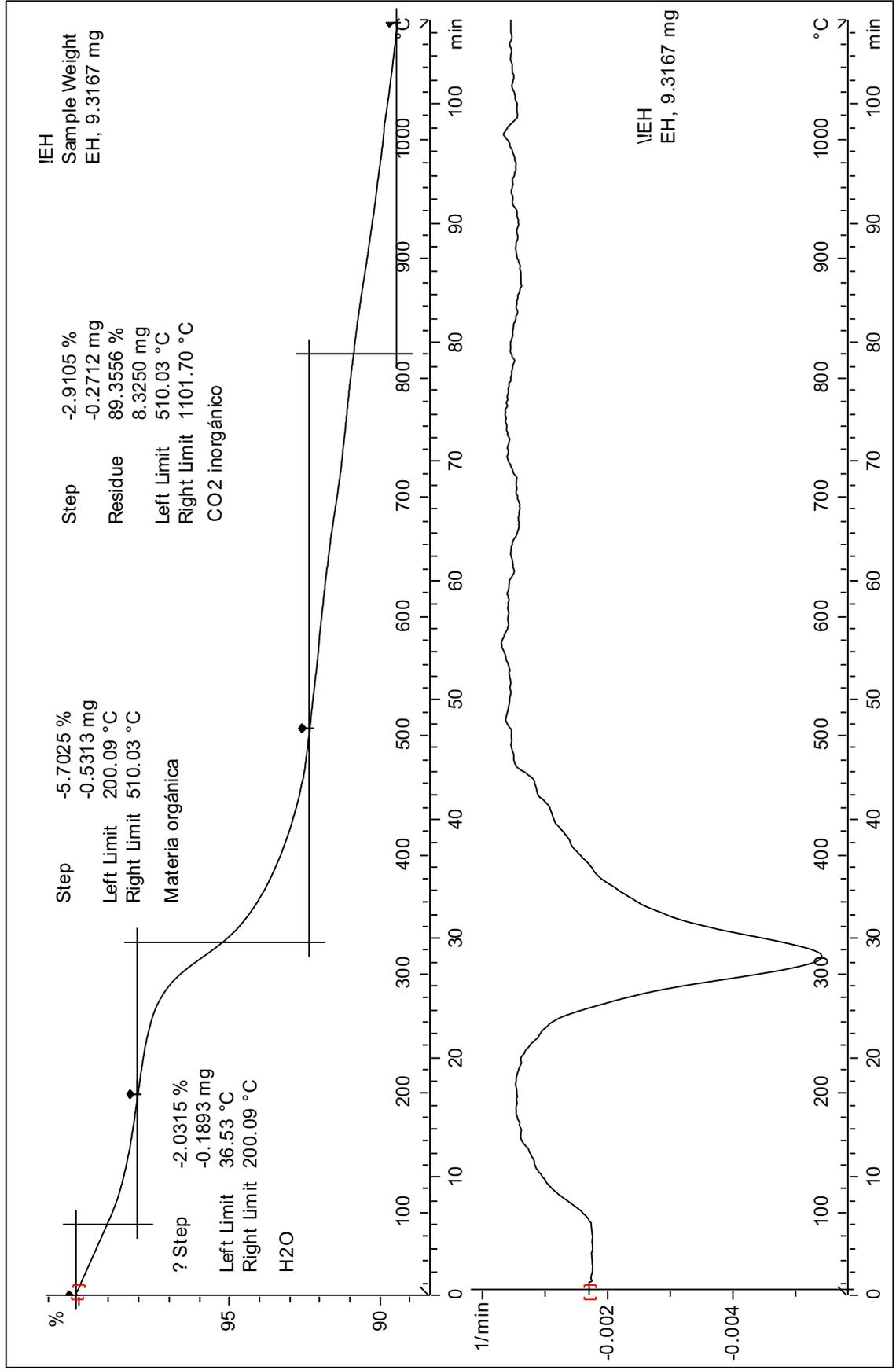




Δexo

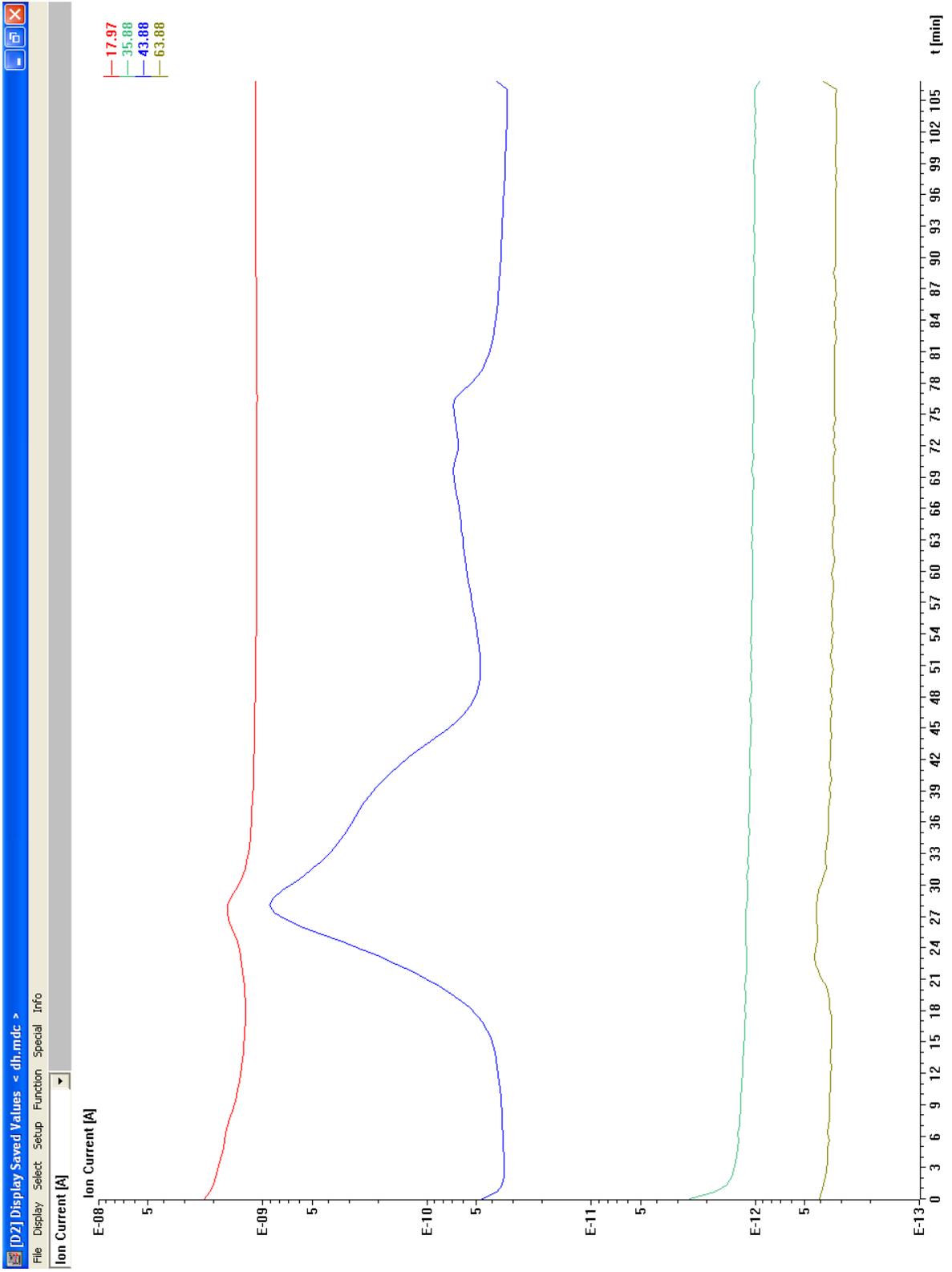
EH

08.06.2012 15:41:28



Lab: SAIT

STAR® SW 10.00

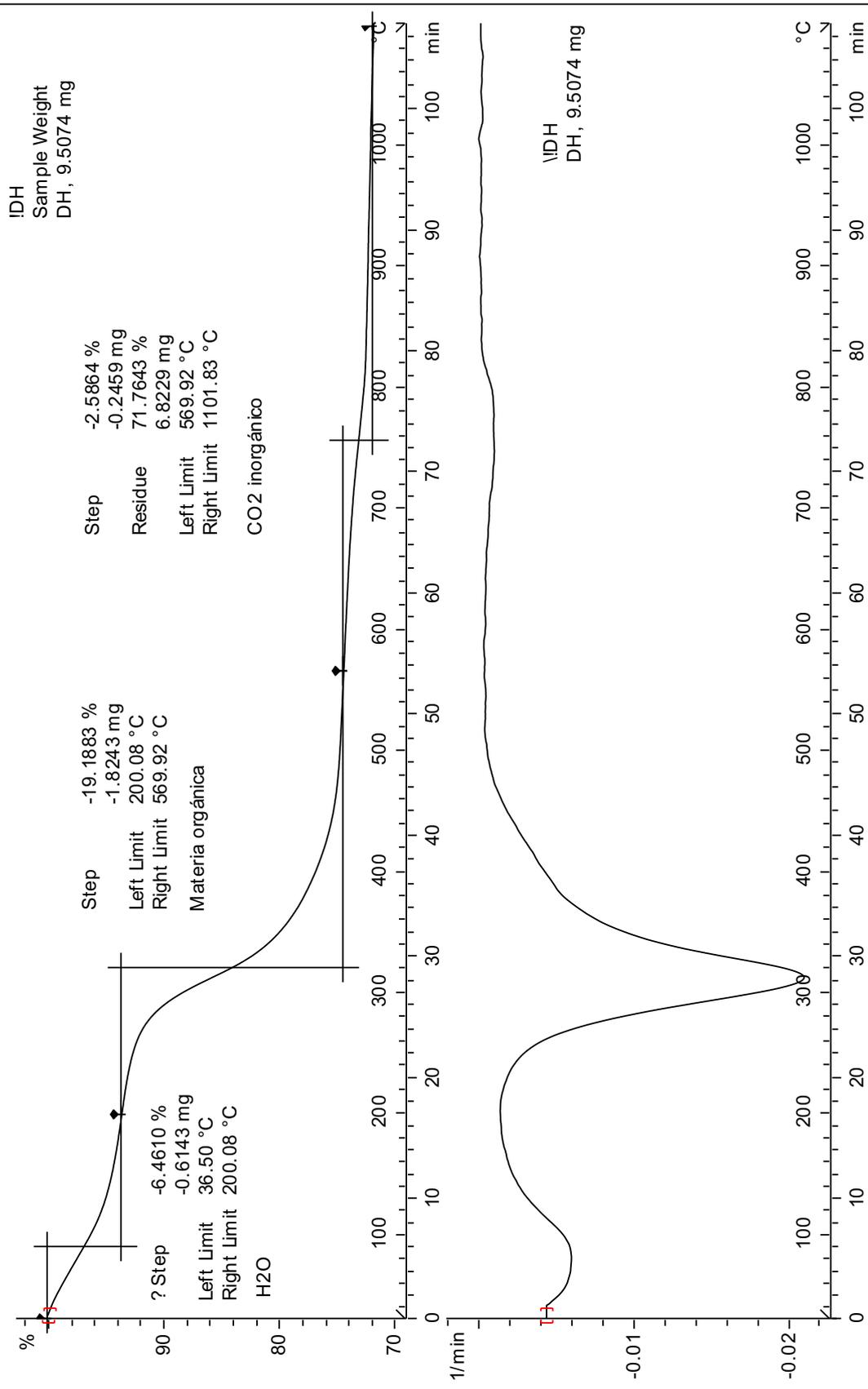


T: 5017.767 s Y: 1.063565E-09

exo

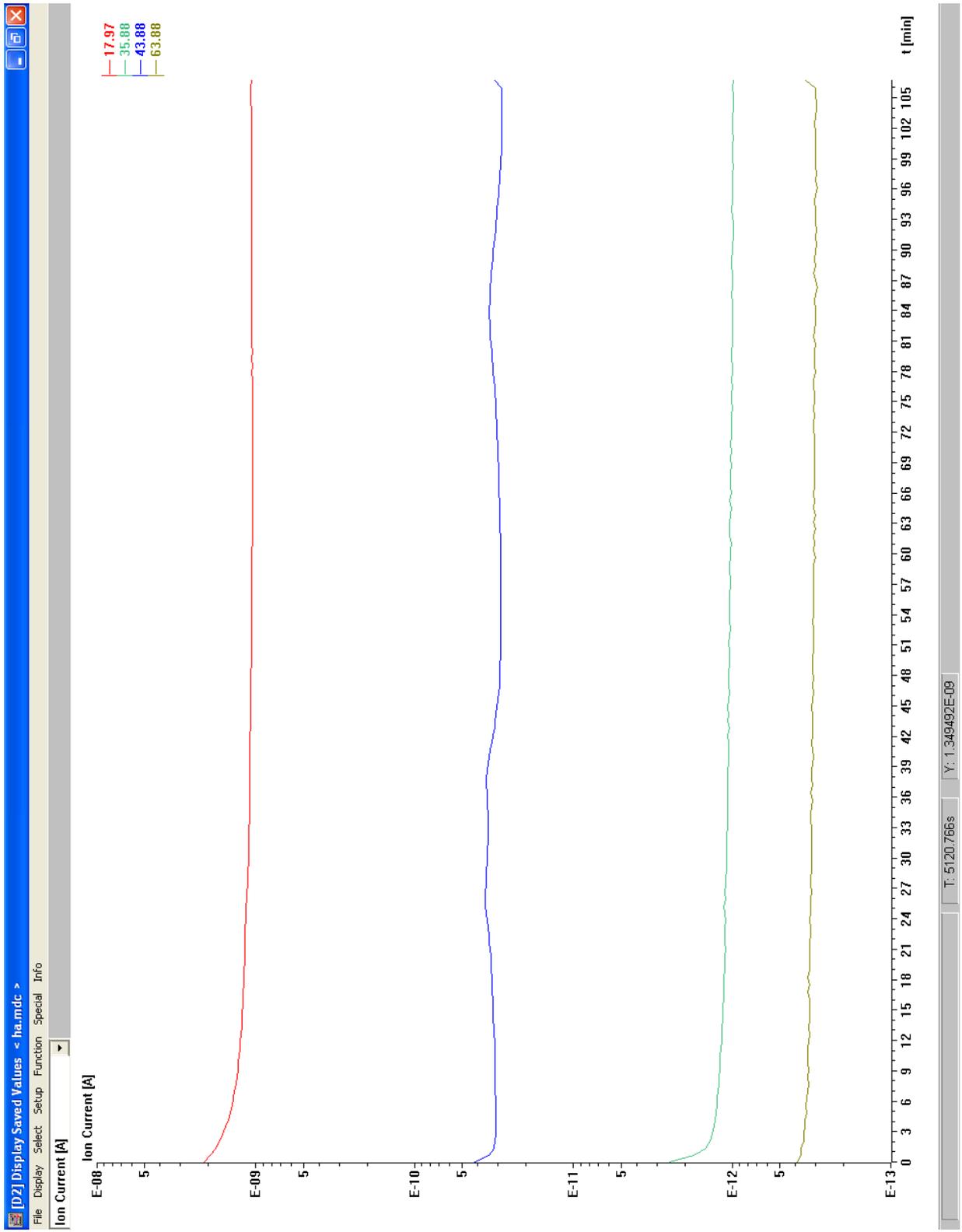
DH

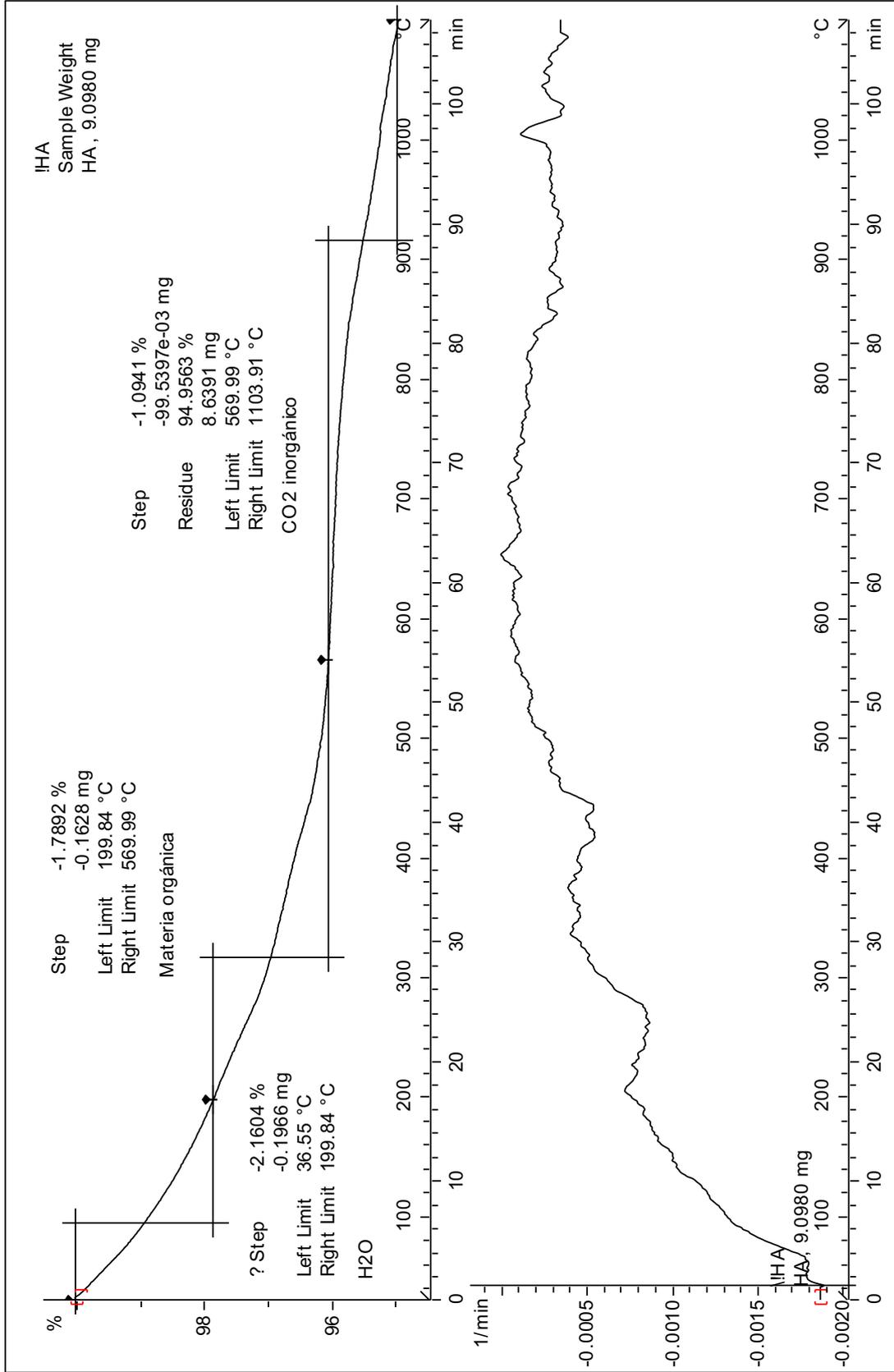
08.06.2012 16:15:58



Lab: SAIT

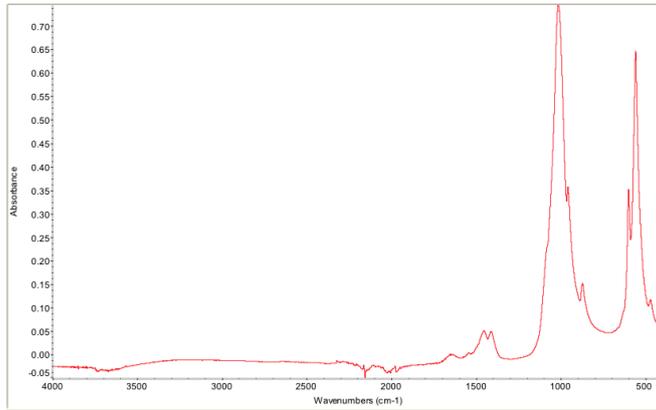
STAR SW 10.00





ANEXO III

ESMALTE HUMANO



Region: 4000.00 400.00

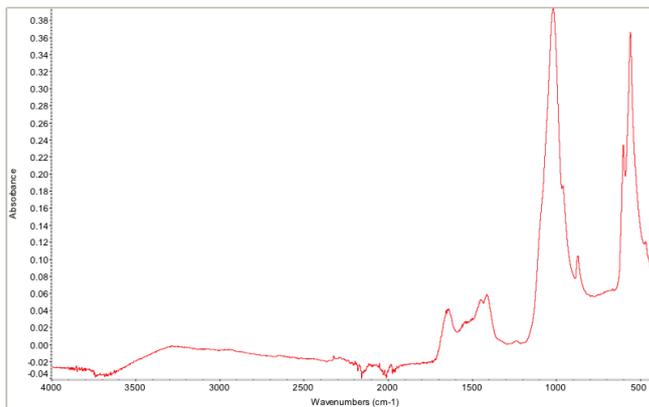
Absolute threshold: -0.002

Sensitivity: 83

Peak list:

Position	Intensity
411.91	0.0613
470.75	0.116
558.72	0.647
599.63	0.351
872.12	0.151
958.37	0.355
1014.91	0.744
1412.09	0.0474
1457.27	0.0489
1654.56	-0.00041

DENTINA HUMANA



Region: 4000.00 400.00

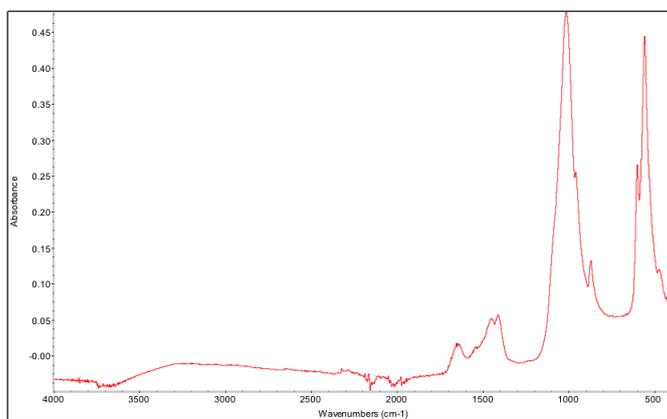
Absolute threshold: 0.026

Sensitivity: 83

Peak list:

Position	Intensity
470.07	0.120
559.02	0.366
600.18	0.233
871.72	0.103
960.46	0.185
1017.24	0.394
1412.08	0.0575
1448.39	0.0513
1637.83	0.0406

ESMALTE BOVINO



Region: 4000.00 400.00

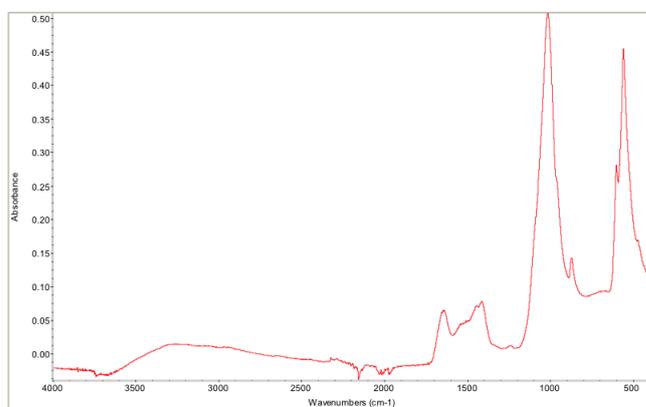
Absolute threshold: 0.001

Sensitivity: 80

Peak list:

Position	Intensity
402.54	0.0730
475.64	0.119
558.45	0.445
599.90	0.265
871.62	0.132
958.73	0.254
1014.40	0.477
1411.79	0.0552
1449.65	0.0509
1647.18	0.0153

DENTINA BOVINA



Region: 4000.00 400.00

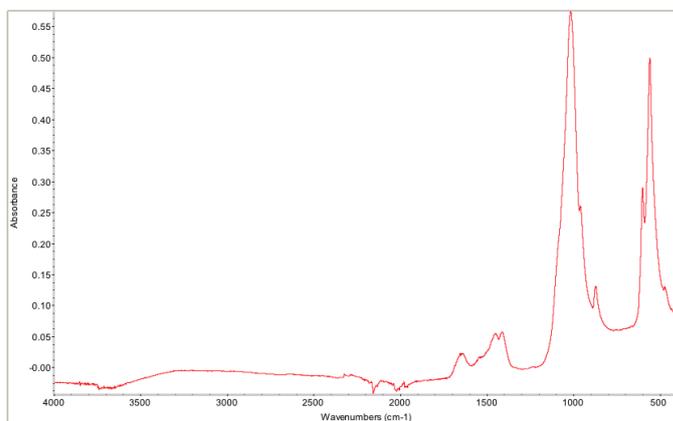
Absolute threshold: 0.013

Sensitivity: 75

Peak list:

Position	Intensity
557.47	0.454
599.60	0.280
871.67	0.142
1015.44	0.507
1413.13	0.0764
1638.01	0.0635

ESMALTE OVINO



Region: 4000.00 400.00

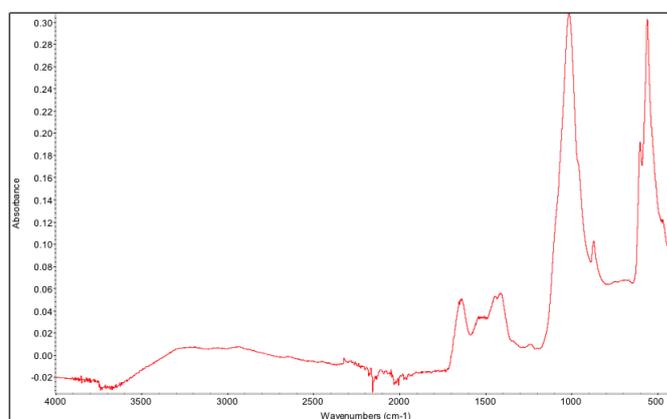
Absolute threshold: 0.021

Sensitivity: 94

Peak list:

Position	Intensity
408.89	0.0837
472.11	0.128
558.92	0.498
600.46	0.289
871.92	0.130
959.48	0.259
1015.68	0.573
1412.48	0.0560
1450.57	0.0536
1647.36	0.0215
1654.43	0.0216

DENTINA OVINA



Region: 4000.00 400.00

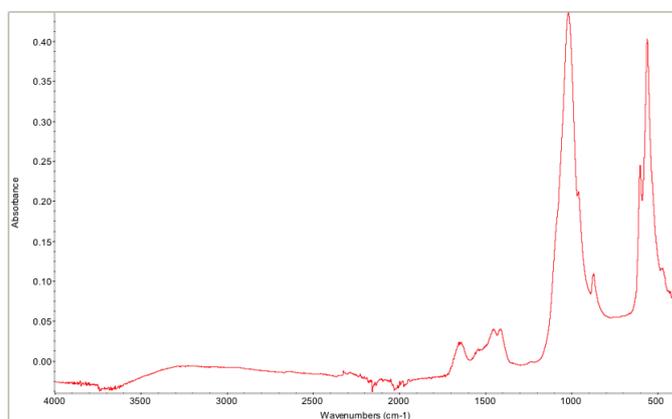
Absolute threshold: 0.045

Sensitivity: 83

Peak list:

Position	Intensity
468.46	0.121
558.72	0.303
599.79	0.191
690.05	0.0669
871.24	0.102
1013.28	0.307
1412.51	0.0551
1439.16	0.0518
1637.72	0.0502
1654.18	0.0469

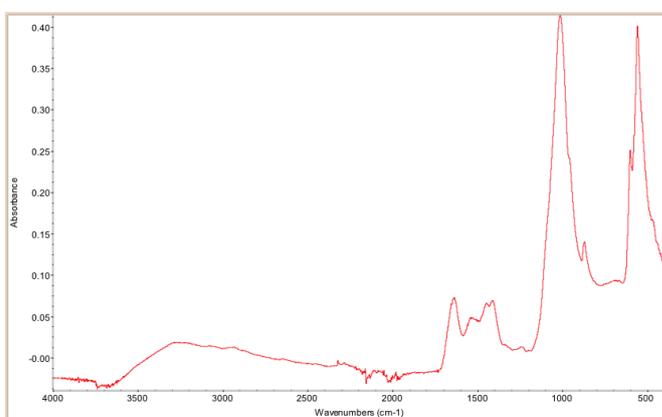
ESMALTE PORCINO



Region: 4000.00 400.00
Absolute threshold: 0.016
Sensitivity: 84
Peak list:

Position	Intensity
476.08	0.115
559.26	0.402
600.12	0.244
871.93	0.108
959.60	0.211
1016.81	0.435
1412.77	0.0391
1450.84	0.0387
1647.27	0.0219
1654.37	0.0223

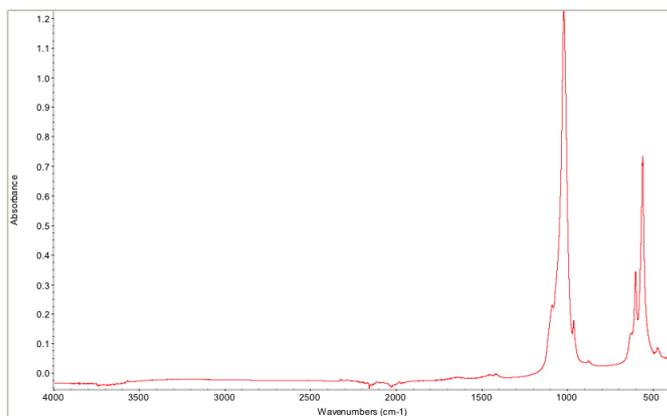
DENTINA PORCINA



Region: 4000.00 400.00
Absolute threshold: 0.022
Sensitivity: 90
Peak list:

Position	Intensity
401.13	0.117
557.73	0.401
599.28	0.250
667.61	0.0924
871.46	0.139
1013.25	0.414
1412.60	0.0684
1448.48	0.0646
1541.45	0.0478
1637.67	0.0717

HIDROXIAPATITA



Region: 4000.00 400.00

Absolute threshold: 0.044

Sensitivity: 93

Peak list:

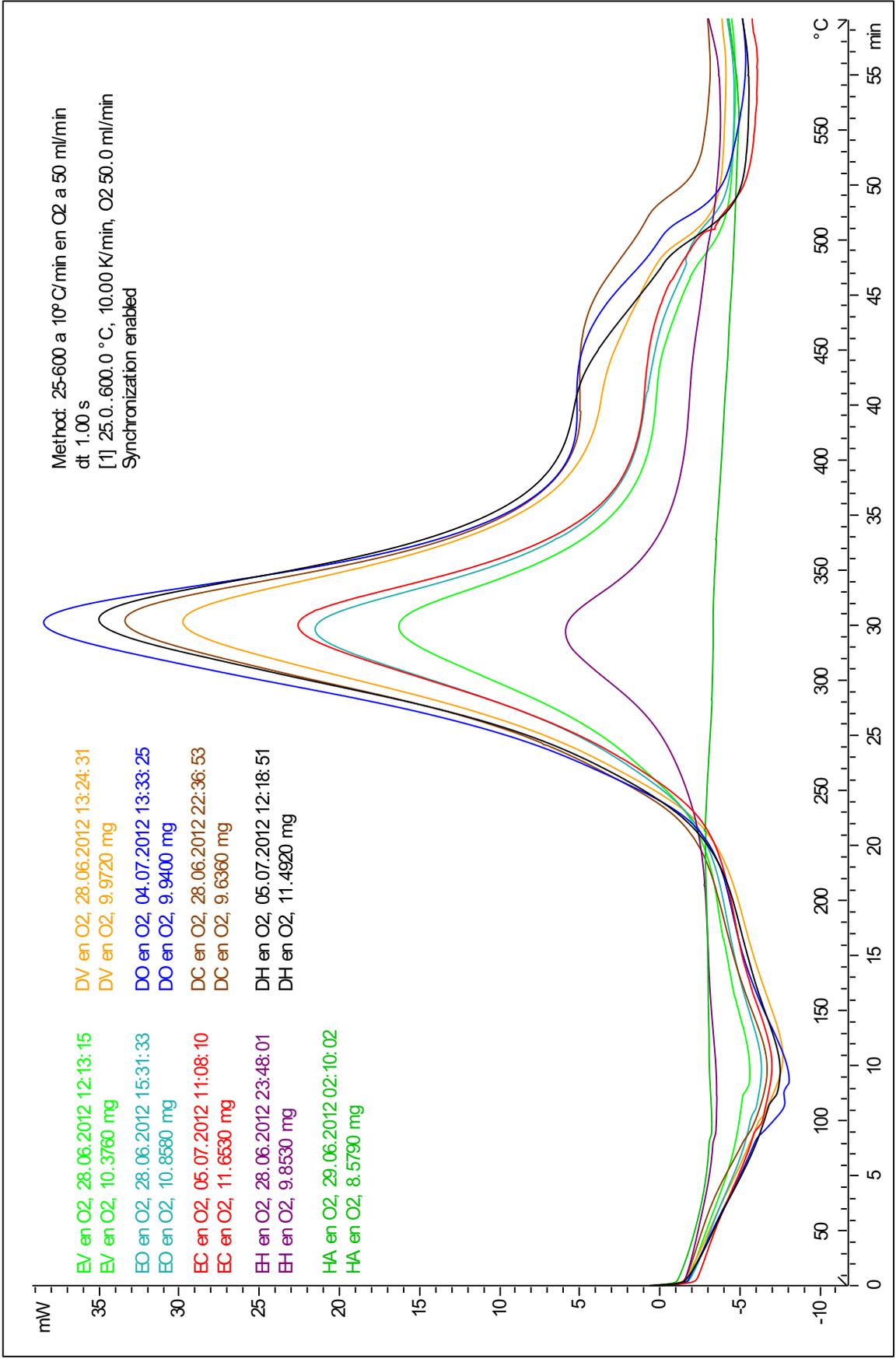
Position	Intensity
472.76	0.0825
559.37	0.734
600.04	0.340
627.42	0.133
962.39	0.175
1019.66	1.224
1088.92	0.228

ANEXO IV

^exo

Dentinas y esmaltes en O2

05.07.2012 13:50:14



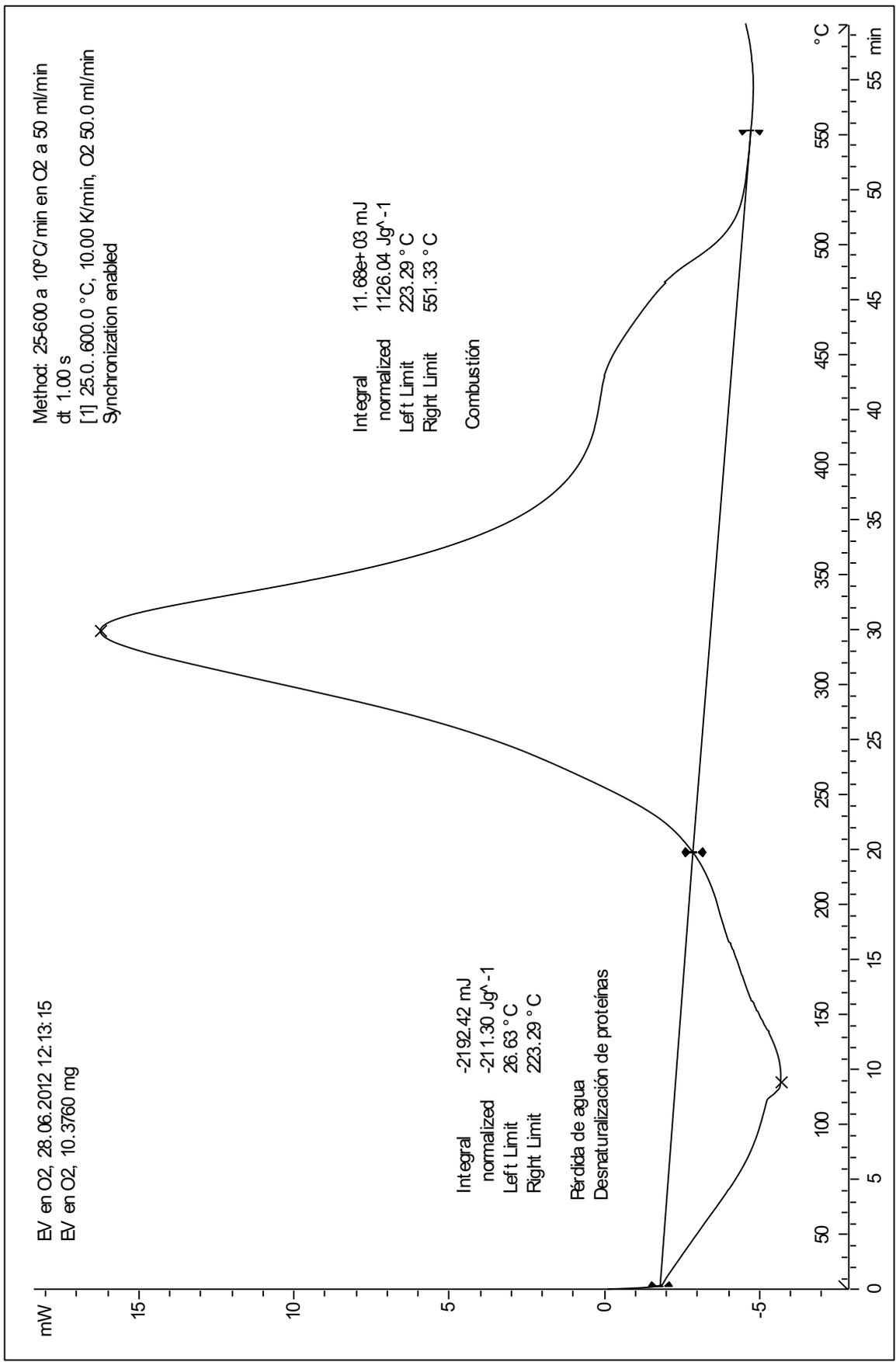
Lab: SAIT

STAR® SW 10.00

EV en O2

02.07.2012 11:21:18

^exo



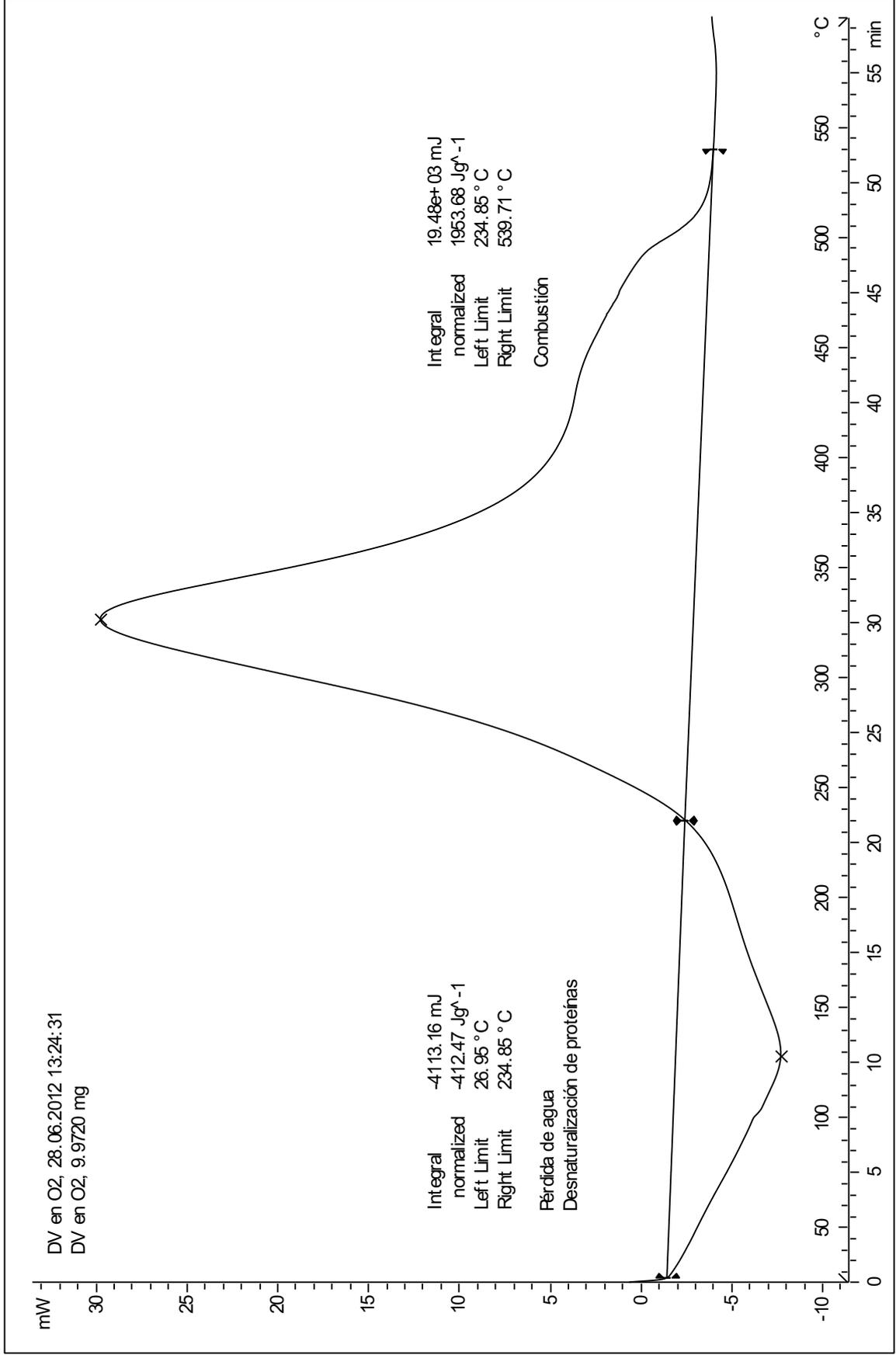
Lab: SAIT

STAR® SW 10.00

02.07.2012 13:00:03

DV en O2

exo



Lab: SAIT

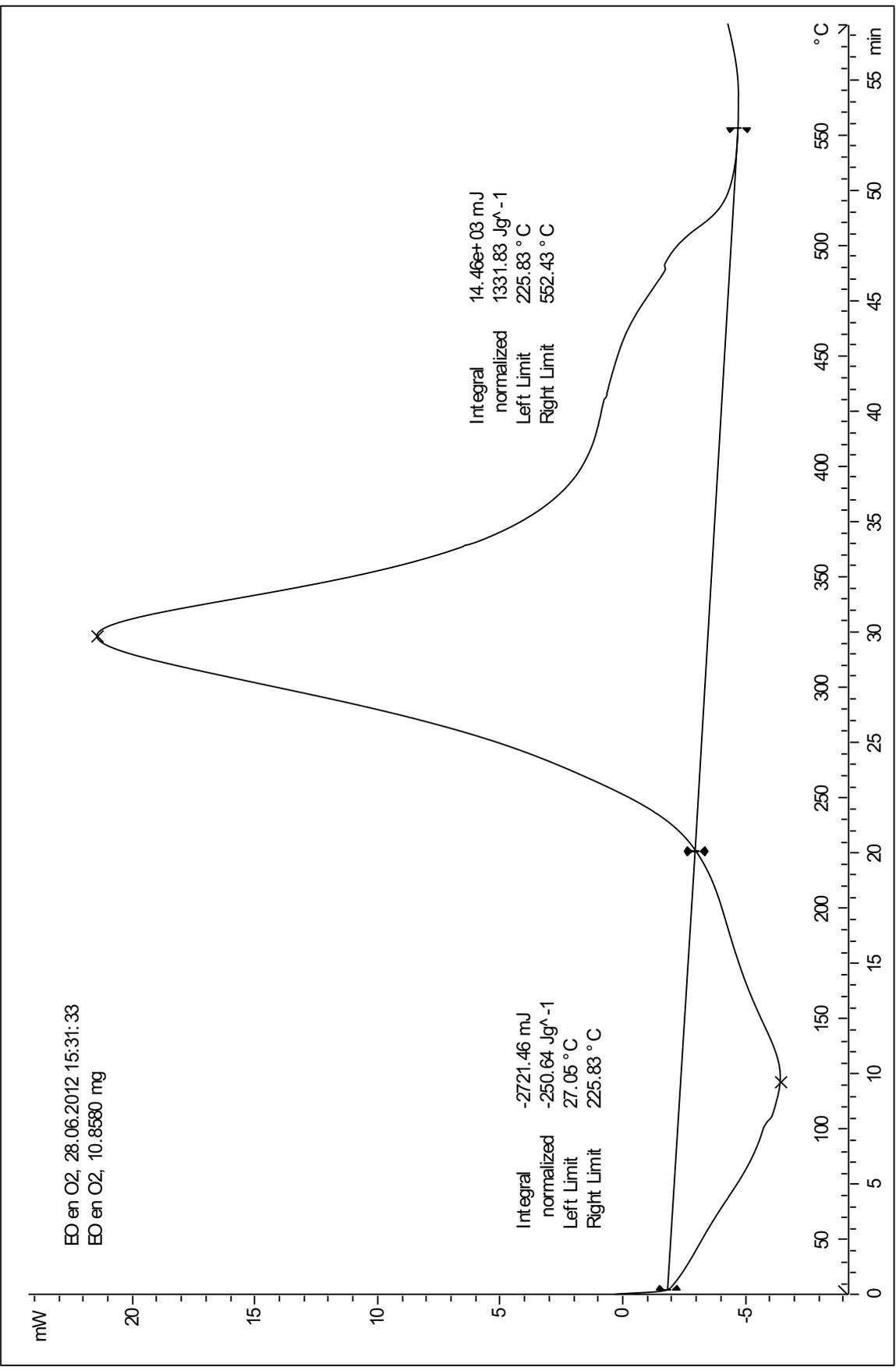
STAR SW 10.00

EO en O2

EO en O2

^exo

04.07.2012 09:34:38



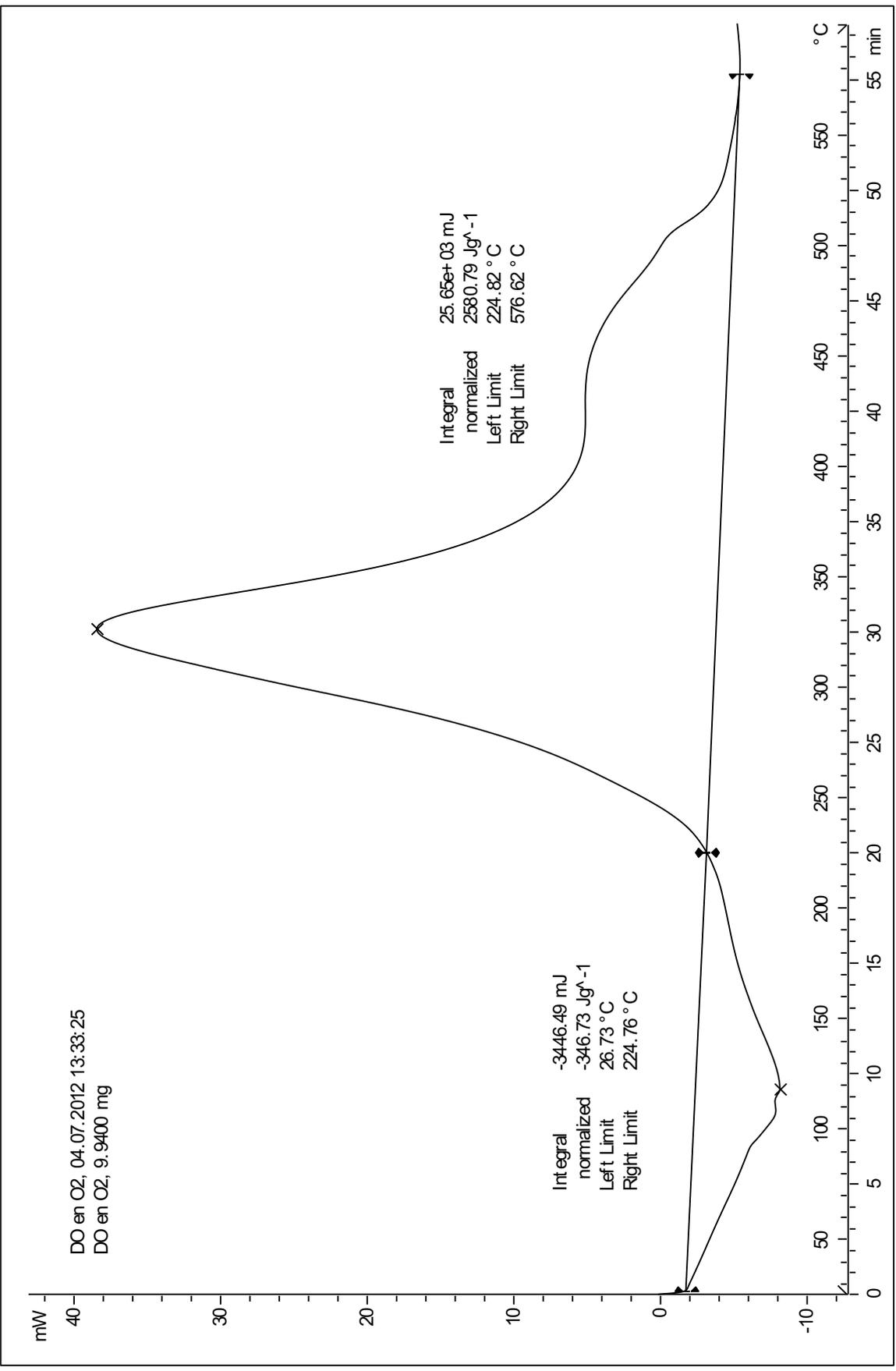
Lab: SAIT

STAR[®] SW 10.00

05.07.2012 13:24:26

DO en O2

Δ exo



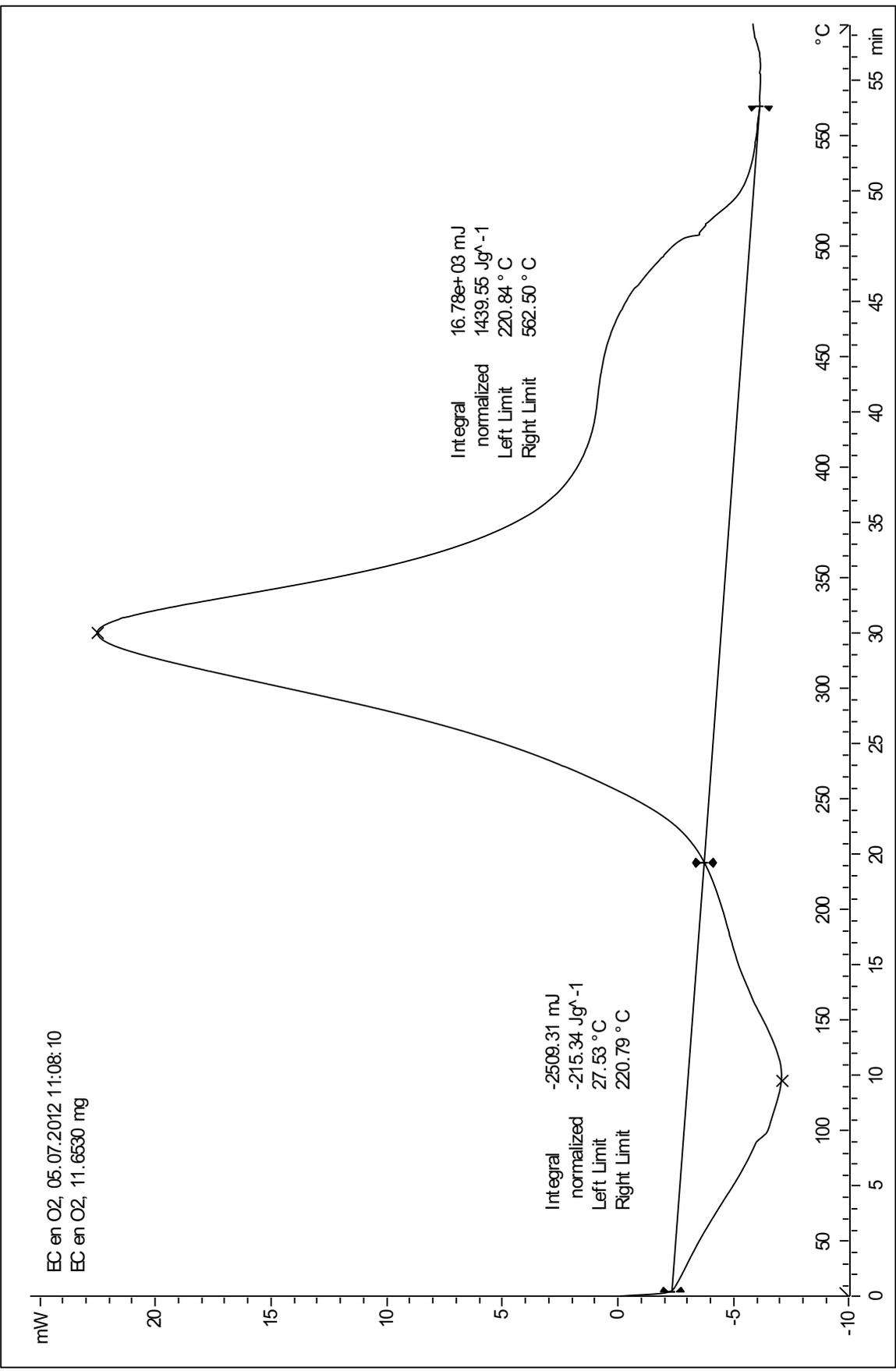
Lab: SAIT

STAR[®] SW 10.00

05.07.2012 13:27:22

EC en O2

^exo



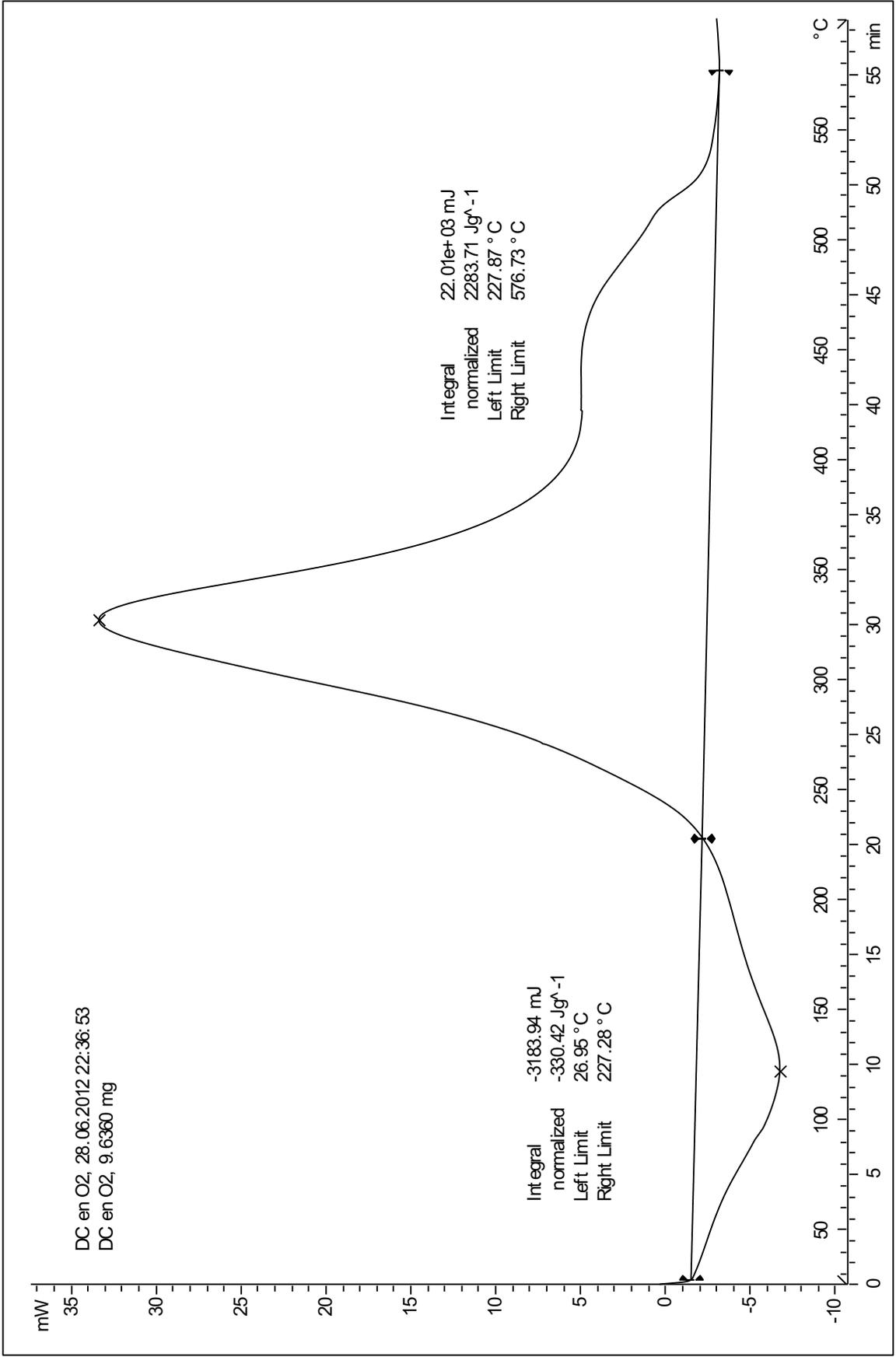
Lab: SAIT

STAR^e SW 10.00

^exo

DC en O2

04.07.2012 10:47:14



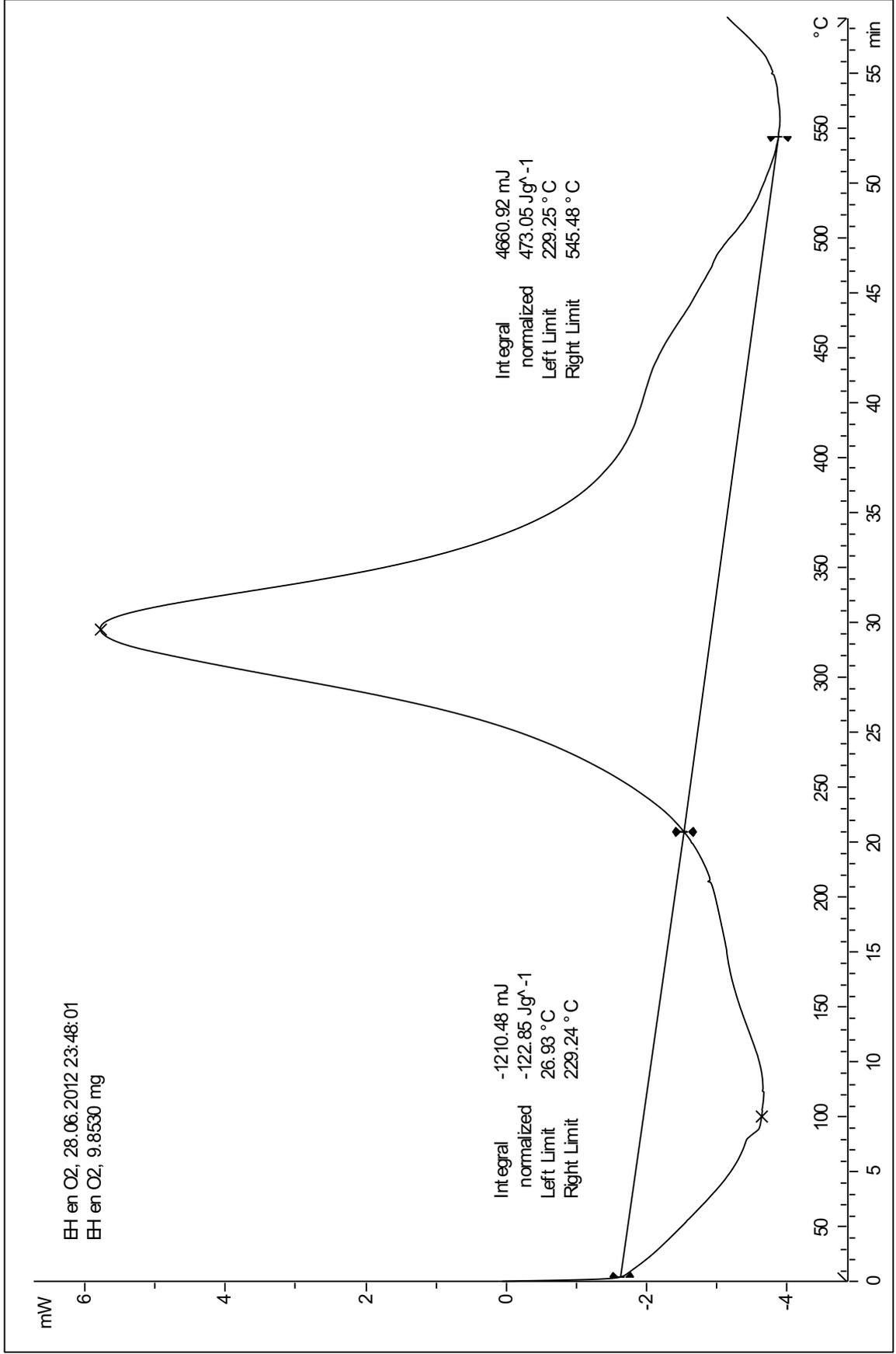
Lab: SAIT

STAR^e SW 10.00

04.07.2012 10:53:25

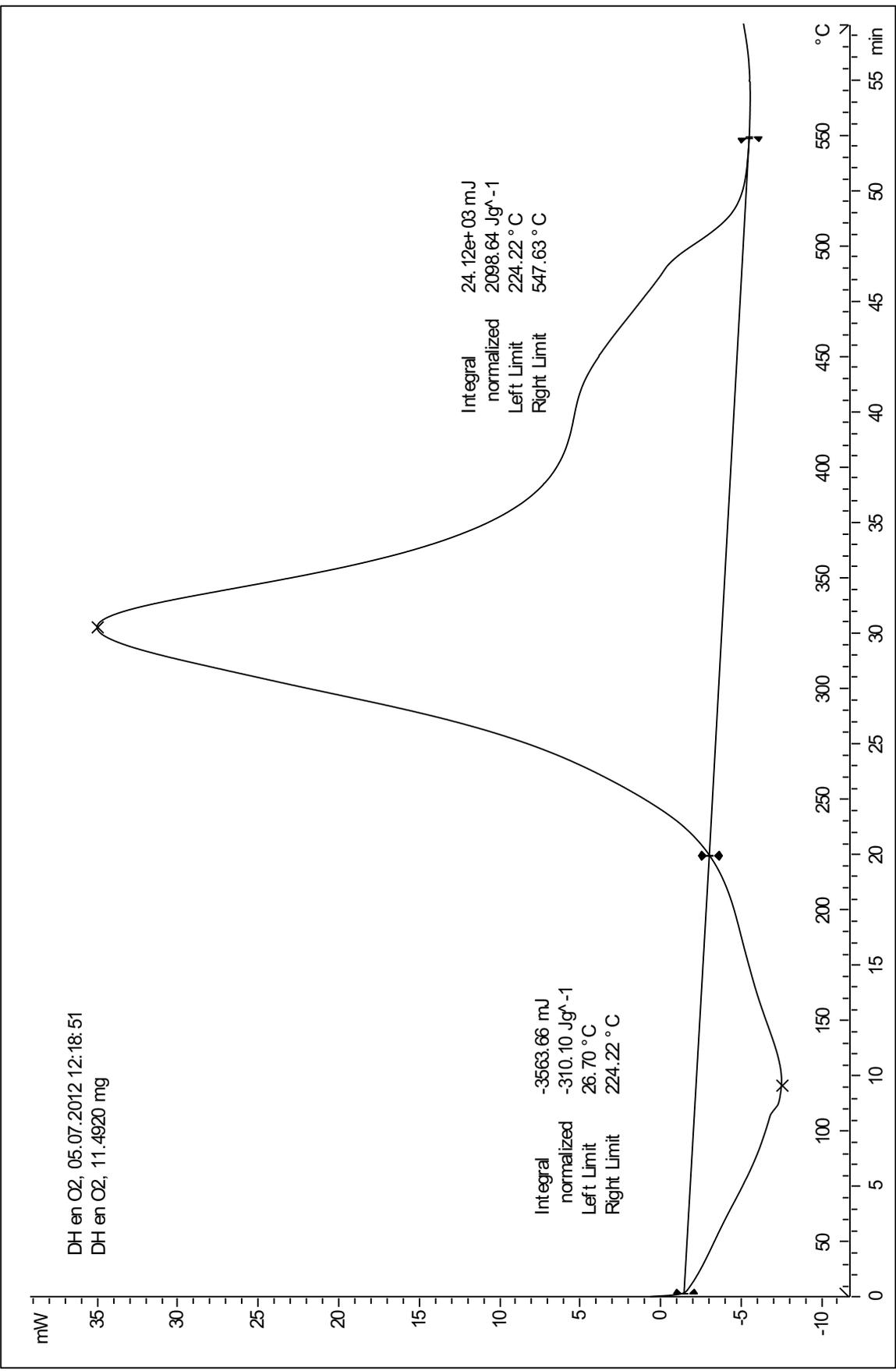
EH en O2

Δ exo



Lab: SAIT

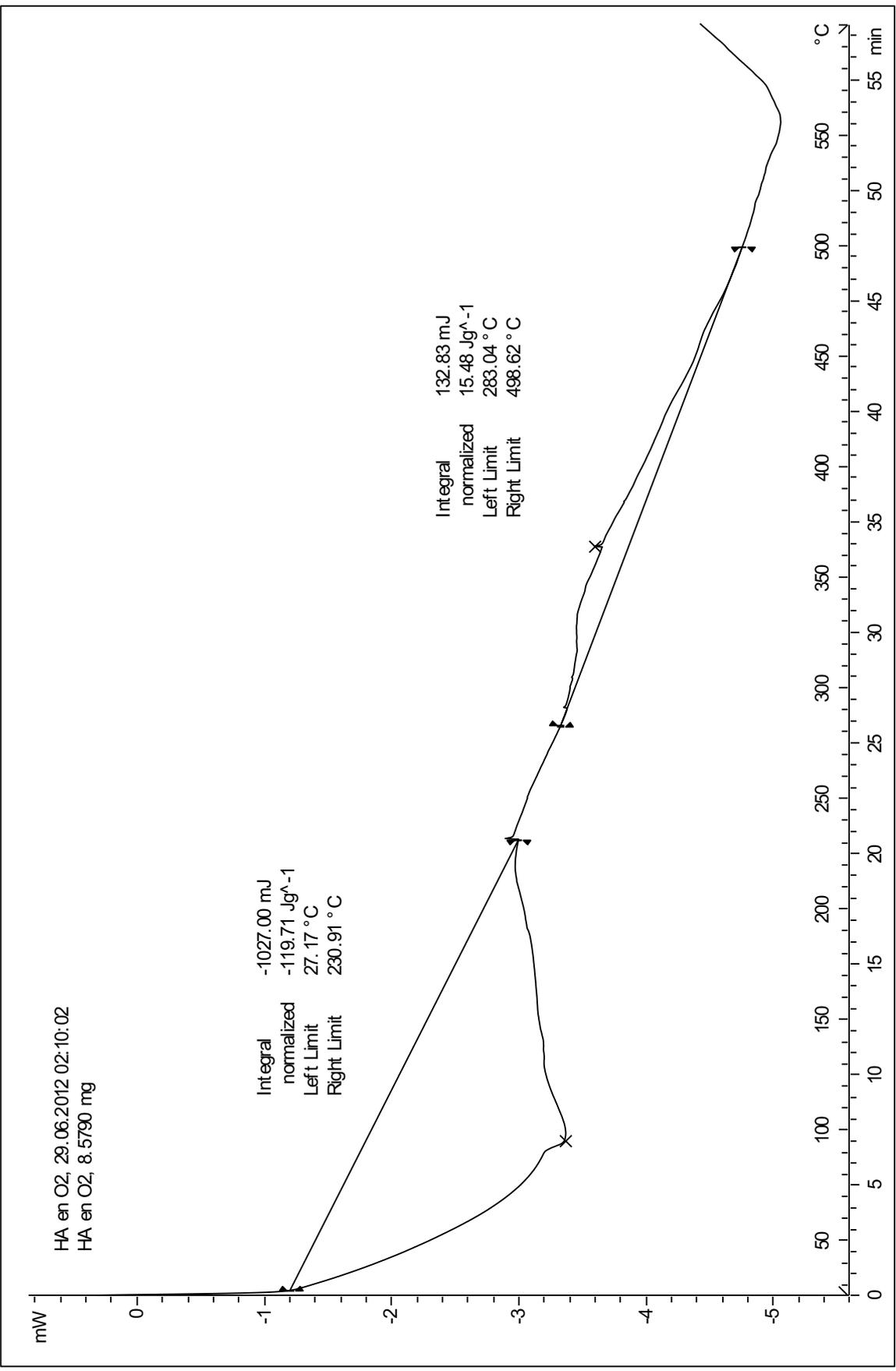
STAR^e SW 10.00



04.07.2012 11:05:45

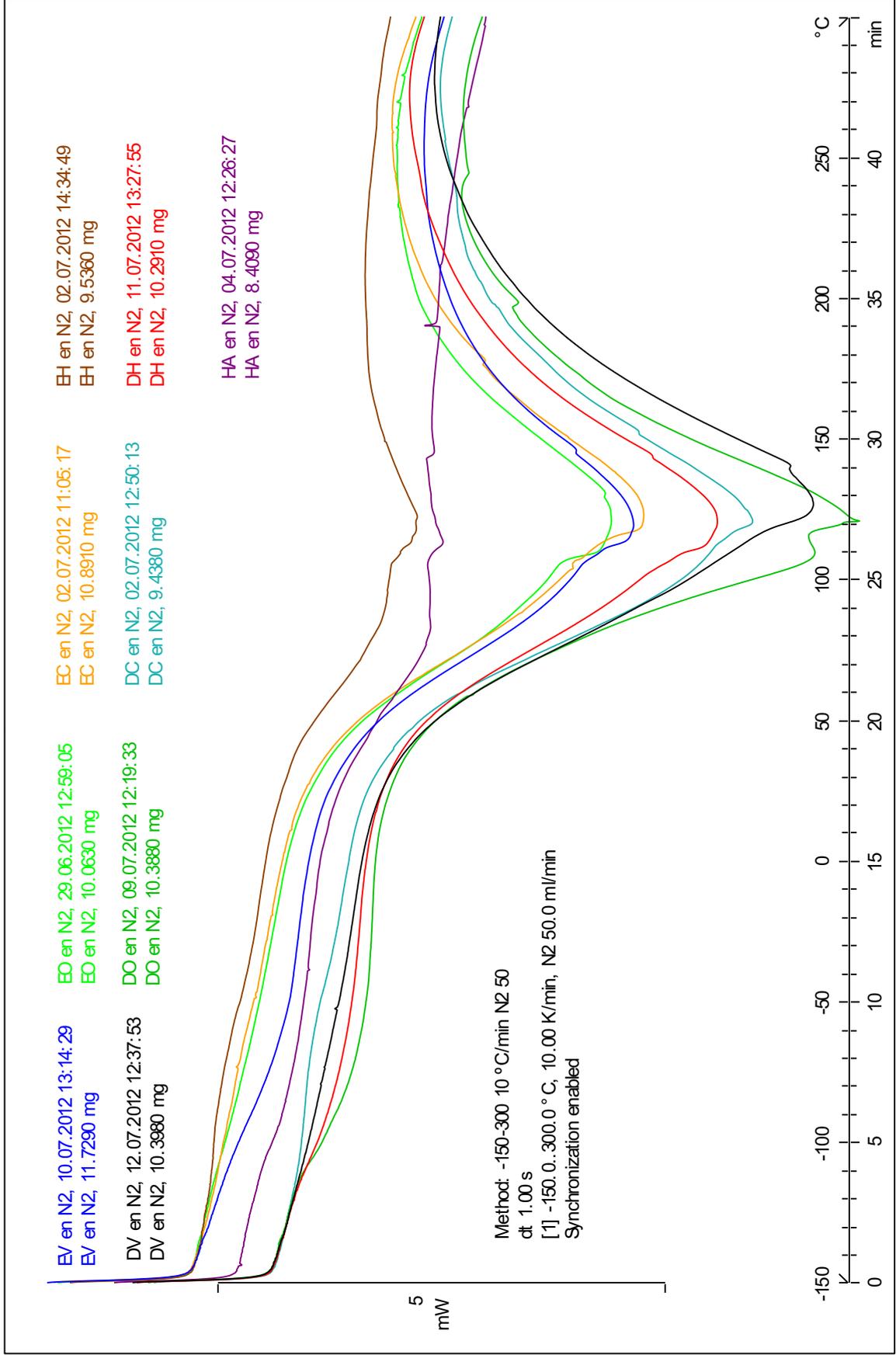
HA en O2

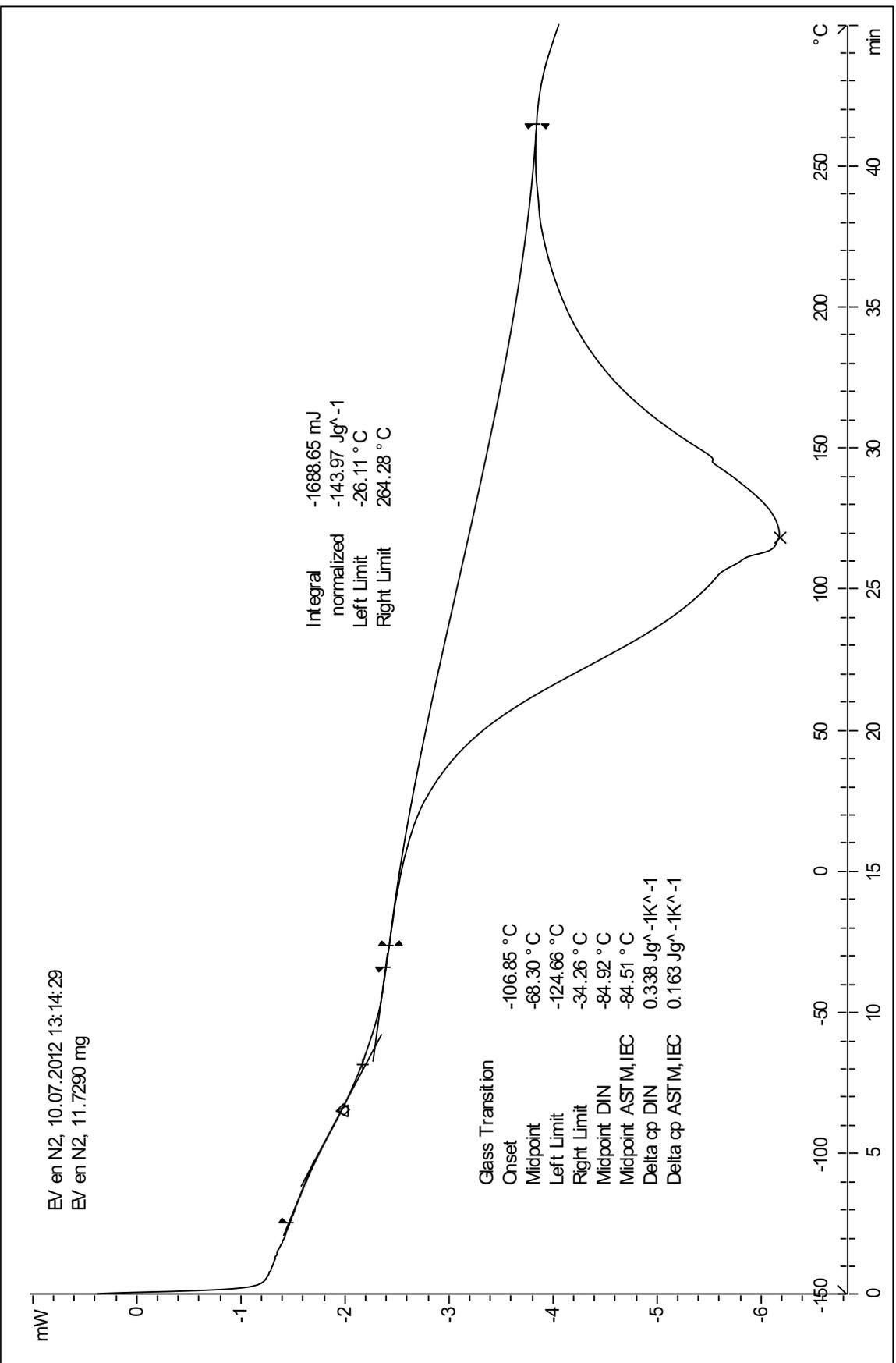
exo

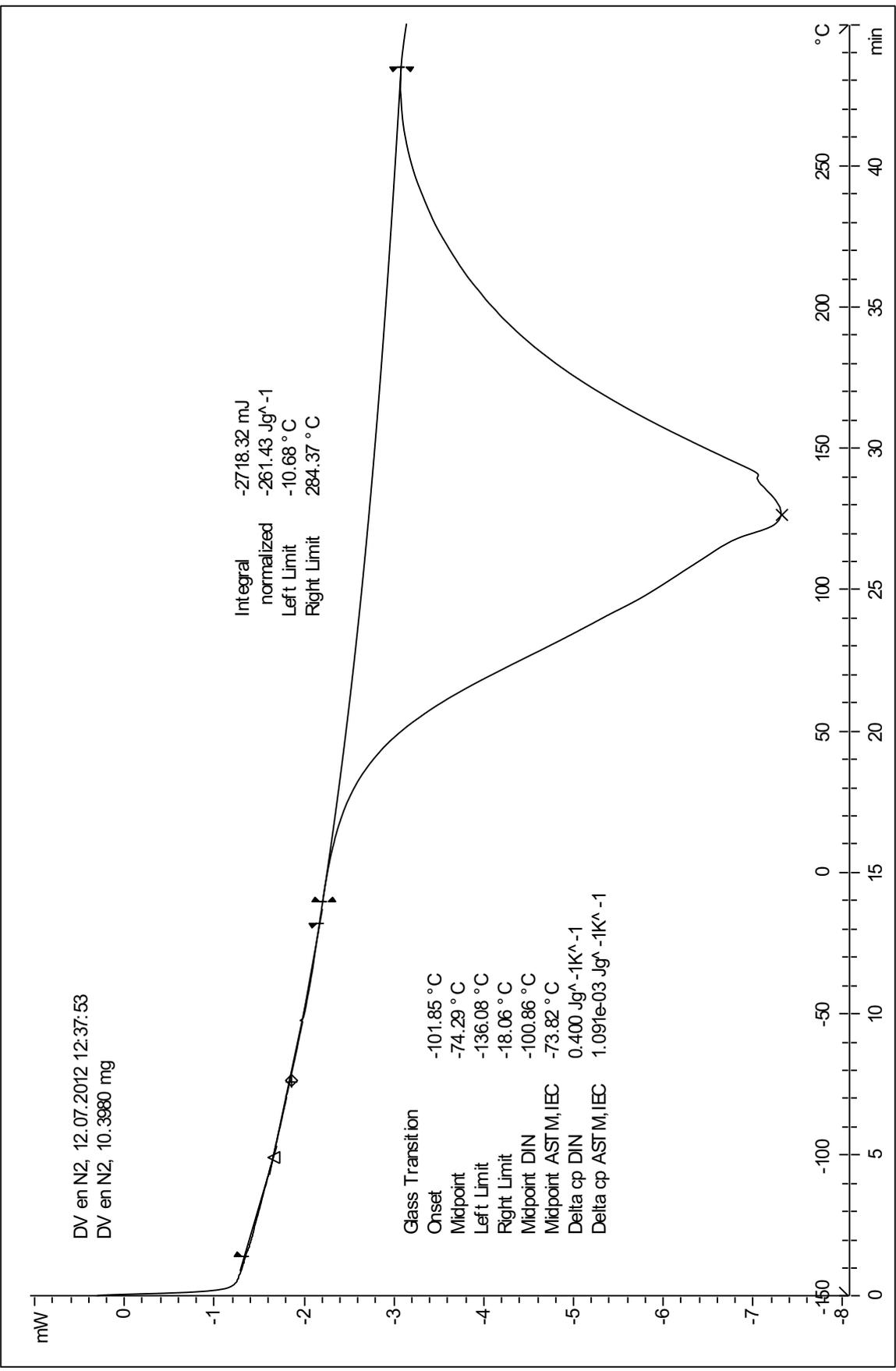


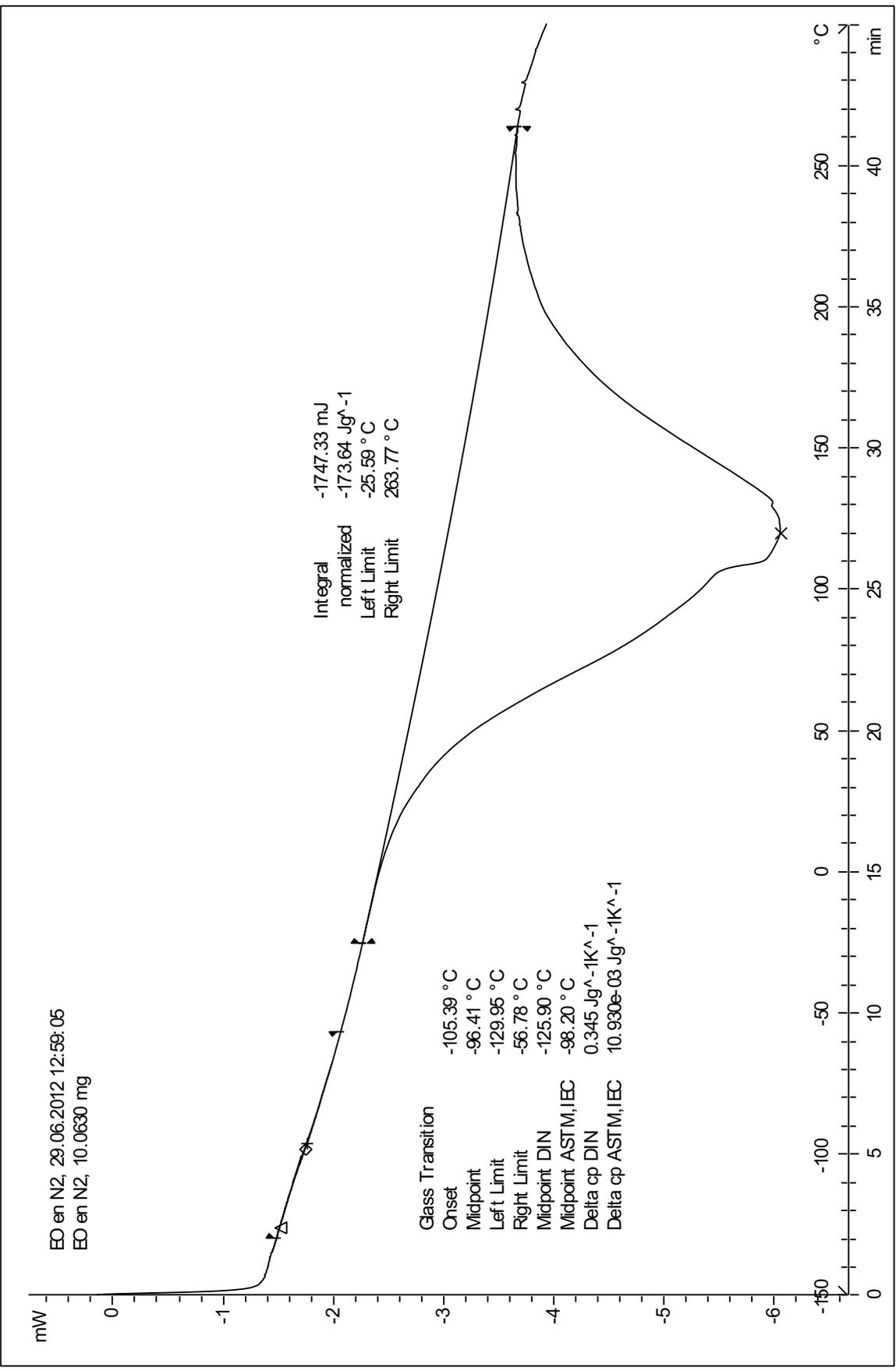
STAR^e SW 10.00

Lab: SAIT





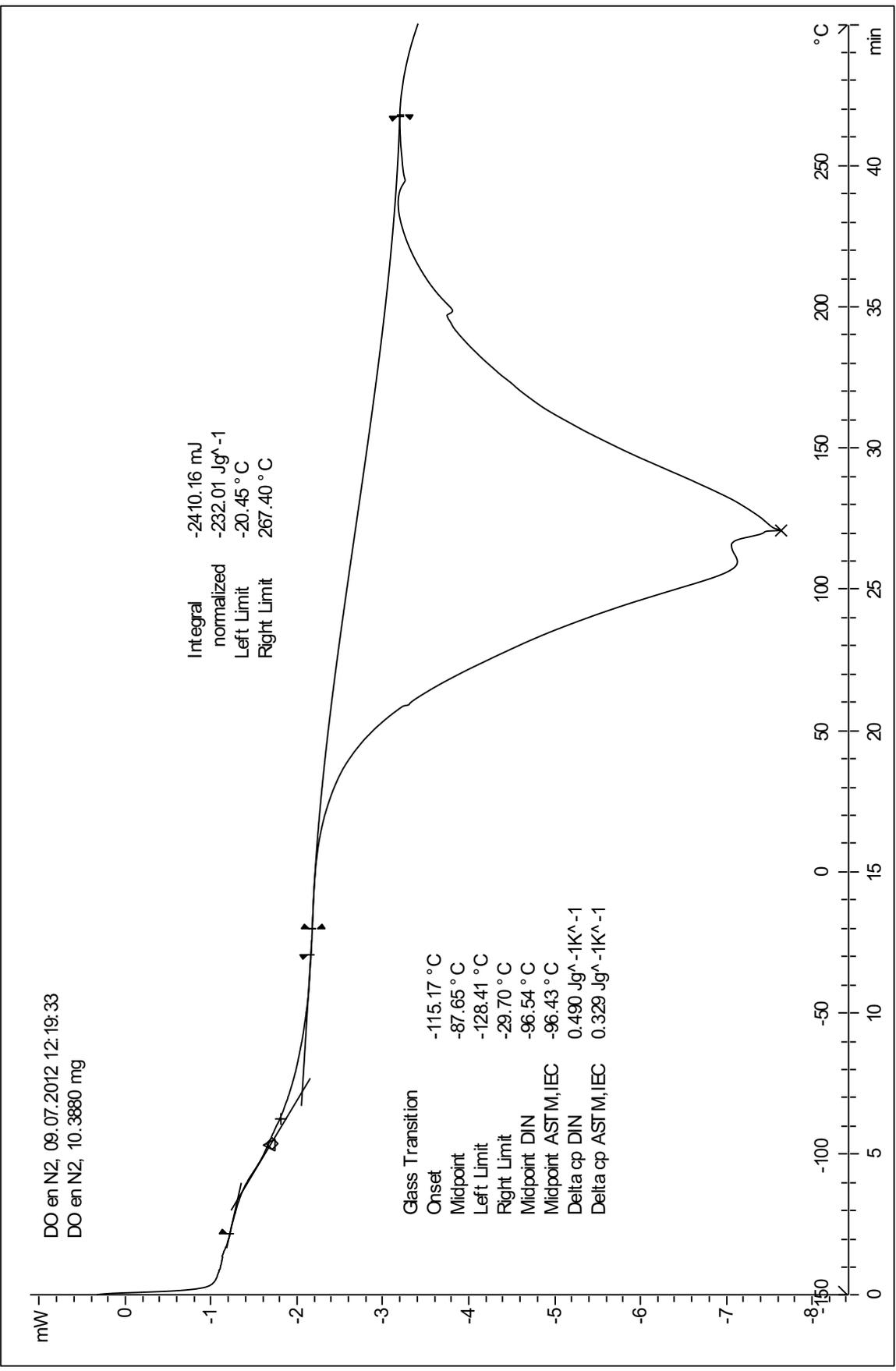




DO en N2 09.07.2012 13:57:27

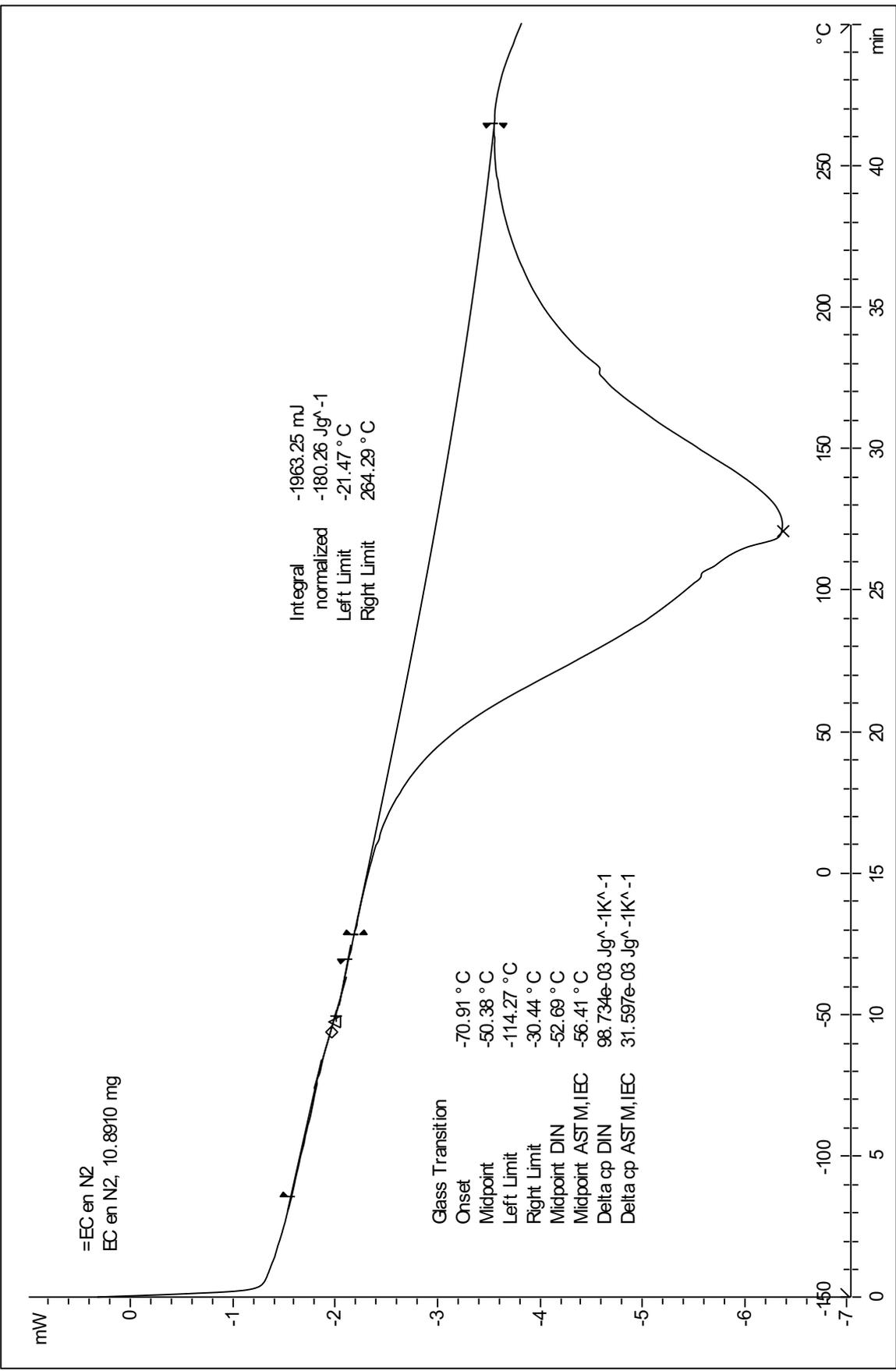
DO en N2

exo



STAR SW 10.00

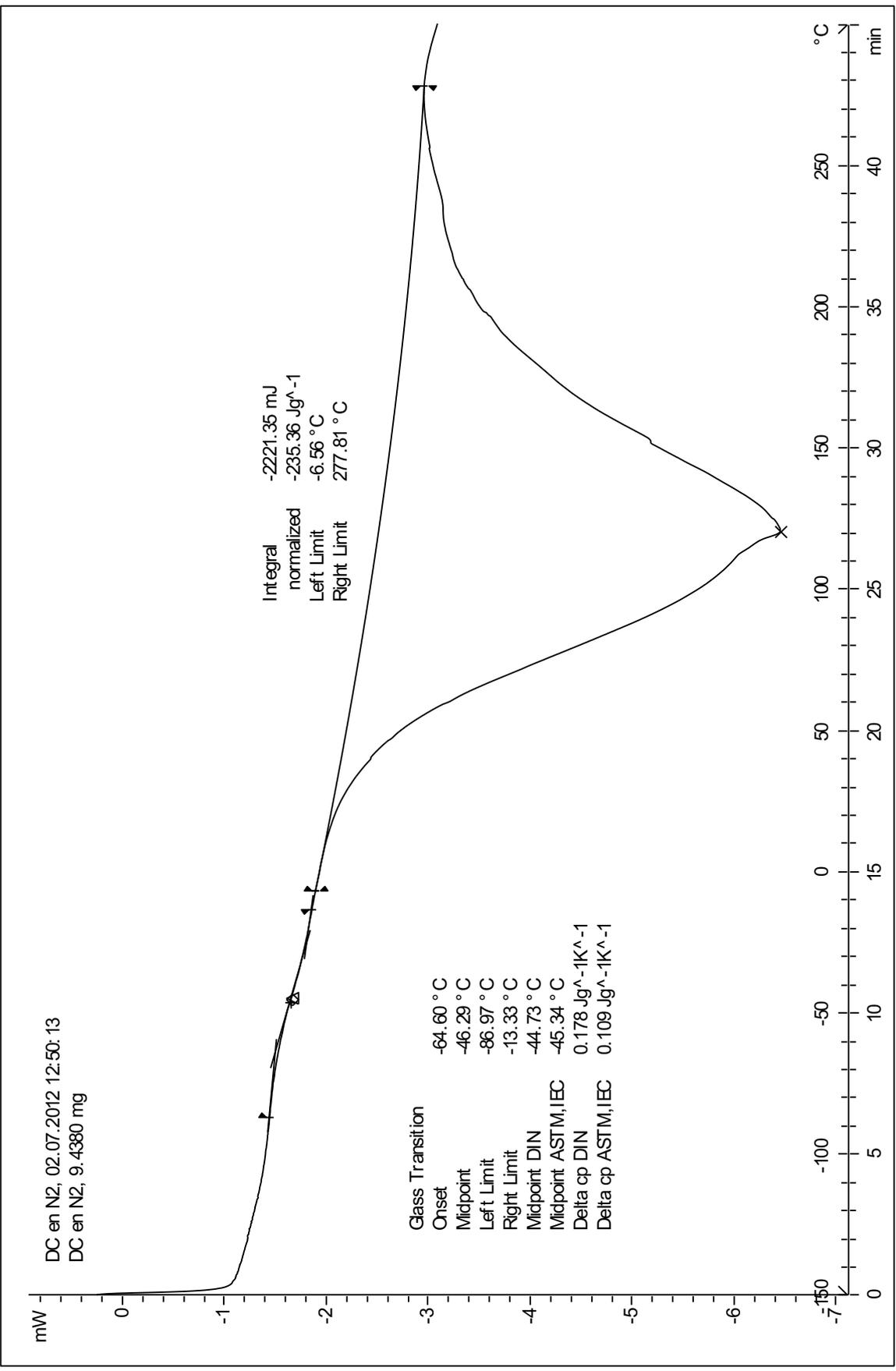
Lab: SAIT



05.07.2012 11:14:55

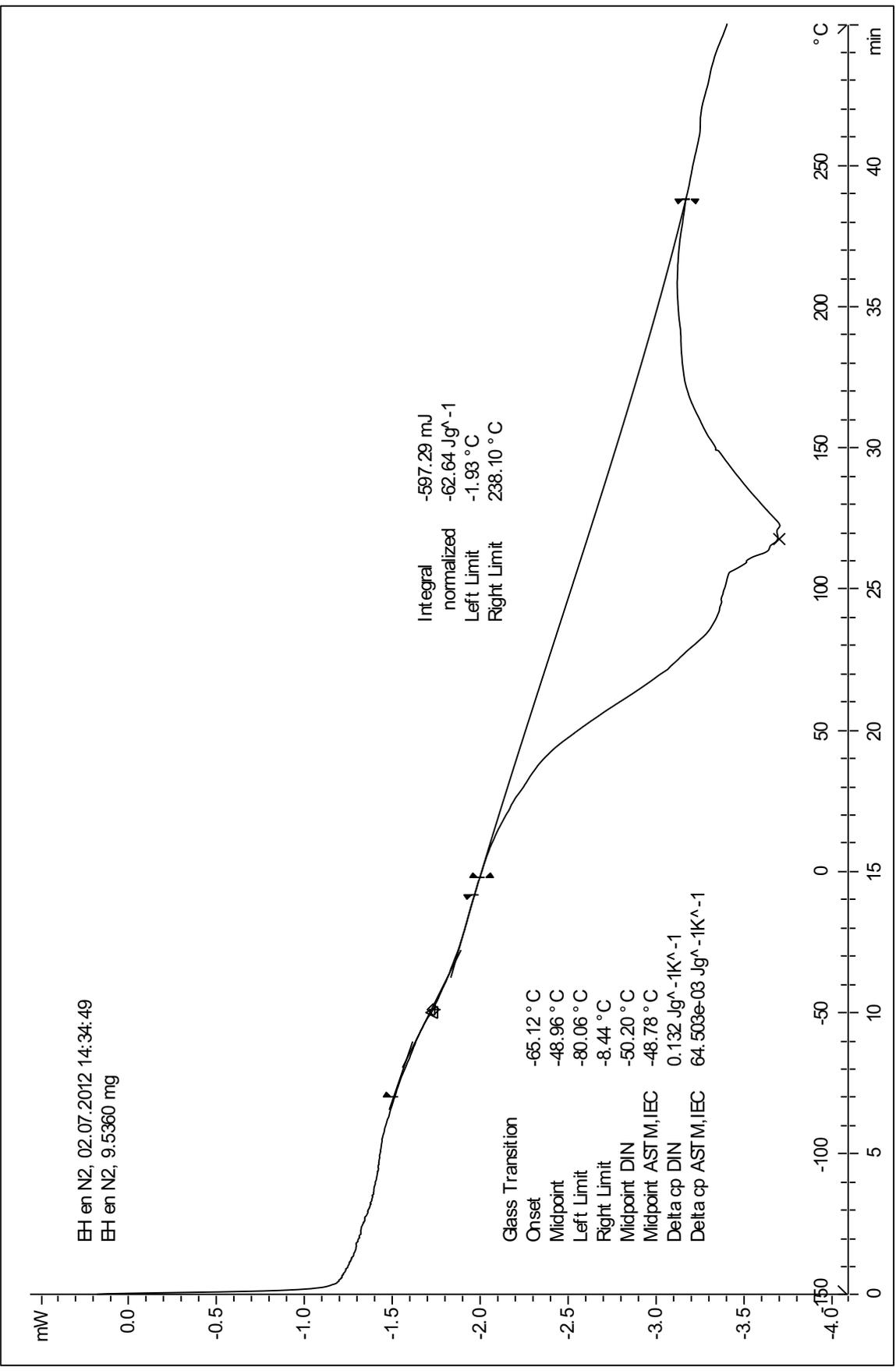
DC en N2

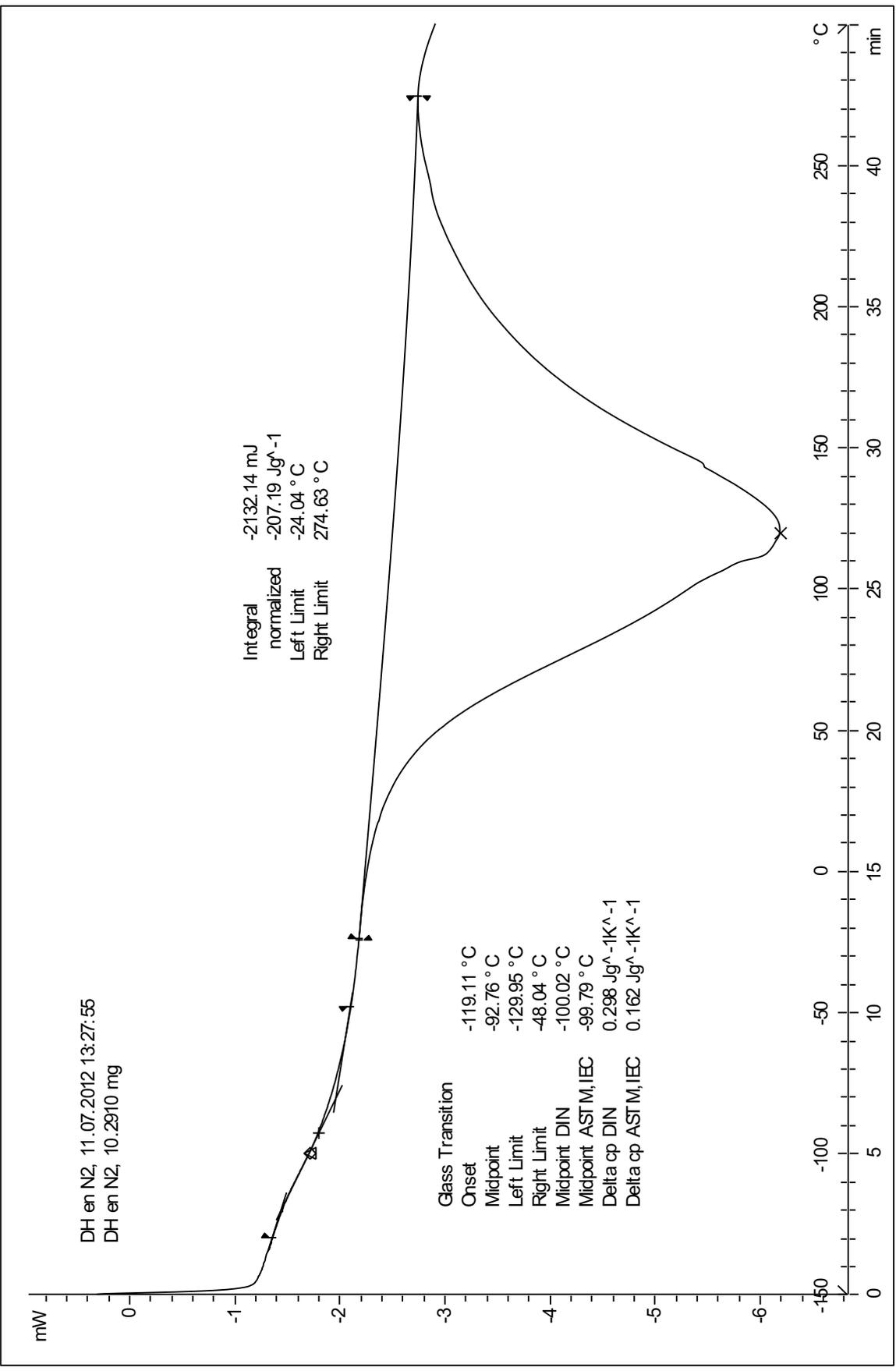
^exo

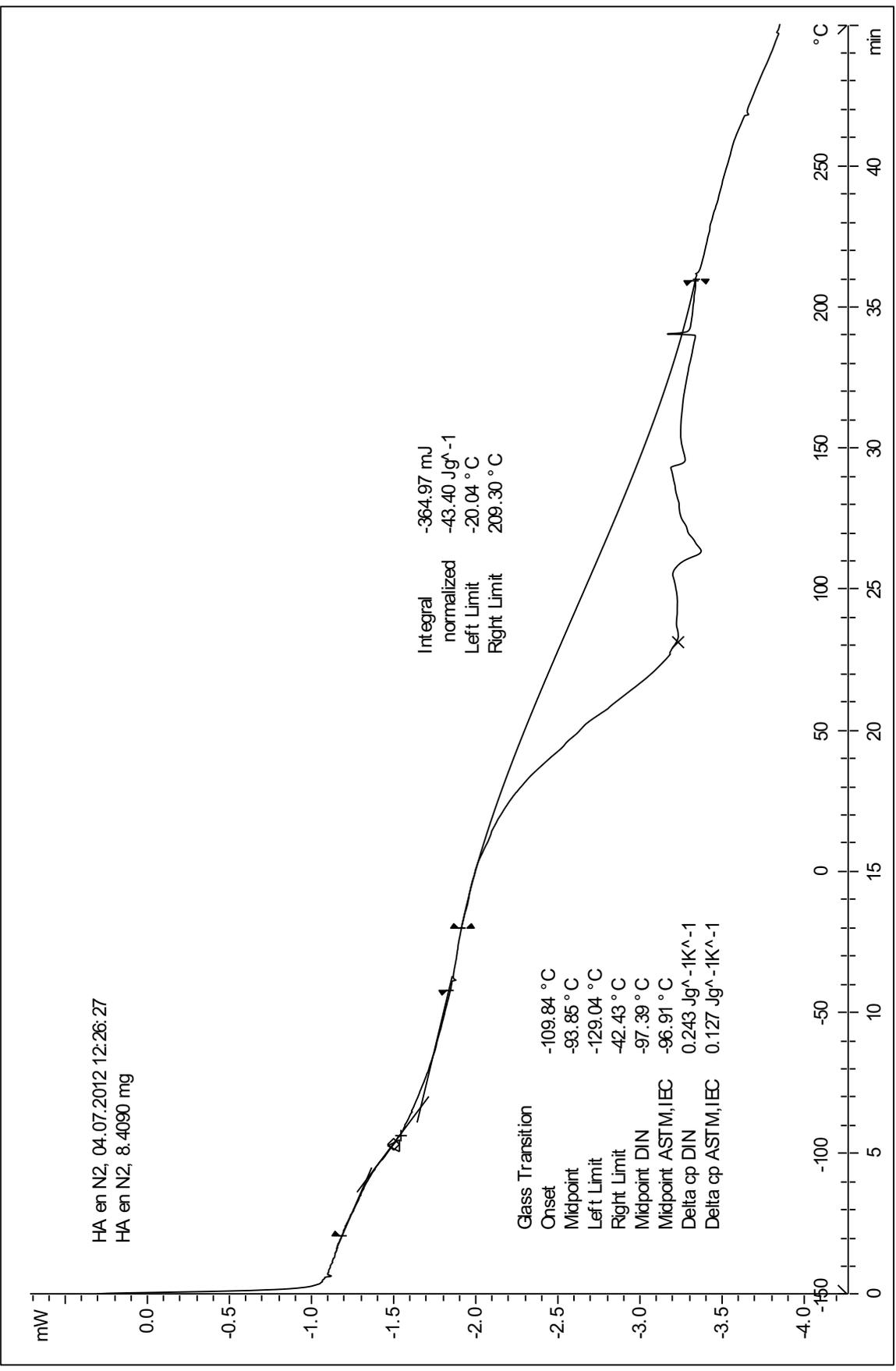


STAR® SW 10.00

Lab: SAIT







ANEXO V

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/aob>

Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth



Juan de Dios Teruel^a, Alberto Alcolea^b, Ana Hernández^a,
Antonio José Ortiz Ruiz^{a,*}

^a Department of Integral Pediatric Dentistry, Faculty of Medicine, University of Murcia, Hospital Morales Meseguer, 2ª planta, C/Marqués de los Vélez s/n, 30008 Murcia, Spain

^b Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202 Cartagena, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 31 January 2015

Keywords:

C/N analysis
TG-MS
WDXRF
Enamel
Dentine

ABSTRACT

Objective: The aim of this paper was to compare the chemical composition of human teeth with other mammal species that are likely candidates for replacing them in studies that test dental material.

Design: Dentine and enamel fragments extracted from 400 sound human, bovine, porcine and ovine – 100 teeth per species – incisors and molars were mechanically ground up to a final particle size of less than 100 μm. C/N analysis, thermogravimetric analysis coupled to mass spectrometry (TG-MS), and wavelength dispersive X-ray fluorescence (WDXRF) were used to analyse the samples' composition.

Results: Elemental analysis showed more organic carbon and nitrogen in dentine than in enamel. Human enamel was the most highly mineralised, with C and N values close to hydroxyapatite. Bovine dentine and enamel were the most similar to human. TG-MS: in all species, enamel contained less carbon and organic matter than dentine. Thermal decomposition of human enamel showed great similarity to synthetic hydroxyapatite, and large differences from bovine, ovine and porcine enamel. Thermal decomposition showed the greatest similarity between human and bovine dentine. WDXRF: Dentine contained larger quantities of Mg, S, Sr and Zn than enamel. Enamel contained larger quantities of P, Ca, Cl, Cu, K and Ca/P ratio than dentine. Human enamel and dentine contained a higher Ca/P ratio, larger quantities of Cl and Cu and lower quantities of Mg, S, Zn than the animal species.

Conclusions: Elemental analysis, TG-MS and WDXRF have shown that human and bovine enamel and dentine show the greatest similarity among the species analysed.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +34 868 88 85 81; fax: +34 868 88 85 76.

E-mail address: ajortiz@um.es (A.J.O. Ruiz).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.01.014>

0003-9969/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.