



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“EVALUACIÓN DE UNA PASTA
DENTAL EXPERIMENTAL A BASE DE
QUITOSANO Y NANO
HIDROXIAPATITA PARA LA
REMINERALIZACION DEL ESMALTE
DENTAL. ESTUDIO IN VITRO”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN ESTOMATOLOGÍA

VICTOR ABEL HUANAMBAL TIRAVANTI

LIMA - PERÚ

2024

ASESORA

Ph.D. Tay Chu Jon, Lidia Yileng

JURADO DE TESIS

DRA. ALEXANDRA MENA SERRANO

PRESIDENTE

DRA. TAMIRES BUENO

VOCAL

DRA. DIANA CASTILLO ANDAMAYO

SECRETARIA

DEDICATORIA.

A mi adorada Madre Itala por el amor que siempre me ha dado. A mi amada esposa Laura y mis queridos hijos Ceci y Beto, por hacerme sentir siempre amado, orgulloso de mi familia y por motivarme a ser mejor cada día.

AGRADECIMIENTOS.

A mi Alma Mater y segundo hogar, la Universidad Peruana Cayetano Heredia por la oportunidad para realizar los estudios del Doctorado en Estomatología y a todas las personas, laboratorios de la UPOCH y otras instituciones que de una u otra forma participaron y contribuyeron en las diferentes etapas del proceso para la realización de esta tesis.

Un especial agradecimiento a mi asesora Dra. Lidia Yileng Tay Chu Jon, por su invaluable apoyo, por compartir sus conocimientos, su acertada orientación, su esfuerzo, paciencia y dedicación para el desarrollo de la tesis. Al Dr. John Alexis Domínguez por su orientación en la formulación de las pastas dentales utilizadas en el proyecto; al Dr. José Castañeda por su compromiso y apoyo constante con la investigación en particular en el procesamiento de muestras para la evaluación Raman y el análisis de resultados, al Dr Juan Carlos Medina y al MSc. Augusto Huiza, por su orientación y apoyo en la formulación del compuesto quitosano/nanohidroxiapatita. Al Mg. Clemente Luyo Caycho, por su apoyo en la caracterización del compuesto quitosano/nanohidroxiapatita.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Tesis Autofinanciada.

DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	15	ABRIL	2024
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	HUANAMBAL TIRAVANTI VICTOR ABEL		
PROGRAMA DE POSGRADO	DOCTORADO EN ESTOMATOLOGÍA		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	2003		
TITULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	“EVALUACIÓN DE UNA PASTA DENTAL EXPERIMENTAL A BASE DE QUITOSANO Y NANO HIDROXIAPATITA PARA LA REMINERALIZACION DEL ESMALTE DENTAL. ESTUDIO IN VITRO”		
MODALIDAD DE TRABAJO DE GRADO	Tesis		
Declaración del Autor El presente Trabajo de Grado es original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	997425342		
E-mail	victor.huanambal@upch.pe		


VÍCTOR ABEL HUANAMBAL TIRAVANTI
 DNI 10550012

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	OBJETIVO.....	5
II.1	Objetivo general	5
II.2	Objetivo específico	5
III.	HIPÓTESIS.....	7
IV.	MARCO TEÓRICO.....	8
IV.1	Esmalte Dental.....	13
IV.2	Erosión dental	14
IV.3	Proceso de desmineralización y remineralización del esmalte	15
IV.4	Hidroxiapatita	16
IV.5	Quitano	17
IV.6	Nano hidroxiapatita/Quitano	19
IV.7	Pastas dentales o dentífricos	21
IV.8	Dientes de bovino como sustituto de dientes humanos para estudios in vitro del esmalte dental.	26
IV.9	Microscopía Raman	27
IV.10	Microdureza superficial Vickers.....	27
V.	METOTODOLOGÍA.....	28
V.1	Diseño del estudio	28
V.2	Muestra.....	30
V.3	Criterios de selección	30
V.4	Variables.....	30
V.4.1	Variables Dependientes.....	31
V.4.2	Variables Independientes:	31
V.5	Técnicas y procedimientos	33
V.5.1	Obtención y caracterización del compuesto NanoHidroxiapatita/Quitano (nHA/Q).....	33
V.5.2	Obtención del Quitano.....	35

V.5.3	Obtención y caracterización de la NanoHidroxiapatita	35
V.5.4	Elaboración de Pasta Dental Base.....	35
V.5.5	Preparación de las muestras	38
V.5.6	Ciclo erosivo	39
V.5.7	Evaluación del grado de mineralización con Microscopia Raman Confocal.	40
V.5.8	Evaluación de la Microdureza superficial.....	41
V.5.9	Plan de análisis.....	41
V.5.10	Consideraciones éticas.	42
VI.	RESULTADOS.....	43
VII.	DISCUSIÓN	50
VIII.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
VIII.1	Conclusiones.....	58
VIII.2	Recomendaciones	58
IX.	REFERENCIAS	60

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

MEB	:	Microscopia electrónica de barrido.
RAMAN	:	Espectroscopia raman confocal.
AFM	:	Microscopía de fuerza atómica.
CMC	:	Carboximetilcelulosa.
mm	:	Milímetros.
rpm	:	Revoluciones por minuto.
ml	:	Mililitros.
mm	:	Micrómetros.
nm	:	Nanómetros.
HAP	:	Hidroxiapatita.
nHAP	:	Nanohidroxiapatita.
Fig.	:	Figura.
°C	:	Grados Celsius.
pH	:	Potencial de hidrógeno.
siC	:	Carburo de Silicio.
Tp	:	Tamaño de partícula.
FTIR-ATR	:	Espectroscopia infrarroja transformada de fourier.

Kv : Kilovoltio.

Q : Quitosano,

nHAP/Q : Nanohidroxiapatita y quitosano,

Knoop : Rango de dureza

WSL : Lesiones de mancha blanca

RDA : Relative Dentine Abrasivity

CPP-ACP : Fosfopéptido de caseína - fosfato de calcio amorfo

CPP-ACFP : Fosfato de fluoruro de calcio amorfo con fosfopéptido de caseína

PDB : Pasta dental base

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto remineralizante de una pasta dental experimental a base de nanohidroxiapatita y quitosano (nHAP/Q), como alternativa para favorecer la remineralización del esmalte dental bovino erosionado. Se evaluó el grado de mineralización mediante microscopia RAMAN y la microdureza superficial con Vickers. Se formuló una pasta dental base (PDB) que actuó como vehículo para los agentes remineralizantes en experimentación. Se elaboraron las siguientes pastas experimentales: PDB 80% + nHAP 10% + Quitosano 10%. (Grupo 1), PDB 90.%+ nHAp Concha de Abanico 10% (Grupo 2), PDB 90% + Quitosano 10%. (Grupo 3), PDB 90%+ nHAp comercial 10% (Grupo 4). Se establecieron como controles positivos 2 pastas dentales comerciales fluoradas de demostrada actividad remineralizante: Colgate total (Grupo 5) y Mi paste plus (Grupo 6). Se establecieron además los siguientes controles: PDB 100% (Grupo 7), Control ciclo erosivo, no pastas, conservación en saliva artificial (Grupo 8), Control no ciclo erosivo, no pastas (Grupo 9), Control ciclo erosivo, no pastas, conservación agua destilada (Grupo 10). Se establecieron 10 grupos de estudio con 10 muestras de esmalte de bovino cada uno, todos los especímenes de los grupos excepto del grupo 9 recibieron ataques con ácido cítrico al 0.5 % durante 2 min a las 0, 8, 24 y 32 horas. Después de cada ataque ácido, se aplicó las pastas de dientes correspondientes a cada grupo de tratamiento, excepto los grupos control 8, 9 y 10. Luego se procedió a evaluar el grado de mineralización mediante microscopia RAMAN y la microdureza superficial con Vickers. No encontramos diferencias significativas ($p>0.05$) en el grado de mineralización y Dureza superficial en el esmalte dental bovino, entre las diferentes pastas, las muestras de esmalte sano

(grupo 9) a las que no se les realizó ataque ácido ni ningún tratamiento, ni las muestras del grupo 8 que recibieron el ataque ácido y fueron conservadas en saliva artificial. Pero si todas ellas, tienen diferencias significativas ($p < 0.05$) con el grupo 10 que fue sometido a ciclo erosivo y conservado en agua destilada. Este estudio in vitro muestra que la pasta experimental a base de nanohidroxiapatita y quitosano, tiene potencial remineralizante en el esmalte bovino erosionado.

PALABRAS CLAVE

Hidroxiapatita, pastas de dientes, quitosano, remineralización dental, esmalte dental, erosión de los dientes. (DECS)

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the remineralizing effect of AN experimental toothpaste based on nanohydroxyapatite and chitosan (nHAP/Q), as an alternative to promote the remineralization of eroded bovine tooth enamel. The degree of mineralization was evaluated using RAMAN microscopy and the surface microhardness with Vickers. A base toothpaste (PDB) was formulated that acted as a vehicle for the remineralizing agents under experimentation. The following experimental pastes were prepared: PDB 80% + nHAp 10% + Chitosan 10% (Group 1), PDB 90%+ nHAp Argopten purpuratus Shell 10% (Group 2), PDB 90% + Chitosan 10% (Group 3), PDB 90%+ commercial nHAp 10% (Group 4). Two fluorinated commercial toothpastes with proven remineralizing activity were established as positive controls: Colgate total® (Group 5) and MI Paste Plus™ (Group 6). The following controls were also established: PDB 100% (Group 7), erosive cycle control, without pastes, and conserved in artificial saliva (Group 8), non-erosive cycle control, without pastes (Group 9), erosive cycle control, without pastes, conserved in distilled water (Group 10). 10 study groups were established with 10 bovine enamel samples each, all the specimens of all the groups except Group 9 received attacks with 0.5% citric acid for 2 min at 0, 8, 24 and 32 hours. After each acid attack, the toothpastes corresponding to each treatment group were applied, except for control groups 8, 9 and 10. The degree of mineralization was then evaluated using RAMAN microscopy and surface microhardness with Vickers. No significant differences ($p>0.05$) were found in the intensity of the phosphate ion using Raman v1, nor in the Vickers Hardness (kg/mm²) of bovine enamel, between the different pastes, the healthy enamel samples (group 9) to

which no acid attack or any treatment was carried out, nor the samples from group 8 that received the acid attack and were preserved in artificial saliva. But all of them have significant differences ($p < 0.05$) with group 10 that was subjected to an erosive cycle and preserved in distilled water. This in vitro study shows that, the experimental pastes based on nanohydroxyapatite and chitosan, has a potential remineralizing effect on eroded bovine tooth enamel.

KEY WORDS

Durapatite, toothpastes, chitosan, tooth remineralization, dental enamel, tooth erosion. (MESH).

I. INTRODUCCIÓN

La erosión dental es un proceso patológico caracterizado por la pérdida química de la sustancia mineralizada del diente causada por la exposición a ácidos no derivados de bacterias orales (1), La erosión es un trastorno al que contribuyen propiedades tales como las características estructurales del diente, las propiedades fisiológicas de la saliva y las fuentes y hábitos ácidos extrínsecos o intrínsecos (2, 3). Entre los factores intrínsecos observamos el reflujo de ácidos gástricos, vómito recurrente o regurgitación como causas importantes de erosión dental en pacientes quienes padecen estas enfermedades o signos. Por otro lado, en los factores extrínsecos se ha reportado la ingesta de bebidas carbonatadas, y el consumo de otro tipo de alimentos con contenido de ácido cítrico, o bebidas alcohólicas (4).

La erosión dental es un problema de salud pública común en las sociedades modernas debido al aumento del consumo de bebidas ácidas, como los refrescos, las bebidas deportivas y los jugos de frutas, todos estos con un alto potencial desmineralizante. Los cambios en la dieta y la higiene bucal inadecuada han hecho que la erosión del esmalte sea cada vez más frecuente, especialmente entre los jóvenes y los niños (5, 6).

El esmalte es el tejido mineralizado más externo que cubre la corona anatómica del diente y es el primero en recibir el impacto de los ácidos que provocan la erosión.

Los factores biológicos y químicos en el entorno del esmalte influyen en la erosión. La saliva proporciona efectos protectores al neutralizar y eliminar los

ácidos dietéticos, al mismo tiempo que es una fuente de iones inorgánicos necesarios para el proceso de remineralización (7-10).

La pérdida de sustancia por erosión es un proceso cíclico y dinámico con periodos de desmineralización y remineralización (11). Cuando el nivel del pH desciende por debajo del pH crítico de la hidroxiapatita adamantina, 5.5; los cristales se disocian y tienden a difundirse hacia el medio externo, produciéndose la desmineralización. Este fenómeno no ocurre de manera incesante, ya que por acción buffer de la saliva el pH se estabiliza, logrando incorporarse nuevos cristales en la superficie dentaria, provocando así la remineralización. Este proceso dura aproximadamente 20 minutos en completarse (8).

Para prevenir, mitigar y subsanar los efectos de la erosión dental, se han desarrollado múltiples técnicas de remineralización del tejido dental afectado, reconstruyendo la morfología superficial del esmalte (12, 13).

Si bien la remineralización mediada por flúor es la piedra angular de las filosofías actuales del manejo de la caries, se han comercializado o se están desarrollando nuevas estrategias que afirman promover una remineralización más profunda de las lesiones, reducir los riesgos potenciales asociados con los productos de cuidado oral con alto contenido de flúor, y facilitar el control de la caries durante toda la vida. Estos sistemas remineralizantes sin flúor pueden clasificarse en tecnologías regenerativas de esmalte biomimético y los enfoques que reparan las lesiones de caries al mejorar la eficacia del fluoruro (14, 15)

En el mercado, encontramos principalmente pastas dentales con flúor, pero también hay productos dentales remineralizantes sin flúor (16). Actualmente, la

mayoría de los sistemas remineralizantes sin fluoruro disponibles comercialmente están destinados a mejorar la eficacia del fluoruro, minimizando los potenciales riesgos asociados con el flúor. Estas formulaciones son una alternativa prometedora pero es necesario investigar y caracterizar sus capacidades remineralizantes. Estos estudios son especialmente necesarios para los productos que ya están en el mercado como la nanohidroxiapatita (nHA), fosfopéptido de caseína - fosfato de calcio amorfo CPP-ACP, fosfato tricálcico, fosfosilicato de calcio y sodio, fosfatos de calcio amorfo (ACP), polifosfatos, trimetafosfato de sodio (17-22)

El uso de nanohidroxiapatita (nHA) como agente remineralizante en pastas dentales está en aumento (23-27). De otro lado, la nHA, está siendo estudiada en asociación con quitosano (Q) (28, 29). El quitosano es un derivado del polímero natural quitina; una sustancia biocompatible, biodegradable y con propiedad antimicrobiana (30-39). por lo que una pasta dental con nHA asociada a Quitosano podría potenciar el efecto remineralizante, lo que se manifiesta en el interés de los investigadores por estudiar esta asociación. (40-47).

Las pastas dentales, o dentífricos, son uno de los vehículos más populares de aplicación de agentes remineralizantes (5, 48, 49). Por lo general, estas contienen una amplia gama de componentes (abrasivos, humectantes, conservantes, agentes espesantes o aglutinantes, detergentes, agentes aromatizantes y agentes terapéuticos) y se pueden clasificar como terapéuticas y no terapéuticas (50). Este proyecto centró su atención en el desarrollo y evaluación del efecto remineralizante de una pasta dental que facilite la sinergia del quitosano y la nHA. en particular aquella obtenida de la caparazón de la concha de abanico.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto remineralizante de una pasta dental experimental a base de quitosano y nanopartículas de hidroxiapatita en esmalte dental erosionado.

El presente estudio pretende responder la siguiente pregunta de investigación:
¿La Pasta dental con nanohidroxiapatita/quitosano 50/50 es una buena alternativa para remineralizar el esmalte dental erosionado?

II. OBJETIVO

II.1 Objetivo general

Evaluar el efecto remineralizante de una pasta dental experimental a base de quitosano y nanopartículas de hidroxiapatita en esmalte dental bovino erosionado.

II.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar el compuesto quitosano- nanohidroxiapatita
2. Evaluar el efecto remineralizante de la pasta dental con quitosano-nHA 50:50, al 20% sobre esmalte dental bovino, a través del grado de mineralización y la microdureza superficial.
3. Evaluar el efecto remineralizante de la pasta dental con nHA al 10% obtenida del caparazón de la concha de abanico, sobre esmalte dental bovino, a través del grado de mineralización y la microdureza superficial.
4. Evaluar el efecto remineralizante de la pasta dental con quitosano al 10% sobre esmalte dental bovino, a través del grado de mineralización y la microdureza superficial.
5. Evaluar el efecto remineralizante de la pasta dental con nHA comercial al 10% sobre esmalte dental bovino, a través del grado de mineralización y la microdureza superficial.
6. Comparar el efecto remineralizante sobre esmalte dental bovino erosionado, de cada una de las nuevas formulaciones de pasta dental con las pastas dentales comerciales a base de flúor (Colgate Total® (Colgate

Palmolive S.A) y CPP-ACP (MI Paste PlusTM, fosfopéptido de caseína
- fosfato de calcio amorfo fluorado CPP-ACPF).

III. HIPÓTESIS

Hi: La Pasta dental experimental con nanohidroxiapatita y quitosano tiene efecto remineralizante sobre la superficie del esmalte bovino erosionado, tanto en el grado de mineralización como en la microdureza superficial.

IV. MARCO TEÓRICO

Desde hace mucho tiempo se han realizado estudios para comprender el proceso de desmineralización y remineralización del esmalte dental cuyo equilibrio es particularmente importante en 2 patologías dentales altamente prevalentes como son la caries dental y la erosión dentaria.

Igualmente se han estudiado agentes remineralizantes y vehículos que permiten trasladar estos agentes remineralizantes para ubicarlos en contacto con el esmalte dental. Uno de los vehículos más utilizados es la pasta dental.

Entre los nuevos materiales capaces de remineralizar el esmalte dental se encuentran los nanomateriales como la nanohidroxiapatita, que tiene una mayor solubilidad, mejor biocompatibilidad y mayor energía superficial (51). Esto es posible gracias a la liberación de partículas de hidroxiapatita a nivel de los prismas del esmalte y los túbulos dentinarios, por ello las pastas de dientes que contiene nanohidroxiapatita se utiliza para tratamiento de lesiones de mancha blanca (WSL) (52,53).

Badiee y col. en un estudio realizado in vivo con un seguimiento de 6 meses confirmó el excelente rendimiento de la pasta de dientes que contenía nanohidroxiapatita., reportó mejores resultados que la pasta de dientes que contiene solo fluoruro en WSL (54). Ello corrobora lo encontrado por Pepla, quien encontró que la nanohidroxiapatita ejerce un impacto remineralizante significativamente mayor que los fluoruros comúnmente utilizados en las lesiones tempranas del esmalte (55).

Los productos más utilizados y conocidos en la práctica clínica para la remineralización de WSL incluyen tanto productos basados en fluoruro como tecnologías basadas en caseinfosfopéptido- complejos de fosfato de calcio amorfo estabilizado (CPP-CP) (56). CPP-ACP es una sustancia bioactiva de caseína que puede regular el calcio sobresaturado y iones de fósforo en el ambiente bucal. Cuando el pH de la cavidad bucal cae, el fósforo. Los iones estabilizan el pH, mientras que los iones de calcio inducen el proceso de remineralización (57).

Entre las principales capacidades del CPP-ACP se encuentra la de aumentar la permeabilidad del fluoruro iones. Por lo tanto, la capacidad de los iones fluoruro para alcanzar lesiones más profundas permite una mejor efectos remineralizantes que se deben lograr (58).

Con el ánimo de mejorar el efecto de los agentes remineralizantes, los investigadores vienen probando combinaciones de agentes remineralizantes Así por ejemplo, el estudio por Al-Batayneh et al. Descubrió que la combinación de GC Tooth Mousse y pasta de dientes con 500 ppm de fluoruro no proporcionaron mayores beneficios que el uso aislado de los dos agentes (59).

El uso de MI Paste Plus (fosfopéptido de caseína-fluoruro de calcio amorfo a base de fosfato agente, CPP-ACFP) tampoco logró una mejora real en los WSL en pacientes post-ortodoncia después de 1 año de uso (60).

Hamdi et al. concluyó que una aplicación de CPP-ACP y silicato tricálcico (TCS)- con una aplicación de 2 veces al día logran efectos remineralizantes satisfactorios (61) encuentra que el área de WSL disminuyó significativamente en los grupos MI Paste Plus (65%) y Remin Pro (60%) durante el transcurso del

experimento, respecto del grupo control. Este hallazgo sugiere que MI Paste Plus y Remin Pro pueden minimizar con éxito el grado de WSL durante un período de tratamiento de tres meses mediante la remineralización de la caries del esmalte.

Se cree que MI Paste Plus puede mantener la superficie del esmalte saturada con calcio y fosfato. Además, el componente de fluoruro de MI Paste Plus mejora la capacidad remineralizante de CPP-ACP trabajando en conjunto con él (62-66).

Malcangi y col. realizan una revisión sistemática Después de revisar los estudios, concluyen que el agente remineralizante basado en CPP-ACP constituye el estándar en la práctica clínica, especialmente cuando se combinan con agentes que contienen fluoruro. Sin embargo, dada la desigualdad y heterogeneidad de los estudios analizados, no es posible establecer la superioridad de un agente remineralizante sobre otro (67)

Katarzyna Grocholewicz, (68) en un Ensayo clínico Randomizado , realizado en 92 pacientes con lesiones estudia los efectos de la Nanohidroxiapatita en gel, la terapia de Ozono y una combinación de los dos métodos, sobre la caries dental inicial interproximal, concluyendo que la combinación de ambos métodos produce el mejor efecto.

O. B. Al-Batayneh, (69) en un Ensayo clínico Randomizado realizado en 114 niños, con lesiones iniciales de esmalte, utilizaron un dentífrico fluorado (500ppm) fluoride, crema de CPP-ACP, se comparan las lesiones a los 3 y 6 meses y concluyen que el uso de ambos agentes no dio una ventaja adicional de cada uno individualmente.

Mohammadreza Badiie, (59) en un Ensayo clínico Randomizado realizado en 50 pacientes con manchas blancas después del tratamiento ortodóntico. Comparan los efectos de la pasta dental con nanohidroxiapatita respecto de una pasta dental con fluoruro y le realizan un seguimiento de 1, 3 y 6 meses. Concluyen que la pasta dental con nanohidroxiapatita es mejor que la otra conteniendo fluor.

Lelli y col. realizaron un estudio In vivo donde querían comprobar la efectividad de dos tipos de pastas en efectos de remineralización y reparación de la superficie (20) del esmalte, una pasta de dientes a base de nanocristales de hidroxiapatita de carbonato de Zinc - CHA (grupo experimental) y una pasta de dientes de nitrato de potasio / fluoruro de sodio (grupo de control activo) durante 8 semanas. La evaluación por medio de microscopía electrónica de barrido, no mostró ninguna deposición sobre las superficies del esmalte después del tratamiento con el fluoruro y las pastas de dientes con KNO₃ / NaF pero sí la sustitución parcial de los grupos hidroxilo con iones fluoruro en la hidroxiapatita nativa del esmalte en tanto que la pasta dental que contiene nanocristales de CHA sustituidos con Zn produjeron un revestimiento biomimético sobre la superficie del esmalte, imitando así la composición,, estructura, morfología y reactividad superficial de la hidroxiapatita del esmalte biológico.(20)

Poggio y col. comprobaron el impacto de diferentes pastas dentífricas con Zinc-Hidroxiapatita (Zn-HAP) “Biorepair®” y acetato de pirrolidona-carboxilato de zinc (Zn-PCA) Biorepair Plus®, su metodología consistió en preparar una muestra de 50 incisivos Bovinos permanentes, cortados en la unión esmalte-dentina y colocados en cajones de resina acrílica para que la superficie sea plana. Las

muestras fueron sometidas a un efecto erosivo con “Coca Cola®” por 2 minutos en 4 momentos 0, 8, 24, 32 horas y lavando con agua destilada, fueron almacenados (6) en sales artificiales. Posteriormente se evaluó la microdureza del esmalte, se dividió la muestra en 5 grupos grupo A (sin tratamiento) luego se aplicaron las pastas dentífricas sobre la superficie, B= tratamiento con pasta sin fluoruro, C= tratamiento con pasta con fluoruro, D= tratamiento de pasta sin fluoruro con ZnHAP (Biorepair®), E= tratamiento de pasta sin fluoruro Zn-nHaP –Zn PCA(biorepair plus®), para nuevamente evaluar la microdureza, concluyeron que tanto el Biorepair® (D) y Biorepair plus® (E) no se encontraron diferencias significativas, ambos fueron capaces de mantener, restaurar la dureza del esmalte, pastas dentales actualmente comercializadas que no son de fácil acceso para pacientes de bajos recursos económicos.(70)

Bossú y col., estudiaron una pasta de dientes sin flúor que contiene hidroxiapatita biomimética para evaluar las propiedades remineralizantes y reparadoras del esmalte y se comparó con otras dos pastas de dientes que contenían diferentes concentraciones de flúor. Como resultado las nanopartículas microestructuradas de Hidroxiapatita remineralizan el esmalte con una película biomimética que semeja la estructura y la morfología de la Hidroxiapatita biológica del esmalte. Concluyen que el uso de dentífricos Biomiméticos de Hidroxiapatita ha demostrado ser una valiosa medida de prevención de la caries dental en dentición primaria ya que además previene el riesgo de fluorosis (71)

En la presente investigación se evalúa el efecto remineralizante de la pasta dental con naohidroxiapatita y quitosano así como solo con nanohidroxiapatita en

su versión comercial y con aquella extraída del caparazón de la concha de abanico, así mismo se evalúa con la versión comercial de quitosano. El efecto es comparado con el producido por 2 pastas comerciales con fluor.

IV.1 Esmalte Dental

El esmalte es un tejido mineralizado, cubre la corona anatómica del diente, se forma en un proceso de biomineralización que se divide esencialmente en etapas secretoras y de maduración. Si bien los eventos moleculares de la formación del esmalte durante la etapa secretora se han dilucidado en cierta medida, los mecanismos de maduración del esmalte están menos definidos y se sabe poco acerca de las moléculas presentes más allá de la etapa de maduración (72). Está compuesto de un 95% de hidroxiapatita de calcio, 4% de agua y 1% de material orgánico, su rango de dureza se sitúa en 200-500 Knoop y un valor de 8 en la Escala de Mohs, por otra parte, es un tejido frágil ya que posee un módulo elástico alto y una resistencia a la tensión baja. Esto implica la necesidad de un tejido subyacente, la dentina, con alta resistencia compresiva y cierta resiliencia (8, 73). El esmalte es un tejido dotado de cierta porosidad y permeabilidad, existe un intercambio de fluidos entre la pulpa y el medio oral en el que participa el esmalte, esta permeabilidad es selectiva, permitiendo el paso de agua e iones, pero excluyendo el paso de moléculas grandes (9).

Es un tejido epitelial. Se une al complejo dentinopulpar en la unión amelodentinaria y al cemento en la unión amelocementaria. El grosor del esmalte varía según su localización, alcanzando su máximo grosor sobre el borde incisal o las cúspides, desde donde va disminuyendo hacia la línea cervical. El esmalte es un

tejido dotado de cierta porosidad y permeabilidad; existe un intercambio de fluidos entre la pulpa y el medio oral en el que participa el esmalte. Esta permeabilidad es selectiva, permitiendo el paso de agua e iones, pero excluyendo el paso de moléculas grandes. (74)

Al estudiar su estructura, la mayoría de su volumen se observa que está ocupado por cristales de apatita compuestas en Hidroxiapatita, Fluorapatita y Apatita carbonatada; la más abundante es la hidroxiapatita. (75).

IV.2 Erosión dental

La erosión dental se ha definido como la pérdida patológica de tejido dental no bacteriano inducido por ácidos extrínsecos o intrínsecos o quelantes que actúan sobre superficies dentales sin placa (1, 76).

La erosión dental es un problema común en las sociedades modernas debido al aumento del consumo de bebidas ácidas, como los refrescos, las bebidas deportivas, los jugos de frutas, que tienen un alto potencial para causar la desmineralización del esmalte (3,4).

Los cambios en la dieta y la higiene bucal inadecuada han hecho que la erosión del esmalte sea cada vez más frecuente entre los jóvenes (5,6).

El principal ácido involucrado en estos procesos es el ácido cítrico, un componente de muchos jugos de frutas y refrescos ácidos. La concentración típica presente en muchos refrescos ácidos es 0.2-0.004 M para los jugos de frutas y 0.015-0.05 M para los refrescos ácidos. Los tres grupos carboxilo confieren altas propiedades quelantes al ácido cítrico, que forma complejos solubles con iones de

calcio, lo que mejora la disolución del esmalte para lograr niveles de saturación del complejo de calcio-ácido (6).

La erosión dental ha motivado diferentes estudios en la búsqueda de sustancias alternativas para proteger el esmalte dental y hacerlo menos vulnerable a los ataques ácidos incluído las pastas conteniendo hidroxiapatita. (77, 78)

IV.3 Proceso de desmineralización y remineralización del esmalte

El pH salival es de 6.2 a 6.8, en tales circunstancias los cristales de Hidroxiapatita, componente principal del esmalte se encuentran como tales, pero cuando el PH salival baja por acción de los ácidos –propios de los alimentos o producidos por el metabolismo bacteriano- hasta un nivel de 5.5 conocido como pH crítico de la Hidroxiapatita adamantina, los cristales se disocian y tienden a difundirse hacia el medio externo, produciéndose la desmineralización (8). Este fenómeno no ocurre de manera incesante, ya que por acción buffer o Tampon de la saliva el pH se vuelve a estabilizar, logrando incorporarse nuevos cristales en la superficie dentaria, dando como resultado el proceso inverso: la remineralización, la cual demanda aproximadamente 20 minutos para producirse (9).

En este proceso el tiempo de grabado ácido juega un papel importante y afecta las propiedades mecánicas de la superficie del esmalte. (79). Se viene probando diferentes sustancias que ayuden en el proceso de remineralización de estos tejidos desmineralizados en especial en las lesiones tempranas del esmalte (80-82)

IV.4 Hidroxiapatita

La Hidroxiapatita es un mineral inorgánico cristalino que se encuentra principalmente en los huesos y la estructura dentinaria, corresponde a una reserva del 99 % del calcio corporal y 80 % del fósforo total y tiene como gran propiedad que es poco soluble, pero en el medio bucal puede disolverse por ácidos añadido a un descenso del Ph a menos 5.5. (25).

Su fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ está compuesta esencialmente por fósforo y calcio y representa un compuesto cristalino integrado por tres moléculas de fosfato de calcio y una molécula de hidróxido de calcio. La hidroxiapatita (HA) tiene la composición química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, sin embargo, en los dientes se encuentra por lo general en una versión altamente sustituida que puede ser representada de forma general como $\text{Ca}_{10-x}\text{Nax}(\text{PO}_4)_6-y(\text{CO}_3)_z(\text{OH})_2-u\text{Fu}$. A pesar de ser poco soluble en condiciones químicas neutras y básicas, en el medio bucal la HA puede disolverse si el pH desciende de 5.5 (26,27).

La Hidroxiapatita puede provenir de una fuente natural como de los huesos de humanos o de otras especies animales que así lo permitan como el hueso de bovino, bacalao, Cáscara de huevo, corales. (24).

Se obtiene de forma sintética las cuales se pueden clasificar en cerámicas y no cerámicas, donde las primeras en mención no son reabsorbibles a diferencia de las no cerámicas que son reabsorbibles y puede ser usada como biomaterial. (27, 83).

En los años 70's se comenzó a investigar el uso de la Hidroxiapatita como un material osteoinductor, es decir, un material que induce la formación de hueso nuevo. Actualmente se emplea con éxito en el campo médico, odontológico, oftalmológico y ortopédico. (25).

Algunas posibles aplicaciones que puede tener la HA como material son: Preservación del reborde alveolar, fracturas mandibulares, reconstrucción de huesos faciales, prótesis ortopédicas. Cuando se ha extraído un tumor óseo o existe una fractura en un hueso el defecto se rellena con HA, o bien para recubrir prótesis metálicas; artrodesis: fijación de una articulación por medio de cirugía, implantes dentales, en la Otorrinolaringología para construir prótesis de oído medio. (24). La nanohidroxiapatita, ha mostrado resultados positivos en la remineralización el tratamiento de hipersensibilidad dentinaria (84-87) y también en la remineralización del esmalte en lesiones tempranas (88,89).

IV.5 Quitosano

El quitosano es una sustancia biocompatible y biodegradable, entonces tiene un potencial enorme en el campo de la medicina. Se ha demostrado que pequeñas partículas de quitosano (nanoquitosano) cuando se agregan a partículas de plata que son agentes antimicrobianos la actividad antimicrobiana se potencia. (28).

El quitosano se obtiene de la quitina, un polímero de cadena larga producida por algunos insectos y crustáceos. La quitina, es la segunda sustancia polimérica más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. La quitina tiene un grupo aminoacetilo, que al perderse mediante soluciones fuertes de hidróxido de sodio, de

una enzima quitinasa, se convierte en quitosano. Se han descubierto propiedades antimicrobinas. (28).

Qu y col., plantean que las aplicaciones anticaries del quitosano se dan en: 1) El quitosano puede inhibir eficazmente el desarrollo de biopelículas y el crecimiento de bacterias relacionadas con la caries, pero el nivel de su actividad antibacteriana depende del PM y la DD del quitosano; 2) El quitosano puede actuar como reservorio para la deposición de iones de calcio y fósforo, lo que ayuda a la remineralización de las zonas de caries del esmalte y promoviendo la formación ordenada de cristales mineralizados dentro del colágeno; 3) El quitosano puede servir como un vehículo eficiente de administración de fármacos para agentes remineralizantes o antibacterianos, lo que ayuda a aumentar la biodisponibilidad de los medicamentos, reducir las dosis y preservar la eficacia del tratamiento a largo plazo, lo que se agrega a las importantes propiedades de respuesta al pH, que incrementa aún más su aplicación en la prevención y el tratamiento de la caries dental. (94)

El quitosano tiene aplicaciones limitadas, principalmente debido a su escasa solubilidad en agua u otros disolventes orgánicos. Sin embargo, el quitosano tiene un alto potencial de modificación química debido a la cantidad de grupos amino que porta (95). De otro lado, aunque el quitosano tiene afinidad por la superficie del diente, altas concentraciones de quitosano pueden limitar la capacidad de la sustancia para extenderse sobre la superficie del diente debido a su alta viscosidad (96-97). Los estudios también han demostrado que, aunque la adición de derivados de quitosano a los materiales o adhesivos de restauración dental puede ayudar a

reducir la acumulación bacteriana en la interfaz de reparación y la probabilidad de caries secundaria, sin embargo es de tener en cuenta que esto tiene impacto en las propiedades mecánicas del material (98). Por otro lado, hay que tener en cuenta la posible degradación del quitosano y sus derivados por la lisozima salival (99).

Aunque muchos investigadores han desarrollado productos anticaries a base de quitosano, se necesita más investigación de apoyo antes de que puedan usarse en un entorno clínico (94). El Quitosano que fue utilizado en el estudio es un Quitosano de alto peso molecular de la Marca SIGMA-ALDRICH- USA.

IV.6 Nano hidroxiapatita/Quitosano

Las propiedades de la nanohidroxiapatita y del quitosano tratadas en los puntos anteriores han motivado a diferentes investigadores las propiedades de liberación controlada (46) y de adhesión a superficies (47) que tiene el quitosano, las mismas que se proponen aprovechar para usarlo como medio para trasladar la nHA a la superficie del esmalte.

Simeonov y col., estudiaron un microgel híbrido de quitosano/fosfato de calcio y encontraron que puede ayudar en la nucleación y crecimiento del fosfato de calcio en la superficie de esmalte dental, promueve la remineralización de las lesiones de caries dental y tiene buena adherencia y actividad antibacteriana. (100)

Rahayu y col., estudian el quitosano fluorado y sus derivados observando que inhibe eficazmente la liberación de iones fosfato en la superficie de la hidroxiapatita, con un efecto comparable al del fluoruro de sodio. (101)

Huang y col., estudian materiales experimentales a base de resina dopados con carboximetilo, microrellenos de quitosano y fosfato cálcico, encontrando que induce eficazmente la mineralización biomimética de las fibrillas de colágeno en la dentina, mejorando eficazmente la durabilidad de la unión resina-dentina (102)

De otro lado se han señalado las propiedades de liberación controlada (46) y de adhesión a superficies (47) que tiene el quitosano, las mismas que se proponen aprovechar para usarlo como medio para trasladar la nHA a la superficie del esmalte.

El presente estudio es un esfuerzo por ver el efecto remineralizante de una pasta dental experimental con nanohidroxiapatita y quitosano en esmalte bovino erosionado. De los diferentes métodos que se han propuesto y aplicado con éxito para la producción de un material compuesto de nanohidroxiapatita y andamios de quitosano (nHA/Q) (40,44), en este proyecto, se utilizó el método de co-precipitación descrito Ruso et al. 2005 (45).

Esta técnica se basa en la mezcla acuosa de quitosano, ácido acético ($C_2H_4O_2$), cloruro de calcio ($CaCl_2$) y bifosfato de sodio (NaH_2PO_4), seguido por adición por goteo de hidróxido de sodio (NaOH) hasta alcanzar un pH de 11. El hidrogel que se forma es recolectado, secado y pulverizado. Este método de co-precipitación permite la formación de estructuras, en las cuales el Q actúa como andamio y la nHA se encuentra mayormente contenida dentro de esas formaciones. Además, se ha observado que la proporción relativa de nHA y Q tiene un efecto significativo en la morfología de las partículas de nHA; una menor proporción de nHA/Q resulta en partículas de nHA de menor tamaño. La posibilidad de controlar

el tamaño de la nHA variando la proporción de los precursores, hace este método muy versátil y prometedor (45)

IV.7 Pastas dentales o dentífricos

La palabra dentífrico probablemente, entró en uso en 1558, se deriva del latín *dentifricium*, es decir, *denti* (diente) y *fricare* (frotar). A lo largo de los años, los dentífricos se han empleado para la estética dental, la eliminación de olores de la boca, el fortalecimiento de los dientes y aliviar el dolor dental. Los componentes de estas pastas fueron partes de animales disecados, hierbas, miel y minerales. Durante muchos años, se utilizaron materiales que eran realmente dañinos para la salud bucal; estos materiales incluían elementos excesivamente abrasivos, minerales de plomo, ácido sulfúrico y ácido acético (50)

A partir de los estudios de Miller en los laboratorios de Koch, se cambió el concepto del origen de la caries dental, postulándose que los ácidos producidos en la superficie del diente son producto de la fermentación bacteriana de los azúcares de los alimentos. Por ello, los científicos iniciaron la elaboración de pastas dentales bajo una nueva perspectiva, con el fin de neutralizar la acidez de la placa dental y los antisépticos para luchar contra los gérmenes.

Los dentífricos han sido utilizados a lo largo de la historia por distintas personas alrededor del mundo, con el propósito de limpiar, fortalecer los dientes y eliminar el mal aliento. Su composición ha evolucionado desde los polvos compuestos de hierbas, minerales y cenizas de huesos de animales, pasando por aguas dentífricas que contenían orinas, vinagre, aceites y miel, hasta llegar a las pastas actuales que han experimentado un importante desarrollo en su composición

con la introducción de agentes cosméticos y agentes terapéuticos, con el objetivo de prevenir la enfermedad la periodontal y caries dental.

Las pastas dentales son un vehículo eficaz y adecuado para el suministro de agentes terapéuticos a la cavidad bucal, debido a que las pastas dentales contienen flúor convirtiéndolas en elementos altamente eficientes en el control de la caries dental, por la eliminación mecánica de la placa dental y a la liberación de flúor en la cavidad bucal. El uso de la pasta dental es uno de los comportamientos de higiene bucal más populares en los países desarrollados.

En las últimas décadas ha habido una gran variedad de cambios en la composición de la pasta de dientes. Uno de los cambios principales es utilizar la pasta de dientes como un sistema de suministro de agentes terapéuticos a la cavidad oral. Se puede encontrar una gran variedad de pastas de dientes en el mercado, para diferentes propósitos: prevención de caries, prevención de gingivitis, formación de anti cálculos, prevención de hipersensibilidad a la dentina y blanqueamiento dental. Las pastas dentales tienen una amplia gama de ingredientes: abrasivos, humectantes, conservantes, agentes espesantes o aglutinantes, detergentes, agentes aromatizantes y agentes terapéuticos (103-110)

Los componentes básicos de una Pasta Dental son los siguientes:

Humectantes- Estos ayudan a prevenir el secado de la pasta dentífrica una vez abierto el tubo. En un principio, se utilizaba una solución al 50% de glicerina en agua. En la actualidad se utilizan otros humectantes como: sorbitol, xilitol, polietilenglicoles de bajo peso molecular y propilenglico, cuyas propiedades confieren al dentífrico una mayor humectabilidad al abrasivo, evitando así el secado

y endurecimiento del producto, disminuye el punto de congelación, además de mejorar la textura y aroma del dentífrico.

Detergentes o espumantes - Los detergentes ayudan a crear una suspensión estable del abrasivo en la boca, lo cual permite una limpieza efectiva. Por lo general, las personas prefieren una pasta que además de limpiar produzca espuma de manera abundante, proporcionando así una agradable sensación en la boca durante su uso. Un espumante debe ser atóxico, no irritante para la mucosa oral e insípido. Los más utilizados son: lauril sulfato sódico, N-lauroil sarcosinato sódico, ricinoleato sódico y sulforicinoleato sódico.

Conservantes - Los conservantes se adicionan para proteger la pasta dentífrica del efecto de los microorganismos. Se emplean principalmente benzoato sódico, metilparabeno, metilparabeno sódico, propilparabeno sódico, mezcla de parabenos y formalina

Edulcorantes - El sabor de la pasta de dientes es una de las características más apreciadas por las personas. Como edulcorantes se emplean sacarina sódica, ciclamato sódico, xilitol, glicirrato aniónico, esencias de menta piperita, hierbabuena, eucalipto, canela, badiana, mentol, aromas frutales, cola

Aglutinantes o espesantes. Es imprescindible incorporar aglutinantes para mantener la suspensión estable. Estos componentes aumentan la viscosidad de la pasta y mantienen unidas las partículas del abrasivo. Los más utilizados son: alginatos, carregenatos, goma xantana, hidroxietilcelulosa sílice, carboximetilcelulosas, sílicas. El tamaño medio de las partículas de las sílicas espesantes es de 4 μm .

Abrasivos - Los abrasivos son agentes pulidores sólidos cuya función es eliminar la biopelícula que se acumula sobre la superficie de los dientes. El principal requisito de estos es su compatibilidad con los demás componentes del dentífrico, así como el tamaño de las partículas, las cuales deben tener una magnitud y dureza tal que solamente elimine la biopelícula sin desgastar el esmalte

Sílice - Las sílicas abrasivas tienen un tamaño de 9 μm . Presentan innumerables ventajas debido a que son química y fisiológicamente inertes, inodoras, insípidas, tienen partículas muy pequeñas y con gran adsorción, sus productos son de baja densidad y excelente aspecto, tienen una leve acción astringente debido a su pH.

Fosfato dicálcico anhidro El fosfato dicálcico anhidro es un compuesto de alta abrasividad, su uso es limitado a pequeñas cantidades. Presenta la misma compatibilidad que su forma hidratada.

Cuando se emplea tanto el fosfato dicálcico dihidratado como el fosfato dicálcico anhidro, es necesario incluir un estabilizante para evitar la formación de masas compactas, cristalización o asperezas en el dentífrico. Para tal efecto se sugiere el empleo de fosfato de magnesio, estearato de magnesio, sulfato de magnesio o pirofosfato tetrasódico.

Las pastas dentales se clasifican como terapéuticas y no terapéuticas o cosméticas, de acuerdo con la presencia o ausencia de agentes con efecto terapéutico sobre su composición. Las pastas dentales cosméticas tienen la función de limpiar y pulir los dientes, proporcionando un aliento agradable. Las pastas dentales terapéuticas además de limpiar y pulir los dientes, contienen distintas

sustancia para prevenir y tratar enfermedades orales como caries dental gingivitis, formación de cálculos, o la sensibilidad dental.

Dentro de la pasta dentales terapéuticas tenemos las que contienen nanopartículas de plata, las cuales se están utilizando fundamentalmente como agentes antibacterianos para pastas dentales a las que se atribuye la propiedad de ser capaz de combatir al *S. Mutans*, *Staphylococcus Aureus*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*; propiedad que indiscutiblemente ofrece un abanico de posibilidades y de beneficios para la salud del paciente.

Si bien la remineralización mediada por flúor es la piedra angular de las filosofías actuales del manejo de la caries, se han comercializado o se están desarrollando nuevas estrategias que afirman promover una remineralización más profunda de las lesiones, reducir los riesgos potenciales asociados con los productos de cuidado oral con alto contenido de flúor, y facilitar el control de la caries durante toda la vida. Estos sistemas remineralizantes sin flúor pueden clasificarse en tecnologías regenerativas de esmalte biomimético y los enfoques que reparan las lesiones de caries al mejorar la eficacia del fluoruro. Entre las alternativas del mercado encontramos pastas con nanohidroxiapatita (nHA), fosfopéptido de caseína – fosfato de calcio amorfo CPP-ACP, fosfato tricálcico, fosfosilicato de calcio y sodio, fosfatos de calcio amorfo (ACP), polifosfatos, trimetafosfato de sodio (71).

Los dentífricos dependiendo de su conformación pueden cumplir funciones desensibilizantes, remineralizantes o como agentes blanqueadores (106)

Smith y col (101) analizan el papel de agentes farmacológicos utilizados en dentífricos que pueden tener un efecto positivo en el control de la gingivitis y enfermedad periodontal como: Fluoruro de estaño, clorexidina, triclosan. El control de la inflamación y destrucción periodontal representan objetivos importantes en la terapia periodontal.

El presente estudio utilizó como pastas control 2 pastas con flúor: Colgate Total® y MI Paste Plus™, ésta última contiene fluoruro de sodio y RECALDENT fosfopéptido de caseína – fosfato de calcio amorfo CPP-ACP. Ambas pastas están en el rango de poca abrasividad de acuerdo al nivel de Abrasión Relativa de Dentina (RDA). Esta escala asigna a los dentífricos un valor de abrasividad, en relación con un abrasivo de referencia estándar que recibe arbitrariamente un valor RDA de 100. Todos los dentífricos por debajo de 250 RDA, se consideran seguros y efectivos, pues produce un desgaste limitado de la dentina y prácticamente ningún desgaste del esmalte.

IV.8 Dientes de bovino como sustituto de dientes humanos para estudios in vitro del esmalte dental.

Los dientes de Bovino con respecto a los dientes humanos presentan muchas ventajas para su uso como sustituto de dientes de humano para investigación de materiales dentales, entre esas ventajas encontramos, que son dientes de mayor tamaño lo cual hace más fácil su manipulación, su fácil obtención debido a que a diario se sacrifican cientos de animales de los cuales se pueden obtener sus dientes, la ausencia de caries, ya que debido al tipo de dieta, la cantidad de saliva y la cantidad de movimientos efectuados por la lengua hace que su incidencia sea menor

que en los humanos y su similitud tanto macroscópica como microscópica con los dientes humanos (111,112).

IV.9 Microscopía Raman

Es una técnica espectroscópica usada en química y física de la materia condensada para estudiar modos de baja frecuencia como los vibratorios, rotatorios, y otros. Permite obtener los espectros característicos del esmalte dental en base a la concentración de los compuestos moleculares y por tanto contabilizar el valor otorgado al área del pico correspondiente al modo vibracional del ion fosfato ν_1 . Se basa en los fenómenos de dispersión inelástica, o dispersión Raman, de la luz monocromática, generalmente de un láser en el rango de luz visible, el infrarrojo cercano, o el rango ultravioleta cercano. La luz láser interactúa con fonones u otras excitaciones en el sistema, provocando que la energía de los fotones del láser experimente un desplazamiento hacia arriba o hacia abajo. El desplazamiento en energía da información sobre los modos vibracionales en el sistema (108-110).

IV.10 Microdureza superficial Vickers

Caracteriza la resistencia que opone un material al tratar de ser rayado o penetrado por otro. En el presente estudio para medir la microdureza superficial del esmalte se aplica el ensayo de dureza Vickers, llamado el ensayo universal, es un método para medir la dureza de los materiales, es decir, la resistencia de un material al ser penetrado. Sus cargas van de 5 a 125 kilopondios (de cinco en cinco). Su penetrador es una pirámide de diamante con un ángulo base de 136° (111)

V. METOTODOLOGÍA

El presente estudio se divide en cuatro etapas:

Obtención y caracterización de nanohidroxiapatita/Quitosa 50/50.

Obtención de la nanohidroxiapatita a partir del caparazón de la Concha de Abanico.

Formulación de pastas experimentales a base de nanohidroxiapatita y quitosa.

Evaluación de las pastas experimentales.

Los procedimientos se llevaron a cabo en los siguientes laboratorios:

Laboratorios UNI Caracterización de Materiales -Caracterización de nHAP.

Análisis de microscopía electrónica de barrido.

Laboratorio de materiales dentales de la Universidad Peruana Cayetano

Heredia: Elaboración de la pasta dental y preparación de muestras.

Laboratorio de Micología y Biotecnología - Universidad Nacional Agraria

La Molina: Análisis de espectroscopia Raman.

Laboratorio de Ciencias de los materiales, nanomateriales, biomateriales y dispositivos. Unidad 110-LID UPCH – Centro de Innovación y Emprendimiento UPCH. Obtención de nanohidroxiapatita.

High technology laboratory certificate SAC. Ensayo de Microdureza Vickers

V.1 Diseño del estudio

Es un estudio experimental in vitro, analítico y comparativo

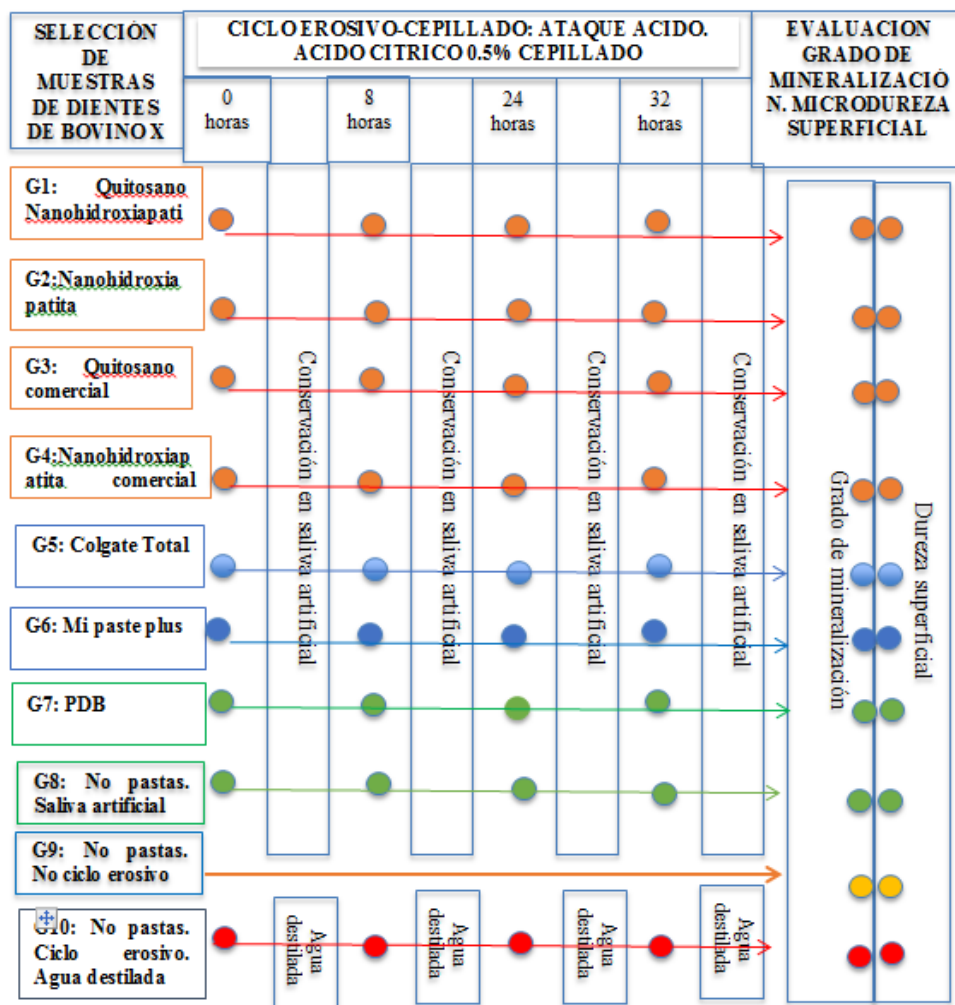
Analítico: se analizó cuantitativamente el grado de remineralización del esmalte en cada uno de los 10 grupos.

Comparativo: Se comparó los resultados obtenidos en los 10 grupos con el fin de determinar la efectividad para producir la remineralización.

Experimental: Se analizó el efecto de las variables independientes (Concentración de nHA, concentración de Quitosano en la pasta dental) sobre la variable dependiente (grado de remineralización y la microdureza superficial).

In Vitro: La investigación se llevó a cabo con dientes de Bovino en el laboratorio.

Figura 1: Diseño del estudio





V.2 Muestra

Se trabajó con 100 muestras obtenidas de dientes de bovino previamente seleccionados los cuales fueron distribuidos 10 especímenes para cada uno de los 10 grupos de estudio. El tamaño de la muestra se basa en estudios previos de Pioggio y Col. (70).

Técnica de muestreo: No probabilístico.

V.3 Criterios de selección

Criterios de inclusión

Los especímenes fueron seleccionados por la integridad del esmalte de la cara vestibular de los incisivos.

Criterios de exclusión

Cualquier variación en la estructura del esmalte fue motivo de exclusión del estudio, esto incluyó: Fracturas, grietas, fisuras, desgastes, soluciones de continuidad, manchas o alteraciones de la forma.

Los especímenes fueron distribuidos aleatoriamente a los grupos.

Las variables dependientes e independientes se describen a continuación.

V.3.1 Variables Dependientes

Las evaluaciones de las erosiones dentales abordan diferentes enfoques metodológicos, a saber, evaluar solo los fenómenos de la superficie, como el cambio de la dureza de la superficie o la pérdida de los tejidos duros dentales per se.(52-56) En el presente estudio se midió tanto la pérdida de mineral como la dureza superficial, para ello se utilizarán las siguientes variables dependientes:

Grado de mineralización del esmalte

Definida con microscopia RAMAN Confocal. Evalúa la presencia e intensidad de grupos fosfato en el esmalte dental. B1 pico posición 960. (56,57)

Microdureza superficial

Resistencia superficial de un material a sufrir deformaciones plásticas al recibir una fuerza. La microdureza se midió con un penetrador de diamante Vickers, que son romboidales y tetrapiramidales, respectivamente. Los números de dureza Vickers se calcularon a partir de la longitud de la sangría y la carga aplicada. (56) Operacionalmente se calculó la diferencia de microdureza inicial y final. Variable cuantitativa y de razón, la unidad de medida a utilizar es kgf/mm^2 (Hardness Vickers).

V.3.2 Variables Independientes:

Grupo de tratamiento: Grupos de muestras que recibieron un

tratamiento diferenciado de los otros grupos luego del ataque ácido. Son 10 grupos de 10 especímenes cada uno diferenciados por la presencia y proporción de agentes remineralizantes y quitosano utilizado en la pasta dental. Como se aprecia en la tabla 1:

Cuadro 1. Distribución de muestras por grupo de estudio, principio activo para remineralización y abrasivo utilizado.

DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS DE ESTUDIO					
GRUPO	n	DENOMINACIÓN	PRINCIPIO ACTIVO REMINELARIZACION	Abrasivo	
PASTAS EXPERIMENTALES					
G1	10	PDB 80% + nHAp 10% + Quitosano 10%.	nHAp 10% + Q 10%.	Carbonato de calcio extra leve.	
G2	10	nHAp Concha de Abanico 10%	nHAp 10%	Carbonato de calcio extra leve.	
G3	10	PDB 90% + Q 10%.	Q10%	Carbonato de calcio extra leve.	
G4	10	PDB 90%+ nHAp comercial 10%	nHAp 10%	Carbonato de calcio extra leve.	
PASTAS CONTROL					
G5	10	Colgate total 12	Fluoruro de sodio 0.32% (1450 ppm de fluor).	Silice hidratado	
G6	10	MI paste plus.	Recaldent o CPP-ACP, fluoruro de sodio 900 ppm	Silica	
G7	10	PDB 100%		Carbonato de calcio extra leve.	
CONTROL NO PASTAS					
G8	10	Control no pastas. Conservado en Saliva artificial			Salival
G9	10	Control no pastas. No ciclo erosivo.			
G10	10	Control no pastas, solo ciclo erosivo, agua destilada.			

V.4 Técnicas y procedimientos

V.4.1 Obtención y caracterización del compuesto NanoHidroxiapatita/Quitano (nHA/Q)

Para producir los compuestos de nanohidroxiapatita y quitano (nHA/Q) se usó el método de co-precipitación descrito por Rusu et al. 2005.46, el mismo que se describe a continuación:

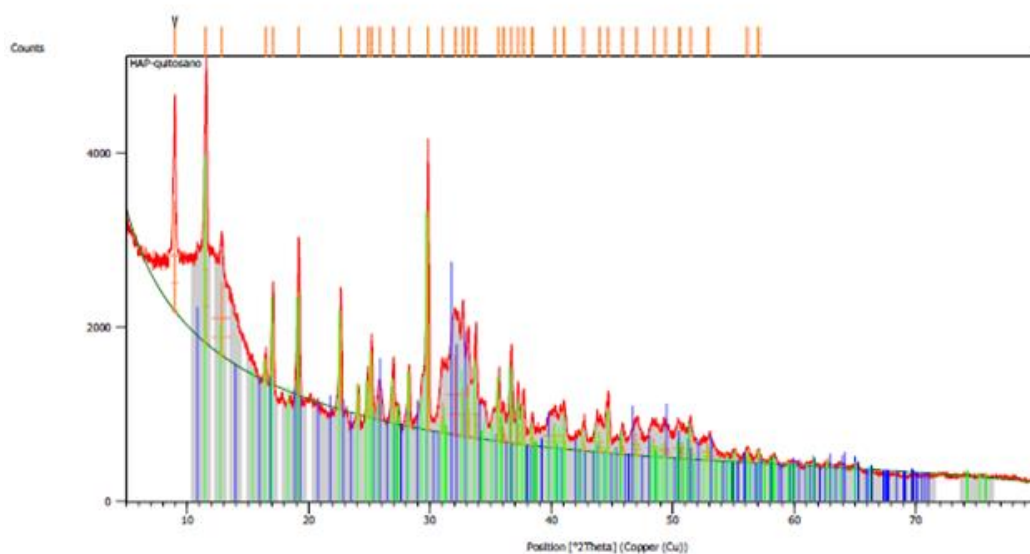
Primero, se agregó quitano a 1000 mL de agua desionizada hasta obtener una concentración de 0.2% por peso. A esta solución se le agregó 1% de ácido acético, 20 mL de 1.000 M cloruro de calcio (CaCl_2) y 12 mL de 1.000 M bifosfato de sodio (NaH_2PO_4), resultando en una ratio molar Ca/P = 1.67. Luego, se agregó 1.25 M hidróxido de sodio (NaOH) por goteo hasta incrementar el pH de la solución a 11. Al llegar a ese punto, el compuesto se convierte en un hidrogel suspendido en la solución. Después de dejar reposar por 24 horas, se filtró la solución para recolectar el hidrogel y lavarlo para remover las sustancias alcalinas. Luego el hidrogel fue recolectado y secado a la temperatura ambiente de 22 C. Después de 3 días de secado, se obtuvo un material rígido. Este compuesto estaba constituido por partes iguales (50:50, % por peso) de nHA y Q. Para caracterizar y aplicar el material sintetizado a la pasta base, se pulverizó el nHA/Q usando una técnica de secado en frío a baja presión.

Esta técnica de co-precipitación se usó para la síntesis del material

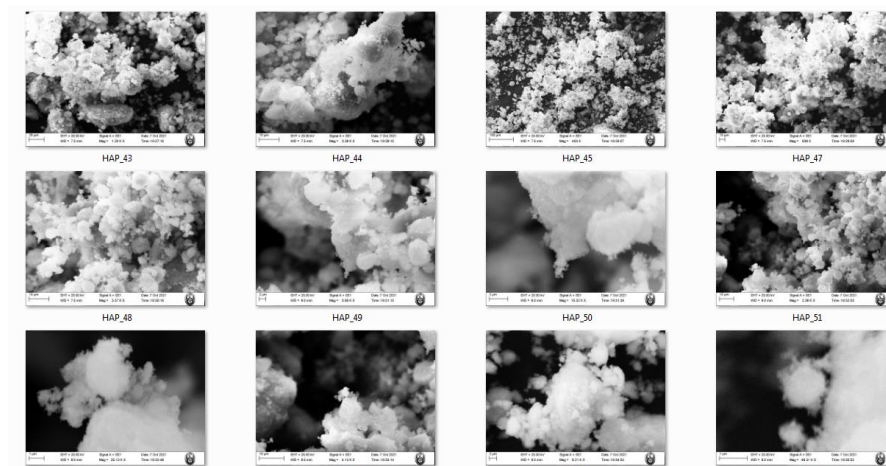
compuesto de 50:50 nHA/Q y para la muestra de nHA sin quitosano.

Las muestras de 50:50 nHA/Q fueron caracterizadas usando el difractómetro de rayos X (XRD) para evaluar la estructura cristalina de los compuestos, y microscopía electrónica de barrido (SEM) (marca ZEISS modelo EVO-10) para observar las dimensiones y aglomeraciones de las partículas nHA/Q

Figura 2: Caracterización del compuesto Nanohidroxiapatita quitosano usando XRD y SEM.



Visible	Ref. Code	Score	Compound Name	Displacement [°2Th.]	Scale Factor	Chemical Formula
*	01-076-0694	29	Calcium Phosphate Hydroxide	0.000	0.387	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$
*	00-028-1030	63	Sodium Acetate Hydrate	0.000	0.490	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 13\text{H}_2\text{O}$



V.4.2 Obtención del Quitosano

El Quitosano utilizado en el estudio fue un Quitosano de alto peso molecular Marca SIGMA-ALDRICH- USA.

V.4.3 Obtención de la NanoHidroxiapatita

Se utilizó 2 tipos de Nanohidroxiapatita, la comercial de la Marca SIGMA-ALDRICH- USA y la obtenida del caparazón de la concha de abanico, donada por el laboratorio de Ciencias de los materiales, biomateriales y dispositivos. Unidad 110 LID de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la UPOCH, resultado del proyecto: PNIPA-ACU-SIADE-PP-000814 cofinanciado por el Programa nacional de investigación en pesca y acuicultura y la UPOCH.

V.4.4 Elaboración de Pasta Dental Base

Para la elaboración de la pasta dental se utilizaron las instalaciones del Laboratorio de materiales dentales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia

En el cuadro 1 se muestra la composición de la Pasta Dental Base.

Cuadro 2: Composición de la Pasta Dental Base

Carbonato de calcio (extra leve)	40.00%
Sorbitol 70%	20.00%
Lauril sulfato de sodio	1.20%
Carboximetilcelulose (CMC)	2.00%
Goma xantana	1.00%
Sacarina	0.10%
Flavorizante	0.75%
Agua purificada q.s.p.	100 ml

Para formular la Pasta Dental Base (PDB), se siguió el procedimiento descrito por Appel (50) que se describe a continuación:

Se pesaron todos los ingredientes, calentó el 70% del agua purificada a 90°C. En un recipiente se agregó sacarina y carbonato de calcio (edulcorante y abrasivo) al agua caliente, a fin de homogeneizar la mezcla. En un segundo recipiente se agregó los espesantes: Carboximetilcelulosa y Goma Xantana al 30% de agua purificada (al tiempo) y se homogenizó la mezcla.

Se agregó el preparado de los espesantes al primer recipiente, luego se mezcló con un batidor o mezclador hasta homogeneizar completamente. Luego se agregó al preparado, el sorbitol y Laurilsulfato de sodio

(humectante con detergente) y se batió hasta homogeneizar. Finalmente se agregó Flavorizante (saborizante).

Se preparó 80 gramos de Pasta dental base (PDB), se separó en 5 partes iguales, las mismas que fueron utilizadas para la preparación de las Pastas G1, G2, G3, G6 y G7 de la siguiente manera:

- Grupo 1 Pasta dental base 80% + nHAp 10% + Quitosano 10%.
- Grupo 2 Pasta dental base 90%+ nHAp Concha de Abanico 10%
- Grupo 3 Pasta dental base 90% + Quitosano 10%.
- Grupo 4 Pasta dental base 90%+ nHAp comercial 10%
- Grupo 7 Pasta dental base 100%

Figura 3: Proceso de elaboración de la Pasta Dental Base



30

Las pastas dentales comerciales utilizadas se aprecian en cuadro 2.

Cuadro 3: Componentes activos, abrasivos y RDA de las pastas dentales control comerciales.

PASTA DENTAL	MARCA/ LOTE	ABRASIVOS	COMPONENTES ACTIVOS
Colgate total®	COLGATE PALMOLIVE Lote 1153 Mx.112 H	Sílice hidratada, Dióxido de silicio RDA 70.	Fluoruro de sodio 0.32% (1450 ppm de flúor), citrato de cinc y óxido de zinc.
MI Paste Plus™	GC AMERICA INC.Lote: 2104088	Fosfato de calcio amorfo. Silica.RDA 64	Recaldent o CPP-ACP, fluoruro de sodio 900 ppm

V.4.5 Preparación de las muestras

Se utilizó dientes de bovino como sustitutos de dientes humanos por las características similares. Se compraron las cabezas de los bovinos destinados al consumo en un camal de Lima. Se procedió a la extracción de los incisivos mandibulares permanentes, los dientes seleccionados estuvieron libres de fisuras, hipoplasia y lesiones de mancha blanca. Se retiraron los tejidos blandos o restos de tejido

óseo existente con exploradores o curetas. Se lavó con abundante agua.

Se preparó 100 bloques de dientes de bovino conteniendo muestras de esmalte (4 mm de largo x 4 mm de ancho x 2 mm de altura) a partir de la superficie labial de la corona bovina. Los dientes se almacenaron en solución de timol al 0.1% (pH 7,0. Las muestras se cortaron utilizando un disco de diamante de baja velocidad. Las superficies de los especímenes se pulieron usando lija de agua 600-800-1000-1200-1500-1800 y 2000.

Se pulió ligeramente para lograr una superficie plana con disco sofex TM 3M ESPE. Las muestras se encajonaron en resina acrílica para facilitar la manipulación de las mismas y se mantuvieron en 100% de humedad con agua destilada hasta el comienzo del experimento. Luego las muestras fueron divididas en 10 grupos de tratamiento de 10 unidades cada uno.

V.4.6 Ciclo erosivo

Todos los especímenes, de todos los grupos, excepto del grupo 9, recibieron ataques ácidos repetidos sumergiendo el esmalte bovino de todas las muestras (10 por grupo) en un recipiente con ácido cítrico al 0.5 % durante 2 min (6 ml, temperatura ambiente) a las 0, 8, 24 y 32 horas. El ciclo erosivo utilizó los periodos de tiempo utilizados en estudios previos de Pioggio y Col (70). Luego se lavó con agua destilada. Durante todo el proceso las muestras se

conservaron en saliva artificial, la misma que se cambió diariamente.

Después de cada ataque ácido, se aplicaron las pastas de dientes correspondientes a cada grupo de tratamiento cepillándose luego con un cepillo eléctrico marca Munaiqui modelo M2032A haciendo que las puntas de las cerdas del cepillo tomen contacto sin hacer presión sobre la superficie del diente, manteniéndose fija la posición del cepillo respecto del diente a través de un dispositivo metálico adaptado para ello. El cepillado se realizó durante 3 minutos, tiempo también utilizado por Pioggio y Col (70) y luego las muestras se lavaron con agua destilada, para luego conservarse en saliva artificial hasta el próximo ataque ácido

V.4.7 Evaluación del grado de mineralización con Microscopia Raman Confocal.

Se utilizó un microscopio Raman confocal alpha 350RA (WITec GmbH, Ulm, Alemania) del Laboratorio de Micología y Biotecnología "Marcel Gutiérrez-Correa" de la Universidad Nacional Agraria La Molina, equipado con un láser de 785 nm de longitud de onda (50 mW de potencia) y un espectrómetro UHTS (300 líneas/mm) con cámara CCD como detector.

En cada muestra se midió 20 puntos equidistantes a lo largo de una línea de 85 μm , donde en cada punto se tomaron 20 espectros

Raman de 0.1 s cada uno y se promediaron. La ubicación de la zona de estudio en cada espécimen se llevó a cabo usando un objetivo Zeiss EC de 50 aumentos e iluminación Köhler de luz blanca LED con que cuenta el microscopio Raman.

Se obtuvieron imágenes, una micrografía espacial y otra imagen de los espectros del modo vibracional en base a la concentración de los compuestos moleculares. Se contabilizó el valor otorgado a la intensidad del modo vibracional del ión fosfato ν_1 .

V.4.8 Evaluación de la dureza superficial

Los especímenes fueron llevados a un microdurómetro Vickers marca LG (HV 1000). Se midió la microdureza después del ciclo ácido con 50 g de presión por 5s segundos. Se registró 5 medidas de microdureza por cada espécimen y se registraron los valores en KgF y se analizó el Porcentaje de Pérdida de Dureza (PPD).

V.4.9 Plan de análisis

En el análisis estadístico de los datos de microdureza y cantidad relativa de mineral obtenidos por ensayos de dureza Vickers y microscopía Raman, respectivamente, se utilizó el software STATA 18 (StataCorp LLC, Texas, EE.UU.).

Para la estadística descriptiva se consideraron los valores medios y desviaciones estándar de cada grupo de estudio, así como gráficos de caja-bigote para una mejor observación de los datos. Para la

estadística inferencial, primero se evaluó la normalidad de los datos y luego se realizó el test de Bartlett para evaluar la homocedasticidad. Una vez verificada la homogeneidad de varianzas, se procedió a realizar la prueba de ANOVA de un factor para evaluar diferencias entre grupos con una significancia del 5% ($p=0.05$). Seguidamente, se realizó el post test de Bonferroni para comparar las medias entre grupos.

V.4.10 Consideraciones éticas.

La presente investigación contó con la aprobación de la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Con carta CAREG-ORVEI-167-21 del 9 de junio de 2021, donde establecen que acuerdo al Manual de Procedimientos de nuestra universidad y por sus características, este proyecto no requiere evaluación por el Comité Institucional de Ética en Humanos o en Animales, pudiendo iniciar su ejecución.

VI. RESULTADOS

Se estudiaron 100 muestras distribuidas en 10 grupos de 10 muestras cada uno. Los grupos fueron los siguientes:

Grupo 1 Pasta dental base 80% + nHAp 10% + Quitosano 10%

Grupo 2 Pasta dental base 90% + nHAp Concha de Abanico 10%

Grupo 3 Pasta dental base 90% + Quitosano 10%

Grupo 4 Pasta dental base 90% + nHAp comercial 10%

Grupo 5 Pasta dental comercial con flúor Colgate total 12

Grupo 6 Pasta dental comercial con CPP- ACPF Mi paste plus

Grupo 7 Pasta dental base 100%

Grupo 8 Control no pastas. Conservado en Saliva artificial

Grupo 9 Control no pastas. No ciclo erosivo

Grupo 10 Control no pastas, solo ciclo erosivo. Conservado en agua destilada

El gráfico 1 muestra el diagrama de cajas en cuanto a las diferencias las áreas del pico del ion fosfato ν_1 mediante Raman, en el cual se puede observar la actividad remineralizante de las pastas dentales experimentales estudiadas y que no se encuentran diferencias significativas ($p>0.05$) entre las pastas

experimentales: Pasta dental base 80% + nHAp 10% + Quitosano 10% (grupo 1); Pasta dental base 90.%+ nHAp Concha de Abanico 10% (Grupo 2); Pasta dental base 90% + Quitosano 10%.(Grupo 3); Pasta dental base 90%+ nHAp comercial 10% (grupo 4), con la Pasta dental base 100% (Grupo 7). Así mismo entre estas pastas experimentales respecto a las pastas control comerciales utilizadas: Pasta dental comercial con fluor Colgate total (Grupo 5); Pasta dental comercial con CPP- ACPF Mi paste plus (Grupo 6); así como respecto del grupo Control no pastas, conservado en Saliva artificial (Grupo 8). Todos estos grupos muestran resultados similares respecto de las áreas del pico del ion fosfato v1 mediante Raman respecto del grupo de control inicial (Grupo 9). Por otro lado todas las formulaciones, las pastas control comerciales y el grupo control saliva sintética muestran diferencias significativas ($p<0.05$) con el grupo Control no pastas, solo ciclo erosivo y conservación en agua destilada (Grupo 10).

El gráfico 2 muestra el diagrama de cajas en cuanto a las diferencias en la Microdureza Vickers, en la cual se puede observar que no existe diferencias significativas ($p>0.05$) entre las pastas experimentales respecto de la microdureza en esmalte de bovino, producida por las pastas dentales experimentales estudiadas: Pasta dental base 80% + nHAp 10% + Quitosano 10%.(grupo 1); Pasta dental base 90.%+ nHAp Concha de Abanico 10% (Grupo 2); Pasta dental base 90% + Quitosano 10%.(Grupo 3); Pasta dental base 90%+ nHAp comercial 10% (grupo 4), con la Pasta dental base 100% (Grupo 6), respecto a las pastas control comerciales utilizadas: Pasta dental comercial con flúor Colgate total® (Grupo 5); Pasta dental comercial con CPP- ACPF Mi paste plus™ (Grupo 6); así como respecto del grupo Control no pastas,

conservado en Saliva artificial (Grupo 8). Todos estos grupos muestran resultados similares respecto de la dureza superficial en relación al grupo de control inicial (Grupo 9). De otro lado todas las formulaciones, las pastas control comerciales y el grupo control saliva sintética muestran diferencias significativas con el grupo Control no pastas, solo ciclo erosivo y conservación en agua destilada (Grupo 10).

Se puede ver que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en cuanto a la Dureza superficial Vickers del esmalte de bovino entre las pastas experimentales estudiadas, respecto de las pastas comerciales Colgate total, Mi Paste, ni la saliva artificial utilizada y las muestras de esmalte sano a las que no se les realizó ataque ácido ni ningún tratamiento.

Así mismo al aplicar la prueba de comparación múltiple de Bonferroni se encontró diferencias significativas entre el grupo 1 (Pasta dental base 80% + nHAp 10% + Quitosano 10%) y el grupo 3 (Pasta dental base 90% + Quitosano 10%).

Se puede apreciar también que todas ellas tienen diferencias significativas ($p < 0.05$) con el grupo 10, grupo control que fue sometido a ciclo erosivo y conservado en agua destilada.

El gráfico 3 muestra la media de microdureza luego de la exposición a los productos estudiados, y la variación en porcentaje de la microdureza, en ella se puede observar que solo el grupo control pierde valores en la microdureza superficial significativamente

La tabla 1 muestra los estadísticos descriptivos de los resultados obtenidos de grado de mineralización en los grupos estudiados.

La tabla 2 muestra los estadísticos descriptivos de los resultados obtenidos de microdureza Vickers en los grupos estudiados.

La tabla 3 muestra el porcentaje de Pérdida de Dureza (PPD) respecto a las muestras sin erosión.

Gráfico 1: Grado de mineralización mediante Raman en los grupos de dientes estudiados.

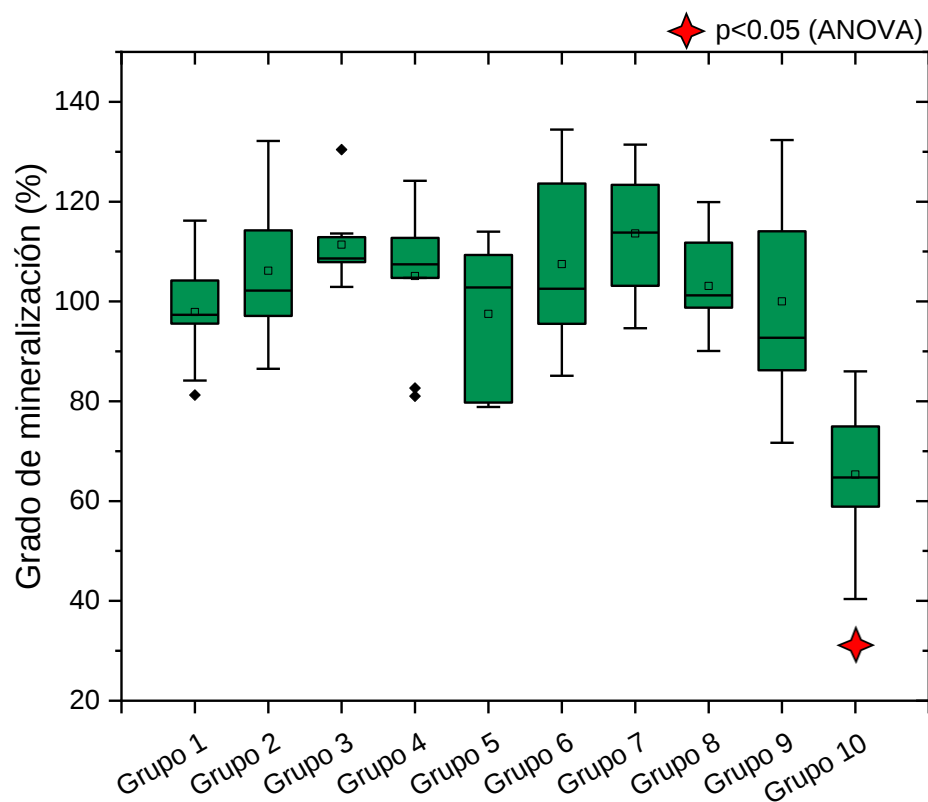


Gráfico 2: Microdureza superficial Vickers en los grupos de dientes estudiados.

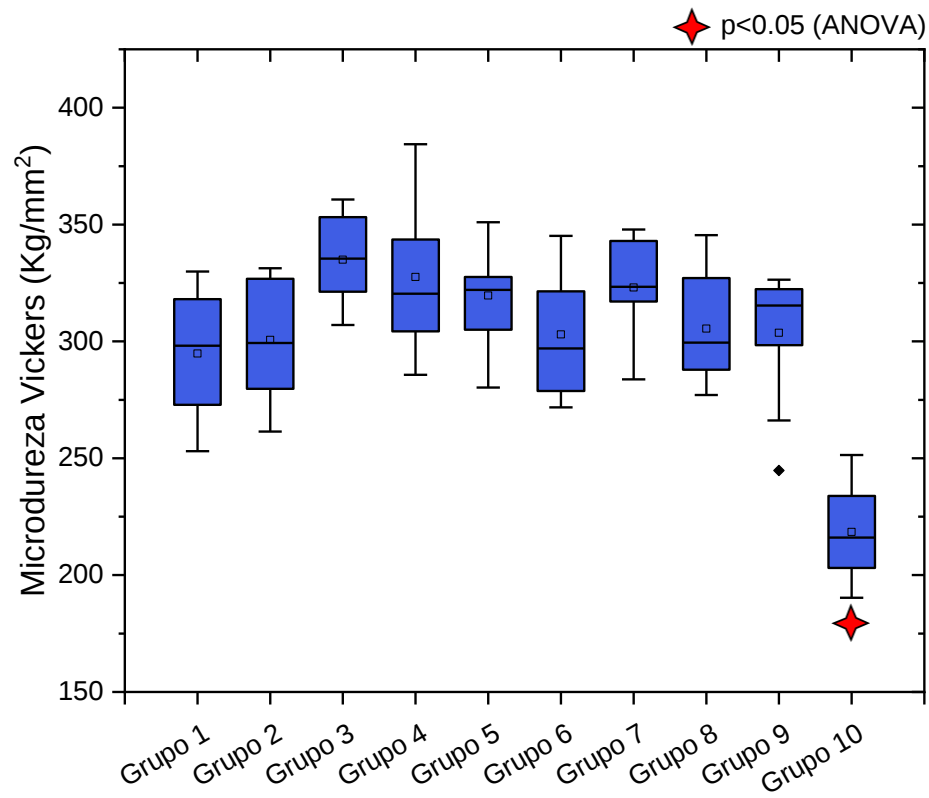


Grafico 3. Cantidad de mineral relativa en los grupos estudiados

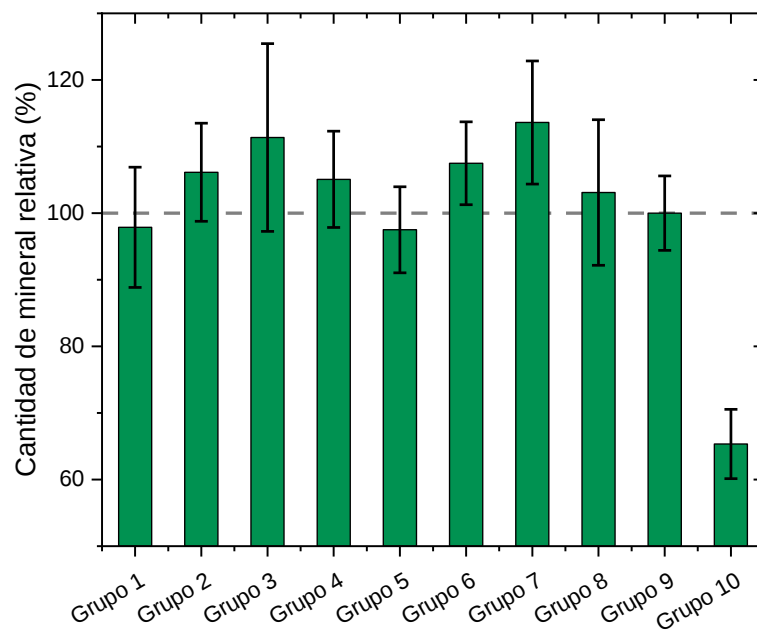


Tabla 1. Estadísticos descriptivos de los resultados obtenidos de grado de mineralización en los grupos estudiados.

Grado de mineralización (%)			
	Media	DS	*
Grupo 1	97.87	10.83	a
Grupo 2	106.14	14.43	a
Grupo 3	111.36	7.90	a
Grupo 4	105.08	14.54	a
Grupo 5	97.51	15.10	a
Grupo 6	107.49	17.27	a
Grupo 7	113.61	12.28	a
Grupo 8	103.10	9.44	a
Grupo 9	100.00	17.87	a
Grupo 10	65.33	12.55	b

*Comparación entre grupos mediante ANOVA y el post test de Bonferroni. Letras diferentes representan grupos con diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 2. Estadísticos descriptivos de los resultados obtenidos de microdureza Vickers en los grupos estudiados.

Microdureza Vickers (Kg/mm ²)			
	Media	DS	*
Grupo 1	294.78	27.86	a
Grupo 2	300.68	27.09	a
Grupo 3	334.93	19.81	a
Grupo 4	327.55	33.00	a

Grupo 5	319.60	21.63	a
Grupo 6	302.99	25.16	a
Grupo 7	323.10	21.50	a
Grupo 8	305.51	21.67	a
Grupo 9	303.71	27.52	a
Grupo 10	218.51	20.81	b

*Comparación entre grupos mediante ANOVA y el post test de Bonferroni. Letras diferentes representan grupos con diferencias significativas ($p < 0.05$).

La tabla 3 muestra el porcentaje de Pérdida de Dureza (PPD) respecto a las muestras sin erosión.

Tabla 3. Valores de Porcentaje de Pérdida de Dureza (PPD) respecto a las muestras sin erosión.

	PPD (%)
Grupo 1	-2.94
Grupo 2	-1.00
Grupo 3	10.28
Grupo 4	7.85
Grupo 5	5.23
Grupo 6	-0.24
Grupo 7	6.38
Grupo 8	0.59
Grupo 9	0.00
Grupo 10	-28.05

VII. DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto remineralizante de UNA pasta dental experimental a base de nanohidroxiapatita y quitosano (nHAP/Q), como alternativa para favorecer la remineralización del esmalte dental bovino erosionado. Se evaluó el grado de mineralización mediante microscopia RAMAN y la microdureza superficial con Vickers. Se formuló una pasta dental base (PDB) que actuó como vehículo para los agentes remineralizantes en experimentación. Se elaboraron las siguientes pastas experimentales: PDB 80% + nHAp 10% + Quitosano 10%. (Grupo 1), PDB 90%+ nHAp Concha de Abanico 10% (Grupo 2), PDB 90% + Quitosano 10%. (Grupo 3), PDB 90%+ nHAp comercial 10% (Grupo 4). Se establecieron como controles positivos 2 pastas dentales comerciales fluoradas de demostrada actividad remineralizante: Colgate total (Grupo 5) y Mi paste plus (Grupo 6). Se establecieron además los siguientes controles: PDB 100% (Grupo 7), Control ciclo erosivo, no pastas, conservación en saliva artificial (Grupo 8), Control no ciclo erosivo, no pastas (Grupo 9), Control ciclo erosivo, no pastas, conservación agua destilada (Grupo 10).

No se encontró diferencias significativas ($p > 0.05$) en cuanto a la intensidad del ión fosfato mediante Raman ν_1 , ni en la Dureza Vickers (Kg/mm^2) del esmalte de bovino, entre las diferentes pastas, las muestras de esmalte sano (grupo 9) a las que no se les realizó ataque ácido ni ningún tratamiento, ni las muestras del grupo 8 que recibieron el ataque ácido y fueron conservadas en saliva artificial. Pero si todas ellas, tienen diferencias significativas ($p < 0.05$) con el grupo 10 que fue sometido a ciclo erosivo y conservado en agua destilada. Este estudio in vitro muestra que tanto

la actividad remineralizante, como la microdureza superficial en esmalte de bovino, producida por las pastas experimentales a base de nanohidroxiapatita y quitosano, es similar a lo producido por las pastas Colgate total y MI Paste plus.

El presente estudio coincide con lo descrito en la literatura respecto del efecto remineralizante de la nanohidroxiapatita. Lo cual se puede apreciar tanto para la nanohidroxiapatita sintética obtenida por el método de coprecipitación descrito por Rusu et al en el año 2005 (Grupo 1) (45), como para la extraída de la caparazón de la concha de abanico (Grupo 2) y la nanohidroxiapatita comercial (Grupo 9).

La nanohidroxiapatita aumenta el grado de remineralización, especialmente en un ambiente ácido, al incrementar el suministro de iones de calcio y fósforo en la zona desmineralizada, como ha sido demostrado tanto en estudios de remineralización in vitro (77,80-82) como en ensayos clínicos en humanos (62-69). La base de aplicación de nHAp es que el equilibrio entre desmineralización y remineralización está controlado por la saturación salival de minerales de apatita y la mejora de los niveles salivales de calcio y las concentraciones de fosfato constituyen un método potencial para aumentar la remineralización en los dientes e inhibir la desmineralización (65). Así también se ha demostrado un aumento de la remineralización del esmalte después del uso de nanohidroxiapatita en pacientes postratamiento de ortodoncia (82).

La nanohidroxiapatita también mejora los niveles de calcio, lo cual ayudaría a limitar el desafío ácido, reduciendo la desmineralización del esmalte favoreciendo la remineralización. El depósito de fosfato de calcio puede contribuir a un estado de sobresaturación mineral del esmalte, disminuyendo así la desmineralización y

mejorando la remineralización (80). También se ha descubierto que la nHAp disminuye la susceptibilidad a la caries. (112), mejora la remineralización del esmalte (112), caries inhibida (81) y reducción de la desmineralización de la dentina (117). Posiblemente esto podría deberse a la deposición de un nuevo material homogéneo.

Capa superficial de apatita sobre la superficie desmineralizada (113), este mecanismo protege la base de la superficie enferma de una mayor desmineralización y promueve la remineralización (80).

Además, se ha descubierto que la pasta de dientes que contiene nHAp aumenta las concentraciones de calcio en la saliva (118) y oblitera los microporos en las superficies de los dientes (112, 119). Por lo tanto, las partículas de nHAp atraen una enorme cantidad de iones de calcio y fosfato de las soluciones circundantes (saliva, dentífricos y enjuagues bucales) al tejido dental, promoviendo la integridad y el crecimiento de los cristales (119).

De otro lado, el presente estudio coincide con lo descrito en la literatura respecto del efecto remineralizante del quitosano. Lo cual se puede apreciar tanto para la pasta con quitosano 10% (Grupo 3), como a la pasta dental de quitosano 10% asociada a hidroxiapatita 10% (Grupo 1), aunque con un efecto mayor en el grupo 3 que en el grupo 1.

Diversos estudios describen el papel del quitosano en la remineralización del esmalte, esto debido a su gran potencial para guiar y organizar la mineralización biomimética de los tejidos dentales duros, en la inhibición de la desmineralización

del esmalte previniendo la liberación de iones minerales y la infiltración de ácidos orgánicos (90).

El quitosano tiene afinidad por el esmalte desmineralizado debido a su carga positiva, lo que ayuda a la adhesión y penetración del quitosano en el esmalte; previene la precipitación espontánea en la superficie del esmalte y estimula el ingreso de los iones necesarios para la mineralización en la lesión profunda del esmalte facilitando una remineralización debajo de la superficie del esmalte más estable y a largo plazo (91,92)

También ha sido descrita la propiedad del quitosano para prevenir la precipitación espontánea de fosfato cálcico mediante la quelación de iones calcio, aspecto esencial para estabilizar el ACP y promover la producción de sus precursores (115,116).

El quitosano puede actuar como reservorio para la deposición de iones de calcio y fósforo, lo que ayuda a la remineralización del esmalte y también servir como un vehículo eficiente de administración de fármacos para agentes remineralizantes o antibacterianos aumentando su biodisponibilidad y preservando la eficacia del tratamiento por más tiempo, esto aunado a sus importante propiedad de respuesta al pH, amplía aún más su aplicación en la prevención y el tratamiento de la caries.

Para aprovechar las propiedades del quitosano, se han desarrollado una serie de productos para ayudar a remineralizar el esmalte dental y las lesiones de caries dental. Simeonov et al. crearon un microgel híbrido de quitosano/fosfato de calcio utilizando quitosano como plantilla para la deposición de fosfato de calcio en

muestras de dientes desmineralizados, el fosfato de calcio amorfo puede redisolverse en iones y luego depositarse en el sitio de la caries para facilitar la nucleación y el crecimiento del fosfato de calcio en la superficie del modelo de esmalte y la consiguiente remineralización de las lesiones de caries (100).

También se ha propuesto asociar el quitosano con el flúor, demostrando que el quitosano y el quitosano modificado (N-(2 (2,6-diaminohexanamida)-quitosano) presentan un fuerte efecto inhibidor sobre la liberación de iones fosfato de la superficie de la hidroxiapatita. El quitosano fluorado tiene un efecto comparable al fluoruro de sodio y también tiene una mayor actividad antibacteriana y una citotoxicidad muy baja (101).

En el presente estudio se seleccionó la concentración del 10% ya que es la concentración óptima de nHAp en dentífricos, y la más utilizada tanto en ensayos clínicos (81,85,87) como en estudios in vitro (80,107,110, 108,112,113)

La dureza superficial del esmalte desmineralizado (89) así como la tasa y la cantidad de precipitación de nHAp aumentan cuando se utilizan concentraciones más altas, debido a un aumento en la deposición de iones de calcio y fosfato (88), pero se ha demostrado que la concentración del 10% de nHAp es una concentración óptima por sus resultados similares al 15% que demostró ser eficaz para remineralización de caries tempranas del esmalte (88).

Los resultados obtenidos al evaluar el grado de mineralización mediante microscopia RAMAN y la microdureza superficial con Vickers en las 2 pastas utilizadas como control positivo: Colgate total y MI Paste Plus, corroboran lo descrito en la literatura, en cuanto al efecto remineralizante alcanzado. De hecho la

remineralización mediada por flúor es la piedra angular de las filosofías actuales del manejo de la caries, y la remineralización más profunda de las lesiones (20). En el presente estudio no se encontró diferencia significativa entre la remineralización lograda por las pastas experimentales y las pastas control fluoradas utilizadas a nivel experimental in vitro en dientes de bovino.

En el mercado, encontramos principalmente pastas dentales con flúor, pero también hay productos dentales remineralizantes sin flúor. Actualmente, la mayoría de los sistemas remineralizantes sin fluoruro disponibles comercialmente están destinados a mejorar la eficacia del fluoruro, minimizando los potenciales riesgos asociados con el flúor. Estos estudios son especialmente necesarios para los productos que ya están en el mercado como la nanohidroxiapatita (nHA), fosfopéptido de caseína – fosfato de calcio amorfo CPP-ACP, fosfato tricálcico, fosfosilicato de calcio y sodio, fosfatos de calcio amorfo (ACP), polifosfatos, trimetafosfato de sodio (24).

El presente estudio también muestra que la saliva sintética Salival® solución utilizada en este estudio tiene propiedades remineralizantes verificadas tanto en el grado de mineralización del esmalte como en la microdureza superficial en condiciones in vitro en esmalte de bovino previamente sometido a ciclo erosivo. Este efecto es similar al alcanzado por las pastas experimentales y a los controles positivos de las pastas comerciales fluoradas utilizadas en este estudio.

Los resultados coinciden con lo descrito por Carey (27), quién evaluó la remineralización ex vivo en dientes humanos usando la saliva artificial SalivaMAX® supersaturada de fosfato de calcio obteniendo un marcado aumento

en la remineralización, proporciona alivio para la xerostomía y la mucositis, permitiéndoles remineralizar las lesiones tempranas del esmalte.

De hecho este hallazgo coincide con lo descrito en la literatura pues la saliva es el agente remineralizante natural por excelencia (15), teniendo en cuenta que la desmineralización es un proceso reversible; por lo tanto, los cristales de hidroxiapatita (HA) parcialmente desmineralizados en los dientes pueden crecer hasta su tamaño original si están expuestos a ambientes orales que favorecen la remineralización (16). La saliva contiene minerales como el calcio y el fosfato en concentraciones adecuadas para remineralizar el esmalte dental. Distintos estudios mostraron que la sobresaturación de un sustituto de la saliva con calcio y fosfatos aumenta significativamente su capacidad para remineralizar las sustancias duras dentarias (17,18). En los últimos años se ha empezado a exigir un efecto remineralizante a los sustitutos de la saliva, suplementos de fluoruro y un contenido lo más elevado posible en calcio y fosfatos. (12).

De acuerdo con las especificaciones del Laboratorios LUSA; Salival® solución tiene en su composición por cada 100ml es: Cloruro de sodio (0.084gr.), Cloruro de potasio (0.120gr.), Cloruro de calcio dihidratado (0.015gr.), Cloruro de magnesio exahidratado (0.005 gr.), Carboximetil celulosa sódica (0.375 gr.), propilemglicol (4.000gr.), metilparabeno (0.100gr.), propil parabeno (0.010gr.) agua purificada c.s.p. (100.00 ml). En el presente estudio el efecto remineralizante logrado por Salival® solución, muestra el importante efecto mineralizante, que no difiere significativamente con la situación inicial previa al inicio del ciclo ácido lográndose la remineralización del esmalte. De otro lado contrasta

significativamente con la muestra control que fue conservada en agua destilada, donde se nota la fuerte desmineralización producida por el ácido cítrico.

Los resultados de este estudio muestran comparativamente con las pastas comerciales que el efecto del uso de la saliva artificial utilizada en este estudio confiere efecto similar a lo obtenido por pastas dentales con fluor y con CPP-ACP, desde el punto de vista de la remineralización del esmalte. Los resultados muestran mayor remineralización en el grupo expuesto sólo a la saliva sintética.

Es de hacer notar que las muestras que fueron sometidas a las pastas dentales tuvieron proceso de cepillado luego de cada ataque ácido antes de ser sometidas a saliva artificial y que el cepillado con un cepillo eléctrico pudo haber generado cierta pérdida adicional de minerales, en relación a cepillos mecánicos. (25,26)

Finalmente se aprecia consistencia en los resultados obtenidos con los ensayos escogidos para evaluar el efecto remineralizante de las pastas dentales experimentales y controles en esmalte bobino erosionado tanto en microdureza superficial como en la recuperación del área mineralizada y la intensidad de mineral.

VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

VIII.1 Conclusiones

1 Este estudio in vitro muestra que:

La pasta experimental a base de nanohidroxiapatita y quitosano (nHAP/Q), tiene potencial remineralizante en el esmalte bovino erosionado.

- La pasta experimental a base de nanohidroxiapatita extraída del caparazón de la Concha de Abanico, tiene potencial remineralizante en el esmalte bovino erosionado.
- La pasta experimental a base de quitosano, tiene potencial remineralizante en el esmalte bovino erosionado.
- La pasta experimental a base de nanohidroxiapatita comercial, tiene potencial remineralizante en el esmalte bovino erosionado.

2 El efecto remineralizante de las 4 pastas dentales experimentales evaluadas a base de nanohidroxiapatita y quitosano, nanohidroxiapatita extraída de la Concha de Abanico, Quitosano y Nanohidroxiapatita comercial es similar a las pastas comerciales control utilizadas en el estudio, en condiciones in vitro tanto en microdureza superficial como en la recuperación del área mineralizada y la intensidad de mineral.

VIII.2 Recomendaciones

- Continuar con los estudios in vivo y explorar dosis y vehículos más eficientes y eficaces, para optimizar el uso de nHAp y la saliva artificial

como alternativa y o complemento para la remineralización y para combatir la erosión dental y las lesiones incipientes de caries dental.

- Continuar con la línea de investigación ampliándolo a los efectos de estas nuevas formulaciones en dentina.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Schlueter N, Amaechi BT, Bartlett D, Buzalaf MAR, Carvalho TS, Ganss C, et al. Terminology of Erosive Tooth Wear: Consensus Report of a Workshop Organized by the ORCA and the Cariology Research Group of the IADR. *Caries Res.* 2020;54(1):2-6. doi: 10.1159/000503308. Epub 2019 Oct 14. PMID: 31610535..
2. Ganss C. Definition of erosion and links to tooth wear. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:9-16. doi: 10.1159/000093344. PMID: 16687881.
3. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:2-12. doi: 10.1159/000325915. Epub 2011 May 31. PMID: 21625128.
4. Fajardo-Santacruz MC, Mafla-Chamorro AC. (2011). Diagnóstico y epidemiología de erosión dental. *Salud UIS*, 43(2). Recuperado a partir de <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/article/view/2403>
5. Torres D, Fuentes R, Bornhardt T, Iturriaga V. Erosión dental y sus posibles factores de riesgo en niños: revisión de la literatura. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* [Internet]. 2016 Abr [citado 2024 Feb 14] ; 9(1): 19-24. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-

01072016000100004&lng=es.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.piro.2015.09.002..>

6. Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res.* 2004;38 Suppl 1:34-44. doi: 10.1159/000074360. PMID: 14685022.
7. Dipalma G., Inchingolo AD, Inchingolo F, Charitos IA, Cosola M.D, Cazzolla AP. Focus on the Cariogenic Process: Microbial and Biochemical Interactions with Teeth and Oral Environment. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 2021, 35, 429–440.
8. Castellanos J, Marín L, Ugusa M, Castiblanco G, Martignon S, La remineralización del esmalte bajo el entendimiento actual de la caries dental. *Universitas Odontológica*. [Internet] 2013 Jul-Dic; 32(69); 49-59. Disponible en <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/revUnivOdontologica/article/view/SICI%3A%202027-3444%28201307%2932%3A69%3C49%3AREEACD%3E2.0.CO%3B2-P>
9. Farooq I, Bugshan A. The role of salivary contents and modern technologies in the remineralization of dental enamel: a narrative review. *F1000Res.* 2020 Mar 9;9:171. doi: 10.12688/f1000research.22499.3. PMID: 32201577; PMCID: PMC7076334..

10. Hara AT, Kelly SA, González-Cabezas C, Eckert GJ, Barlow AP, Mason SC, Zero DT. Influence of fluoride availability of dentifrices on eroded enamel remineralization in situ. *Caries Res.* 2009;43(1):57-63. doi: 10.1159/000201591. Epub 2009 Feb 10. PMID: 19204389..
11. Abou-Neel EA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM, Bozec L, Mudera V. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine.* 2016 Sep 19;11:4743-4763. doi: 10.2147/IJN.S107624. PMID: 27695330; PMCID: PMC5034904..
12. Espinoza R.; Bayardo R, Mercado A, Ceja I, Igarashi C, Alcalá J. Efecto de los sistemas fluorados en la remineralización de las lesiones cariosas incipientes del esmalte, estudio in situ. *Revista de operatoria dental y biomateriales.* [Internet] 2014. Vol III, N°1.. Disponible en <https://www.rodyb.com/wp-content/uploads/2013/12/vol-3-2-REMINERALIZACION1.pdf>
13. Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Randomised in situ study on the efficacy of a tin/chitosan toothpaste on erosive-abrasive enamel loss. *Caries Res.* 2013;47(6):574-81. doi: 10.1159/000351654. Epub 2013 Aug 17. PMID: 23969953.
14. Philip N. State of the Art Enamel Remineralization Systems: The Next Frontier in Caries Management. *Caries Res.* 2019;53(3):284-295. doi: 10.1159/000493031. Epub 2018 Oct 8. PMID: 30296788; PMCID: PMC6518861.

15. Solis Y, Peniche C, García R, Davidenko N. Un procedimiento biomimético novedoso para obtener composites de quitosana-hidroxiapatita. [Internet] 2014 VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería. Habana.2007. Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/268344509>
16. Aykut-Yetkiner A, Attin T, Wiegand A. Prevention of dentine erosion by brushing with anti-erosive toothpastes. *J Dent*. 2014 Jul;42(7):856-61. doi: 10.1016/j.jdent.2014.03.011. Epub 2014 Apr 2. PMID: 24704085.
17. Dündar A, Şengün A, Başlak C, Kuş M. Effects of citric acid modified with fluoride, nano-hydroxyapatite and casein on eroded enamel. *Arch Oral Biol*. 2018 Sep;93:177-186. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.06.009. Epub 2018 Jun 15. PMID: 29933139.
18. Gopinath NM, John J, Nagappan N, Prabhu S, Kumar ES. Evaluation of Dentifrice Containing Nano-hydroxyapatite for Dentinal Hypersensitivity: A Randomized Controlled Trial. *J Int Oral Health*. 2015 Aug;7(8):118-22. PMID: 26464553; PMCID: PMC4588776..
19. Lombardini M, Ceci M, Colombo M, Bianchi S, Poggio C. Preventive effect of different toothpastes on enamel erosion: AFM and SEM studies. *Scanning*. 2014 Jul-Aug;36(4):401-10. doi: 10.1002/sca.21132. Epub 2013 Dec 11. PMID: 24374971.

20. Lelli M, Puntignano A, Marchetti M, Foltran I, Mangani, F, Protaccini M, Roveri N, et al. Remineralization and repair of enamel surface by biomimetic Zn-Carbonate Hydroxyapatite containing toothpaste: a comparative in vivo study. *Frontiers in Physiology*. 2014.Vol5 article 333.
21. Hiller K-A, Buchalla W, Grillmeier I, Neubauer C, Schmalz G. In vitro effects of hydroxyapatite containing toothpastes on dentin permeability after multiple applications and ageing. *Sci Rep*. 2018;8(1):4888.
22. Cantin M, Vilos C, Suazo I. Nanodontología: El futuro de la Odontología Basada en sistemas Nanotecnológicos. *Int. J. Odontostomat*. 2010;4(2):127-32.
23. Esteves-Oliveira M, Santos N, Meyer-Luckal, H, et al. Caries preventive effect of anti-erosive and nano- hydroxyapatite containing toothpastes in vitro. *Clin Oral Invest*. 2017. Vol21, 291-300.
24. García-Garduño MV, Reyes-Gasga J. La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *Tip revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2006;9(2).
25. Enax J, Epple M. Synthetic Hydroxyapatite as a Biomimetic Oral Care Agent. *Oral Health Prev. Dent*. 2018, 16, 7–19.
26. Roveri N, Battistella E, Bianchi CL, Foltran I, Foresti E, Iafisco M, Lelli, M, Naldoni A, Palazzo B, Rimondini L. Surface Enamel

- Remineralization: Biomimetic Apatite Nanocrystals and Fluoride Ions
Different Effects. *J. Nanomater.* 2009, 2009, e746383.
27. Pajor K, Pajchel L, Kolmas J. Hydroxyapatite and Fluorapatite in Conservative Dentistry and Oral Implantology—A Review. *Materials* 2019, 12, 2683.
 28. Husain K, Al-Samadani K, Najeeb S, Zafar M, Khurshid Z, Zohaib S, Qasim S. Chitosan biomaterials for current and potential Dental applications. *Materials* 2017, 10, 602
 29. Ozalp S, Tulunoglu, O. SEM–EDX analysis of brushing abrasion of chitosan and propolis based toothpastes on sound and artificial carious primary enamel surfaces. *Int. J. Paediatr. Dent.* 2014, 24, 349–357.
 30. Ganss C, Klimek J, Schlueter N. Erosion/abrasion-preventing potential of NaF and F/Sn/chitosan toothpastes in dentine and impact of the organic matrix. *Caries Res.* 2014, 48, 163–169.
 31. Carvalho T, Lussi, A. Combined effect of a fluoride-, stannous-and chitosan-containing toothpaste and stannous-containing rinse on the prevention of initial enamel erosion–abrasion. *J. Dent.* 2014, 42, 450–459
 32. Schlüter N, Klimek J, Ganss C. Effect of a chitosan additive to a Sn²⁺-containing toothpaste on its anti-erosive/anti-abrasive efficacy—A controlled randomised in situ trial. *Clin. Oral Investig.* 2014, 18, 107–115.

33. Ruan Q, Siddiqah,N, Li,X, Nutt,S, Moradian-Oldak J. Amelogenin—Chitosan matrix for human enamel regrowth: Effects of viscosity and supersaturation degree. *Connect. Tissue Res.* 2014, 55, 150–154
34. Choi,BK, Kim KY, Yoo YJ, Oh SJ, Choi JH, Kim CY. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2001, 18, 553–557
35. Peniche C, Solís Y, Davidenko N, García R,. Materiales compuestos de quitosana e hidroxiapatita. *Biotecnología Aplicada* 2010;27:192-201
36. Dhivya S, Saravanan S, Sastry T, and Selvamurugan, N. Nanohydroxyapatite-reinforced chitosan composite hydrogel for bone tissue repair in vitro and in vivo. *J Nanobiotechnol* (2015) 13:40
37. Elieh-Ali-Komi D, and Hamblin M. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *Int J Adv Res (Indore)*. 2016 March ; 4(3): 411–427.
38. Suriya I, Gunawan A. and Amir L. Effect of chitosan on the enamel demineralization process in vitro: an enamel solubility test. *IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series* 1073 (2018) 052005
39. Cabrel S. Influencia del pH en la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) a partir de un hydrogel a base β -Quitosano. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico. Perú. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima Perú. 2018.

40. Yamaguchi I, Tokuchi K, Fukuzaky H, Koyama Y, Takakuda K, Momna H, et al. Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites. *J Biomed Mater Res* 2001;55:20–7.
41. Yamaguchi I, Tokuchi K, Fukuzaky H, Koyama Y, Takakuda K, Momna H, et al. Preparation and mechanical properties of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites. *Key Eng Mater* 2001;192–195:673–6.
42. Hu Q, Li B, Wang M, Shen J. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials* 2004;25(5):779–85.
43. Chang MC, Ko CC, Douglas WH. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposites. *Biomaterials* 2003;24(17):2853–62.
44. Salgado-Delgado A, Vargas-Galarza Z, Salgado-Delgado R, García-Hernández A, Hernández-Díaz Rubio-Rosas W, et al. Caracterización morfológica y térmica de un biomaterial compuesto de alta porosidad phema-quitosano-cerámica (hidroxiapatita). *Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 15, No. 2 (2016)* 625-632
45. Rusu V, Ng, C, Wilke, M, Tiersh B, Fratzl, P, Peter, M. Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic-inorganic composite materials. *Biomaterials*. 26 (2005)5414-5426.

46. Franca¹ J. De Luca M, Ribeiro, T, Castilho R, Moreira A, Santos, V. et al. Propolis - based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. *Complementary and Alternative Medicine* 2014, 14:478.
47. Van Der Mei HC, Henny C, ngels, E, De Vries J, Dijkstra, R.J.; Busscher, H.J. Chitosan adsorption to salivary pellicles. *Eur. J. Oral Sci.* 2007, 115, 303–307.
48. Iijima M, Kawaguchi K, Kawamura, N; Ito, S,, Saito, T; and Mizoguchi, I. The effects of single application of pastes containing ion-releasing particles on enamel demineralization. *Dental Materials Journal* 2017; 36(4): 461–468.
49. Tschoppe P, Zandim D, Martus P, Kielbassa, A. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *journal of dentistry*: 39(2011)430–437.
50. Appel G, Réus M, *Formulaciones Aplicadas a Odontología*. Segunda Edicion. RCN Editora. Sao Paulo 2005. 139-189
51. Grocholewicz K, Matkowska-Cichocka G, Makowieck P, Dro´ zdzik A, Ey-Chmielewska H, Dziewulska A, Tomasik M, et al. Effect of Nano-Hydroxyapatite and Ozone on Approximal Initial Caries: A Randomized Clinical Trial. *Sci. Rep.* 2020, 10, 11192. [CrossRef]
52. Huang S, Gao S, Cheng, L, Yu, H. Combined Effects of Nano-Hydroxyapatite and *Galla Chinensis* on Remineralisation of Initial Enamel Lesion in Vitro. *J. Dent.* 2010, 38, 811–819.

53. Jeong SH, Jang SO, Kim KN, Kwon HK, Park YD, Kim BI. Remineralization Potential of New Toothpaste Containing Nano-Hydroxyapatite. *Key Eng. Mater* 2006, 309–311 I, 537–540.
54. Badiie M, Jafari N, Fatemi S, Ameli N, Kasraei S, Ebadifar A. Comparison of the Effects of Toothpastes Containing Nanohydroxyapatite and Fluoride on White Spot Lesions in Orthodontic Patients: A Randomized Clinical Trial. *Dent. Res. J.* 2020, 17, 354–359.
55. Dai Z, Liu M, Ma Y, Cao L, Xu HHK, Zhang K, et al. Effects of Fluoride and Calcium Phosphate Materials on Remineralization of Mild and Severe White Spot Lesions. *BioMed Res. Int.* 2019, 2019, e1271523.
56. Pepla E, Besharat LK, Palaia G, Tenore G, Migliau G. Nano-Hydroxyapatite and Its Applications in Preventive, Restorative and Regenerative Dentistry: A Review of Literature. *Ann. Stomatol.* 2014, 5, 108–114.
57. Shen P, Bagheri R, Walker GD, Yuan Y, Stanton DP, Reynolds C, et al. Effect of Calcium Phosphate Addition to Fluoride Containing Dental Varnishes on Enamel Demineralization. *Aust. Dent. J.* 2016, 61, 357–365.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/adj.12385>
58. Cross KJ, Huq NL, Stanton DP, Sum M, Reynolds EC NMR Studies of a Novel Calcium, Phosphate and Fluoride Delivery Vehicle-Alpha

- (S1)-Casein (59-79) by Stabilized Amorphous Calcium Fluoride Phosphate Nanocomplexes. *Biomaterials* 2004, 25, 5061–5069.
59. Badiie M, Jafari N, Fatemi S, Ameli N, Kasraei S, Ebadifar A. Comparison of the Effects of Toothpastes Containing Nanohydroxyapatite and Fluoride on White Spot Lesions in Orthodontic Patients: A Randomized Clinical Trial. *Dent. Res. J.* 2020, 17, 354–359.
 60. Beerens MW, ten Cate JM, Buijs MJ, Van der Veen MH, Long-Term Remineralizing Effect of MI Paste Plus on Regression of Early Caries after Orthodontic Fixed Appliance Treatment: A 12-Month Follow-up Randomized Controlled Trial. *Eur. J. Orthod.* 2018, 40, 457–464.
 61. Hamdi K, Hamama HH, Motawea A, Fawzy A, Mahmoud SH. Long-Term Evaluation of Early-Enamel Lesions Treated with Novel Experimental Tricalcium Silicate Paste: A 2-Year Randomized Clinical Trial. *J. Esthet. Restor. Dent.* 2022, 34, 1113–1121.
 62. Heravi F, Ahrari F, Tanbakuchi B. Effectiveness of MI Paste Plus and Remin Pro on Remineralization and Color Improvement of Postorthodontic White Spot Lesions. *Dent. Res. J.* 2018, 15, 95–103.
 63. Silva VM, Massaro C, Buzalaf MAR., Janson G, Garib D. Prevention of Non-Cavitated Lesions with Fluoride and Xylitol Varnishes during Orthodontic Treatment: A Randomized Clinical Trial. *Clin. Oral Investig.* 2021, 25, 3421–3430.

64. Bröseler F, Tietmann C, Bommer C, Drechsel T, Heinzel-Gutenbrunner M, et al. Randomised Clinical Trial Investigating Self-Assembling Peptide P11-4 in the Treatment of Early Caries. *Clin. Oral Investig.* 2020, 24, 123–132.
65. Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC. Enamel Subsurface Lesion Remineralisation with Casein Phosphopeptide Stabilised Solutions of Calcium, Phosphate and Fluoride. *Caries Res.* 2008, 42, 88–97.
66. Srinivasan N, Kavitha M, Loganathan SC. Comparison of the Remineralization Potential of CPP-ACP and CPP-ACP with 900 Ppm Fluoride on Eroded Human Enamel: An in Situ Study. *Arch. Oral Biol.* 2010, 55, 541–544.
67. Malcangi G, Patano A, Morolla R., De Santis M, Piras F, Settanni V, et al. Analysis of Dental Enamel Remineralization: A Systematic Review of Technique Comparisons. *Bioengineering* 2023, 10, 472. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10040472>
68. Grocholewicz K, Matkowska-Cichocka G, Makowiecki P, Drożdżik A, Ey-Chmielewska, H, Dziewulska A, et al. Effect of Nano-Hydroxyapatite and Ozone on Approximal Initial Caries: A Randomized Clinical Trial. *Sci. Rep.* 2020, 10, 11192.
69. Al-Batayneh OB, Bani Hmood EI, Al-Khateeb SN. Assessment of the Effects of a Fluoride Dentifrice and GC Tooth Mousse on Early Caries Lesions in Primary Anterior Teeth Using Quantitative Light-Induced

- Fluorescence: A Randomised Clinical Trial. *Eur. Arch. Paediatr. Dent.* 2020, 21, 85–93.
70. Poggio C, Gulino C, Mirando M, Colombo M, Pietrocola G. Protective effect of zinc-hydroxyapatite toothpastes on enamel erosion: An in vitro study. *J Clin Exp Dent.* 2017; 9(1):e118-e122.
 71. Bossù M, Saccusi M, Salucci A, Di Giorgio, Bruni E, Uccelletti D, et al. Enamel remineralization and repair results of biomimetic hydroxyapatite toothpaste on deciduous teeth: an effective option to fluoride toothpaste. *J Nanobiotechnol.* 2019; 17(1):1-13.
 72. Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. Dental Enamel Formation and Implications for Oral Health and Disease. *Physiol. Rev.* 2017, 97, 939–993.
 73. Nanci A, Ten Cate's. *Oral Histology-E-Book: Development, Structure, and function.* 8th Edición. Canada: Elsevier Health Sciences; 2017
 74. Ganss B, Abbain N, Maturation and beyond: proteins in the developmental continuum from enamel epithelium to functional epithelium. *Frontiers in physiology.* 2014.
 75. De Ferraris MEG, Muñoz AC. *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental.* 3ª Ed. México Médica: Editorial Médica Panamericana; 2009.

76. Schlueter N, Amaechi BT, Bartlett D, Buzalaf MAR, Carvalho TS, Ganss C, Hara AT, et al. Terminology of Erosive Tooth Wear: Consensus Report of a Workshop Organized by the ORCA and the Cariology Research Group of the IADR. *Caries Res.* 2020;54(1):2-6. doi: 10.1159/000503308.
77. Pioggio C, Mirando M, Rattalino D, Viola M, Colombo M, Beltrami R. Protective effect of Zinc- hydroxyapatite tooth pastes on enamel erosion: An in vitro study. *Journal Clin Exp Dental.* 2017; 9(1):e118-22.
78. Barbero JG. *Patología y terapéutica dental.* 2ª ed. España: Elsevier ; 2014
79. Zafar MS, Ahmed N. The effects of acid etching time on surface mechanical properties of dental hard tissues, *Dent. Mater. J.* 2015, 34. 315-320.
80. Huang S, Gao S, Cheng L, Yu H. Remineralization potential of nano-hydroxyapatite on initial enamel lesions: An in vitro study. *Caries Res.* 2011, 45, 460–468.
81. Najibfard K, Ramalingam K, Chedjieu I, Amaechi BT. Remineralization of early caries by a nano-hydroxyapatite dentifrice. *J. Clin. Dent.* 2011, 22, 139–143.
82. Carey CM, Remineralization of Early Enamel Lesions with Apatite-Forming Salt. *Dent. J.* 2023, 11, 182. <https://doi.org/10.3390/dj11080182>

83. Adzila S, Sopyan I, Shukor BA, Hamdi M, editors. Mechanochemical synthesis of hydroxyapatite monopowder: Effects of rotation speed and milling time on powder properties. *Applied Mechanics and Materials*. 2012; 110(116):3639-3644.
84. Amaechi BT, Lemke KC, Saha S, Luong MN, Gelfond J. Clinical efficacy of nanohydroxyapatite-containing toothpaste at relieving dentin hypersensitivity: An 8 weeks randomized control trial. *BDJ Open* 2021, 7, 23.
85. Wang L, Magalhaes AC, Francisconi-Dos-Rios L.F, Calabria MP, Araujo D, Buzalaf M, et al. Treatment of dentin hypersensitivity using nano-hydroxyapatite pastes: A randomized three-month clinical trial. *Oper Dent*. 2016, 41, E93–E101.
86. Amaechi B.T, Mathews SM, Ramalingam K, Mensinkai PK. Evaluation of nanohydroxyapatite-containing toothpaste for occluding dentin tubules. *Am. J. Dent*. 2015, 28, 33–39.
87. Grocholewicz K, Matkowska-Cichocka G, Makowiecki P, Drozdzik A, Ey-Chmielewska H, Dziewulska A, et al. Effect of nano-hydroxyapatite and ozone on approximal initial caries: A randomized clinical trial. *Sci. Rep*. 2020, 10, 11192.
88. Huang SB, Gao SS, Yu HY. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomed. Mater*. 2009, 4, 34104.

89. Kim M, Kwon H, Choi CH, Kim B. Combined effects of nano-hydroxyapatite and naf on remineralization of early caries lesion. In Key Engineering Materials; Trans Tech Publications Ltd.: Freienbach, Switzerland, 2007; pp. 1347–1350.
90. Stamford Arnaud TM, De Barros Neto B, Diniz FB. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization: an in vitro evaluation. J. Dent. 2010; 38 (11), 848–852. 10.1016/j.jdent.2010.06.004
91. Zhang J, Lynch R.JM, Watson TF, Banerjee A. Remineralisation of enamel white spot lesions pre-treated with chitosan in the presence of salivary pellicle. J. Dent. 2018a. 72, 21–28. 10.1016/j.jdent.2018.02.004
92. Nimbeni SB, Nimbeni BS, Divakar DD. Role of chitosan in remineralization of enamel and dentin: A systematic review. Int. J. Clin. Pediatr. Dent. 2021;14 (4), 562–568. 10.5005/jp-journals-10005-1971
93. Younes I and Rinaudo M. Chitin and Chitosan preparation from marina sources: Structure, properties and applications. Mar Drugs. 2015, 13, 1133-1174.
94. Qu S, Ma X, Yu S, Wang R. Chitosan as a biomaterial for the prevention and treatment of dental caries: antibacterial effect, biomimetic mineralization, and drug delivery. Front Bioeng Biotechnol. 2023 Sep 29; 11:1234758. doi: 10.3389/fbioe.2023.1234758.

95. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Shafi ME, Zabermawi NM, Arif M, Batiha GE, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020; 164, 2726–2744. 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.153
96. Calero N, Munoz J, Ramirez P, Guerrero A. Flow behaviour, linear viscoelasticity and surface properties of chitosan aqueous solutions. *Food Hydrocoll.* 2010; 24 (6-7), 659–666. 10.1016/j.foodhyd.2010.03.009
97. Pichaiaukrit W, Thamrongananskul N, Siralertmukul K, Swasdison S. (2019). Fluoride varnish containing chitosan demonstrated sustained fluoride release. *Dent. Mater. J.* 2018; 38 (6), 1036–1042.
98. Stenhagen ISR, Rukke HV, Dragland IS, Kopperud HM.. Effect of methacrylated chitosan incorporated in experimental composite and adhesive on mechanical properties and biofilm formation. *Eur. J. Oral Sci.* 2019; 127 (1), 81–88. 10.1111/eos.12584
99. Wang J, Liu Z, Ren B, Wang Q, Wu J, Yang N, et al.. Biomimetic mineralisation systems for in situ enamel restoration inspired by amelogenesis. *J. Mater. Science-Materials Med.* 2021; 32 (9), 115. 10.1007/s10856-021-06583-x
100. Simeonov M, Gussiyska A, Mironova J, Nikolova D, Apostolov A, Sezanova K, et al.. Novel hybrid chitosan/calcium phosphates

- microgels for remineralization of demineralized enamel - a model study. *Eur. Polym. J.* 2019;119, 14–21.
- 101.Rahayu DP, Draheim R, Lalatsa A, Roldo M, Harnessing the antibacterial properties of fluoridated chitosan polymers against oral biofilms. *Pharmaceutics*. 2022; 14 (3), 488. 10.3390/pharmaceutics14030488
- 102.Huang Z, Qi Y, Zhang K, Gu L, Guo J, Wang R, Mai S. Use of experimental-resin-based materials doped with carboxymethyl chitosan and calcium phosphate microfillers to induce biomimetic remineralization of caries-affected dentin. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2019 Jan;89:81-88. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.09.008.
- 103.Smith P1 , Arancibia R1 , Martínez J2 Empleo de Agentes Farmacológicos en Dentífricos como Moduladores de la Infección e Inflamación Periodontal. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*, 2008. Vol 1(3); 101-103.
- 104.Moreno-Rabie Catalina, Scharager-Lewin Daniel, Aranguiz Vicente. Uso de dentífricos y colutorios para el control de la hipersensibilidad dentinaria en adultos: una revisión narrativa. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* [Internet]. 2018 Dic [citado 2024 Ene 31; 11(3)]: 177-183. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-01072018000300177>.
- 105.Celis-Quintana G, Rodríguez A, Torres-Rosas R, Argueta-Figueroa, L. Evidencia sobre el efecto anticariogénico de pastas dentales que

- contienen arginina: una revisión sistemática. *Investigación Clínica*. 2021; 62. 169-188. 10.22209/IC.v62n2a07.
106. Ordoñez LF, Estrada DM, Tay Chu Jon LY. Adhesión después del uso de dentífricos. Una revisión de la literatura. *Revista Estomatológica Herediana [Internet]*. 17ago.2017; 27(2):116.
107. Kasemkhun P, Rirattanapong P. The efficacy of non-fluoridated toothpastes on artificial enamel caries in primary teeth: An in vitro study. *J. Int Soc. Prev. Community Dent*. 2021, 11, 397–401.
108. Juntavee A, Juntavee N, Hirunmoon P. Remineralization potential of nanohydroxyapatite toothpaste compared with tricalcium phosphate and fluoride toothpaste on artificial carious lesions. *Int J. Dent*. 2021; 5588832.
109. Manchery N, John J, Nagappan N, Subbiah GK, Premnath, P. Remineralization potential of dentifrice containing nanohydroxyapatite on artificial carious lesions of enamel: A comparative in vitro study. *Dent. Res. J. (Isfahan)* 2019, 16, 310–317.
110. Verma P, Muthuswamy Pandian, S. Bionic effects of nano hydroxyapatite dentifrice on demineralised surface of enamel post orthodontic debonding: In-vivo split mouth study. *Prog. Orthod*. 2021, 22, 39.
111. Posada M, Sanchez C, Gallego G, Pelaez A, Restrepo L, Lopez J. Dientes de bobino como sustituto de dientes humanos para su uso en

la odontología.Revisión de la literatura. Revista CES Odontología
Vol 19.Nº1 2006

- 112.Hwang JM., Kang JO, Park Yd, Choi Y. Research About Bovine Teeth Brightness with Using Dentifrice Slurry Including Nano-Hydroxyapatite. In Proceedings of the 2010 3rd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics, Yantai, China, 16–18 October 2010; pp. 1958–1960.
- 113.Hammad SM, El-Wassefy NA, Alsayed MA. Evaluation of color changes of white spot lesions treated with three different treatment approaches: An in-vitro study. Dent. Press J. Orthod. 2020; 25:26–27. doi: 10.1590/2177-6709.25.1.27.e1-7.
- 114.Mohanty B, Dadlani D, Mahoney D, Mann A. Characterizing and Identifying Incipient. Carious Lesions in Dental Enamel Using Micro-Raman Spectroscopy. Caries Res 2013; 47:27–33.
- 115.Chen Z, Cao S, Wang H, Li Y, Kishen A, Deng X, et al.. Biomimetic remineralization of demineralized dentine using scaffold of cmc/acp nanocomplexes in an in vitro tooth model of deep caries. Plos One. 2015;10 (1), e0116553. 10.1371/journal.pone.0116553
- 116.Hashmi A, Zhang X, Kishen A. (2019). Impact of dentin substrate modification with chitosan-hydroxyapatite precursor nanocomplexes on sealer penetration and tensile strength. J. Endod. 2019; 45 (7), 935–942. 10.1016/j.joen.2019.03.021.

117. Leal A.M.C, Beserra Dos Santos MV, Da Silva Filho EC, Menezes de Carvalho AL, Tabchoury CPM., Vale G.C. Development of an experimental dentifrice with hydroxyapatite nanoparticles and high fluoride concentration to manage root dentin demineralization. *Int. J. Nanomed.* 2020; 15:7469–7479. doi: 10.2147/IJN.S264754.
118. Schäfer F, Beasley T, Abraham P. In vivo delivery of fluoride and calcium from toothpaste containing 2% hydroxyapatite. *Int. Dent. J.* 2009, 59, 321- 324.
119. Bajaj M, Poornima P, Praveen S, Nagaveni NB, Roopa KB, Neena, IE, Bharath KP. Comparison of cpp-acp, tri-calciumphosphate and hydroxyapatite on remineralization of artificial caries like lesions on primary enamel—An in vitro study. *J. Clin Pediatr. Dent.* 2016, 40, 404–409.

ANEXOS

Cuadro de Operacionalización de variables.

VARIABLES	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACION AL	TIPO	ESCALA DE MEDICION	VALORES Y CATEGORIAS
GRADO DE MINERALIZACIÓN (Dependiente)	Grado de mineralización del esmalte definida con microscopia RAMAN Confocal	Evalúa la presencia e intensidad de grupos fosfato en el esmalte dental. B1 pico posición 960	cuantitativa	Continua	Cantidad de mineral relativa (%)
MICRODUREZA (Dependiente)	Resistencia superficial de un material a sufrir deformaciones plásticas al recibir una fuerza.	Operacionalmente se calculará la diferencia de microdureza inicial y final mediante microdurometro vickers	cuantitativa	Variable y de razón.	kgf/mm ²
GRUPO DE TRATAMIENTO (Independiente)	Grupos que recibirán un tratamiento diferenciado de los otros grupos.	Grupos de dientes que recibirán un tratamiento diferenciado de los otros grupos	Cualitativa	Nominal politómica	Grupo 1: Pasta dental base 80% + nHAp 10% + Quitosano 10% Grupo 2: Pasta dental base 90%

		luego del ataque ácido. Son 7 grupos de 10 dientes cada uno diferenciados por la presencia y concentración de agentes remineralizantes , nanohidroxiapatita y quitosano utilizado en la pasta dental..			+ nHAp Concha de Abanico 10% Grupo 3 : Pasta dental base 90% + Quitosano 10% Grupo 4: Pasta dental base 90% + nHAp comercial 10% Grupo 5: Pasta dental comercial con fluor Colgate total® Grupo 6: Pasta dental comercial con CPP- ACPF Mi paste plus™ Grupo 7: Pasta dental base 100% Grupo8: Control no pastas. Conservado en Saliva artificial. Salival Grupo 9: Control no
--	--	---	--	--	--

					pastas. No ciclo erosivo Grupo 10 Control no pastas, solo ciclo erosivo. Conservado en agua destilada
--	--	--	--	--	--

