



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

**EFFECTIVIDAD DE PASTA
EXPERIMENTAL A BASE DE
NANOHIPOXIPATITA OBTENIDA
DE LA CÁSCARA DE HUEVO EN LA
OBLITERACIÓN DE TÚBULOS
DENTINARIOS**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN ESTOMATOLOGÍA

KARINA HUAMAN MUJICA

LIMA - PERÚ

2020

ASESOR

Ph. D. Lidia Yileng Tay Chu Jon

Departamento Académico de Clínica Estomatológica

JURADO DE TESIS

DR. JORGE LUIS CASTILLO CEVALLOS

PRESIDENTE

DR. JORGE ARTURO BELTRAN SILVA

VOCAL

DRA. ROSA ANA MELGAR HERMOZA

VOCAL

DRA. MARIA ELENA DIAZ PIZAN

SECRETARIO (A)

DEDICATORIA

Dedicado a Dios, por su infinita bondad.

A mis padres, Sara Mariela Mujica Mostacero y José María Huamán

Ruiz, mi admiración, ejemplo y mi gratitud eterna.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial a mi asesora Ph. D. Lidia Yileng Tay Chu Jon, por el tiempo y el esfuerzo que dedicó para compartir sus conocimientos, al Ph. D. John Alexis Domínguez por su dedicación para impartir su cátedra de tal forma que lo aprendido sea utilizado en la vida real, al Físico Ph. D.(c). José Castañeda por su gran compromiso y apoyo constante con la investigación.

A Carlos Daniel Alva Vela, mi compañero inseparable, por todo su amor incondicional, comprensión y fuente de sabiduría, calma y consejo en todo momento.

A mis grandes compañeros del doctorado Vanessa Bermúdez García y Erwin Gonzales Posada, por su perseverancia y motivación

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Tesis Autofinanciada

TABLA DE CONTENIDOS

**RESUMEN
ABSTRACT**

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
II.1. Dentina	3
II.2.1. Composición química	3
II.2.2. Componentes estructurales de la dentina	4
II.2.3. Túbulos dentinarios	4
II.2. Hidroxiapatita	5
II.3.1. Composición química	6
II.3.2. Obtención de hidroxiapatita	6
II.3.2.1. Origen natural	7
II.3.2.2. Origen sintético	7
II.3.2.3. Síntesis de hidroxiapatita a partir de la cáscara de huevo	7
II.3. Aplicaciones de la hidroxiapatita	7
II.4. La nanotecnología en la odontología	8
II.5. Obliteración de túbulos dentinarios	9
II.6. Antecedentes	11
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVOS	22
IV.1. Objetivo general	22
IV.2. Objetivos específicos	22

V. MATERIALES Y MÉTODOS	23
V.1. Caracterización de nanohidroxiapatita	23
V.2. Formulación de pastas a base de nanohidroxiapatita	26
V.3. Evaluación de las pastas experimentales	28
V.3.1. Diseño del estudio	28
V.3.2. Muestra	29
V.3.2.1. Criterios de selección	30
V.3.3. Variables	30
V.3.4. Técnicas y procedimientos	32
V.3.5. Plan de análisis	37
V.4. Consideraciones éticas	38
VI. RESULTADOS	40
VII. DISCUSIÓN	50
VIII. CONCLUSIONES	58
IX. RECOMENDACIONES	59
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

- **MEB** : Microscopía electrónica de barrido.
- **RAMAN** : Espectroscopia raman confocal.
- **AFM** : Microscopía de fuerza atómica.
- **HD** : Hipersensibilidad dentinaria.
- **mm** : Milímetros.
- **rpm** : Revoluciones por minuto.
- **ml** : Mililitros.
- **µm** : Micrómetros.
- **nm** : Nanómetros.
- **HAP** : Hidroxiapatita.
- **nHAP** : Nanohidroxiapatita.
- **°C** : Grados Celsius.
- **pH** : Potencial de hidrógeno.
- **SiC** : Carburo de Silicio.
- **PDSL** : Policlínico Docente San Luis.
- **Tp** : Tamaño de partícula.
- **TDs** : Túbulos dentinarios.
- **FTIR-ATR** : Espectroscopia infrarroja transformada de fourier.
- **Kv** : Kilovoltio.
- **DRX** : Difractómetro de rayos X

INDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Diagrama de caja: Porcentaje de área de túbulos abiertos por micrografía MEB según grupos de estudio en tiempo inicial (0 días), 7 días, 15 días.	42
Gráfico 2. Túbulos abiertos por micrografía MEB según grupos de estudio en tiempo: 0 días, 7 días, 15 días.	43
Gráfico 3. Diagrama de cajas del porcentaje de aumento del mineral (intensidad del modo vibracional del ión fosfato v_1) por grupos de estudio en tiempo, al culminar los 7 días.	46
Gráfico 4. Diagrama de cajas del porcentaje de aumento del mineral (intensidad del modo vibracional del ión fosfato v_1) por grupos de estudio en tiempo, a los 15 días después del efecto erosivo.	47
Gráfico 5. Cantidad de disminución del mineral (intensidad del modo vibracional del ión fosfato v_1).	48

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Descripción de insumos en porcentaje y gramos usados para la elaboración de la pasta dental.	27

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. a) Cáscaras de huevo, b) Calcinación, c) Óxido de calcio para la obtención del hidroxido de Calcio, d) Ácido fosfórico, e) Suspensión de hidroxido de calcio agregando gota a gota el ácido fosfórico, d) Control del pH con hidróxido de amonio, g) Envejecimiento, h) nHAP después de proceso térmico.	25
Figura 2. Pesado el producto final de la pasta dental base.	28
Figura 3. Micrografía electrónica de barrido correspondiente a dentina sin preparación.	32
Figura 4. Aplicación de pastas dentales según grupos establecidos	34
Figura 5. Microscopía electrónica de barrido - Centro de Caracterización de Materiales – PUCP.	35
Figura 6. Espectroscopía raman - Laboratorio de Micología y Biotecnología.	37
Figura 7. Cristalografía de Rayos X- (DRX)	40
Figura 8. Celda Unitaria de hidroxiapatita	41
Figura 9. Micrografías MEB a 1000x, al inicio, a los 7 días de la aplicación de las pastas dentales y a los 15 días del efecto erosivo, según	44

los grupos de estudio GI: nHAP al 3 %, GII: nHAP al 7 %, GIII: nHAP al 15 %, GIV: Biorepair[®], GV: Pasta dental sin nHAP.

Figura 10. Espectros RAMAN (400–1300 cm^{-1}), modo vibracional en base a la concentración del fosfato V_1 (961 cm^{-1}), al inicio, a los 7 días de la aplicación de las pastas dentales y a los 15 días del efecto erosivo, según los grupos de estudio (a,b,c,d,e). 45

Figura 11. Micrografías espaciales y espectros RAMAN (600–1200 cm^{-1}), modo vibracional en base a la concentración de los compuestos moleculares, imágenes de 50 x 50 μm^2 a una potencia de 50 mW, al inicio, a los 7 días de la aplicación de las pastas dentales y a los 15 días del efecto erosivo, según los grupos de estudio GI: nHAP al 3 %, GII: nHAP al 7 %, GIII: nHAP al 15 %, GIV: Biorepair[®], GV: Pasta dental sin nHAP. 49

RESUMEN

En busca de un tratamiento eficaz, sostenible y económico para el manejo de la hipersensibilidad dentinaria (HD), el presente trabajo de investigación elaboró y evaluó el efecto de una pasta experimental a base de nanohidroxiapatita (nHAP) obtenida de la cáscara de huevo para la obliteración de los túbulos dentinarios (TDs), se sintetizó nHAP a partir de la cáscara de huevo. Se formularon pastas con diferentes porcentajes de esta nHAP: 3, 7 y 15%. Se utilizaron muestras de premolares y se dividieron en 5 grupos según la pasta aplicada: GI: 3% de nHAP, GII: 7% de nHAP, GIII: 15% de nHAP, GIV: pasta comercial con Zinc-Hidroxiapatita s/flúor (Biorepair[®]), grupo V: pasta sin nHAP. Las muestras fueron sometidas a un primer efecto erosivo con Coca Cola[®] durante 2 minutos. Luego se aplicaron las pastas y se cepillaron por 3 min c/24 horas durante 7 días. El segundo efecto erosivo fue en el día 15 de evaluación. Las muestras fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopia raman confocal (RAMAN) en tres momentos: después del primer ciclo erosivo, a los 7 días de las aplicaciones de las pastas y después del segundo efecto erosivo. El análisis cuantitativo de las muestras mostró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (I, II, III) con respecto a los grupos (IV, V) ($p < 0,05$) y ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (I, II, III), el GI presentó una diferencia significativa con G5 ($p < 0,05$) al evaluar la concentración de mineral a los 7 días. Se concluyó que la pasta experimental sintetizada a partir de la cáscara de huevo es efectiva en la obliteración de los TDs.

PALABRAS CLAVE: hidroxiapatita, pasta dental, cáscara de huevo. (DECS)

ABSTRACT

Searching for an effective, sustainable, and affordable treatment for the management of dental hypersensitivity (HD), this research created and evaluated the effects of an experimental nano-hydroxyapatite (nHAP) paste, obtained from eggshells, for the obliteration of the dentinal tubules (TDs). Nano-hydroxyapatite was synthesized from eggshells. Pastes with the following nHAP percentages were formulated: 3, 7 and 15%. Premolar teeth samples were utilized and divided into 5 groups according to the paste applied: GI: 3% nHAP, GII: 7% nHAP, GIII: 15% nHAP, GIV: commercial paste with Zinc-Hydroxyapatite s / fluorine (Biorepair®), group V: pasta without nHAP. The samples were subjected to an initial erosive-effect test with Coca Cola® for 2 minutes. Then, the pastes were applied to the samples and brushed for 3 minutes every 24 hours for 7 days. The second erosive-effect test was on day 15 of evaluation. The samples were analyzed through a scanning electron microscope (SEM) and confocal Raman spectroscopy (RAMAN) in three instances: after the first erosive cycle, 7 days after the application of the paste and after the second erosive-effect test. The quantitative analysis of the samples showed a statistically significant difference between the groups (I, II, III) in regards to the groups (IV, V) ($p < 0,05$) and no statistically significant difference between the groups (I, II, III), the GI showed a significant difference with G5 ($p < 0,05$) when evaluating the mineral concentration at 7 days. It was concluded that the experimental paste, synthesized from eggshells, is effective in obliterating the dentinal tubules.

KEY WORDS: hydroxyapatite, toothpaste, eggshell. (MESH)

I. INTRODUCCIÓN

La HD es una patología común dentro de la consulta dental, afectando principalmente dentro de los 30 a 44 años de edad,¹⁻³ generado por estímulos térmicos, mecánicos o químicos, que provocan una reacción en las terminaciones nerviosas de la pulpa dental, atribuido generalmente a una exposición de los TDs, lo que conlleva a generar dolor cuando se ingieren alimentos sólidos, bebidas y hasta en el momento del cepillado de dientes.⁴⁻⁷

Los diferentes estudios de su prevalencia remontan a 1964 con resultados muy variables atribuidos a los criterios de diagnósticos usados, estudios en Perú demuestran que este cuadro patológico presenta una prevalencia que varía entre 35% y 51%^{8,9}. En un metanálisis recientemente realizado, estimaron la prevalencia de HD en todo el mundo con un resultado de 33.5%, que puede interpretarse como la prevalencia promedio de todos los estudios que fueron seleccionados.¹⁰ Lo que claramente indica que el problema ha subsistido con el tiempo.¹¹⁻¹⁴

En el mercado actual contamos con una gama de alternativas como dentífricos, colutorios, barnices, entre otros, dirigidos básicamente a dos mecanismos de acción, por un lado, al bloqueo o a inhibir las células nerviosas actuando en la polaridad de membrana, y por otro lado en la obliteración de túbulos dentinarios, logrando su cierre y evitando que estos estímulos ingresen a las células nerviosas, logrando una remineralización dentinaria.

Agentes como el nitrato de potasio, fluoruro estañoso, cloruro de estroncio y el monofluorofosfato de sodio, son los más ampliamente recomendados para administrar en pacientes con HD en el entorno de la práctica clínica.^{1,2,15-18}

Existen productos con agentes que ofrecen un alivio momentáneo de la HD, pero el efecto permanece sólo por algunas semanas es decir no logra la estabilidad necesaria, disgregándose rápidamente.^{1,17} Recientemente se incluyó a la línea de investigación de pastas dentales la incorporación de nHAP, obtenida a partir de sales sintéticas, que tiene efectos de obliteración de TDs, mediante la incorporación de este agente en las zonas de pérdida del mineral. Investigaciones ya existentes refieren que no pueden soportar el impacto continuo y se eliminan fácilmente, adicional a ello su precio elevado dentro del mercado, hace necesario estudiar nuevas opciones innovadoras, dentro del sistema I+D+i, que nos permitan soluciones estables, usando recursos biodisponibles como es la cáscara de huevo que lograría una adherencia optima y lograr una remineralización estable que proporcionen un mejor resultado y de fácil producción.^{16,18-20}

Buscamos seguir con una nueva era de constantes avances tecnológicos, obtener evidencia científica para un aporte a la ciencia y al país. Haciéndose necesario ofrecerle al paciente la mejor alternativa para su alivio y bienestar y lo fundamental lograr un biomaterial que permanezca en el tiempo y a un menor costo y al alcance de todo tipo de población, concientizando el manejo de estos recursos biodisponibles, y en el cuidado del medio ambiente, y que estos recursos sean útiles para la elaboración de productos de frecuente uso como de higiene diaria.

Ante esta situación problemática y en base a la orientación de las investigaciones y a los valiosos aportes de estudios existentes, nuestra principal interrogante fue: ¿Qué efectividad tiene una pasta dental a base de nanohidroxiapatita sintetizada a partir de una fuente natural “cáscara de huevo”, en la obliteración de los túbulos dentinarios?

II. MARCO TEÓRICO

II.1. Dentina

La dentina es un tejido compuesto de material orgánico e inorgánico ocupando la mayor parte del volumen del diente, proporciona la forma y rigidez durante la masticación. A nivel coronal, la dentina está cubierta por el esmalte, y en la raíz por cemento. Tanto el tejido pulpar como la dentina comparte un origen mesodérmico a partir de la papila dental.²¹⁻²³

Las propiedades de la dentina, pueden variar por el tipo de diente y la edad del paciente. En el caso del espesor de la dentina de pacientes jóvenes, esta puede variar desde 2.00 milímetros (mm) para los incisivos inferiores hasta 3.00 mm para los caninos y molares; sin embargo, con el envejecimiento el espesor de la dentina se incrementa debido al crecimiento aposicional.²⁴

La dentina tiene un color amarillo pálido es el responsable de la coloración que presenta el diente. Es un tejido duro, pero más blando y menos frágil que el esmalte y permeable ya que esta presenta múltiples túbulos. ²¹

II.1.2. Composición química

La dentina es un tejido conjuntivo y está constituida principalmente por un 70% de material inorgánico, 20% orgánico y 10 % de agua. La proporción del componente orgánico supera al esmalte.²³

El principal componente inorgánico es la hidroxiapatita que se encuentra en forma

de cristales más pequeños que los del esmalte. Con menor proporción de calcio y fósforo que el esmalte, pero más magnesio, carbonato y fluoruro.²¹

El principal componente orgánico es el colágeno tipo I, que abarca el 90% del contenido proteico, con una menor proporción de colágeno tipo V (un 3% del total), y en proporción mucho menor proteínas: fosfoproteínas, glucoproteínas y las proteínas del plasma.^{21, 23, 25}

II.1.3. Componentes estructurales de la dentina

II.1.3.1. Túbulos dentinarios

Los TDs se encuentran llenos de líquido tisular y las prolongaciones de los odontoblastos, su trayecto indica el camino que el odontoblasto siguió durante la dentinogénesis.²¹

Sigue un trayecto de forma de “s” itálica, en la dentina radicular la forma se encuentra más definida y a nivel de los bordes incisales o cúspides su trayecto puede llegar a ser recto. Poseen también curvaturas secundarias que son oscilaciones menores dentro de la curvatura principal. La curvatura se debe al apiñamiento de los odontoblastos a medida que se dirigen hacia la pulpa durante el desarrollo de la dentina.²¹

También es por eso que el número de túbulos es mayor cerca de la pulpa (45,000/mm²) que a nivel de la unión amelodentinaria (20,000/mm²) y para la dentina media (35,000/mm²).^{21,23}

Alrededor del 80% del volumen total de la dentina próxima a la pulpa está formado por túbulos, mientras que cerca de la unión amelodentinaria los túbulos solo ocupan alrededor del 4% del volumen del tejido.²¹

Su diámetro a nivel pulpar es mayor que a nivel periférico de la dentina entre 15,000 y 24,000 túbulos/mm² para la dentina superior; entre 35,000 y 40,000 túbulos/mm² para la dentina media; y entre 43,000 y 65,000 túbulos/mm² para la dentina inferior.^{21,26,27}

II.1.3.2. Dentina peritubular, intertubular e interglobular

La dentina peritubular (también denominada intratubular) es aquella que rodea la luz de los TDs. Formando un anillo hipermineralizado de dentina; su grosor es mayor a nivel del límite amelodentinario que a nivel pulpar. Es una dentina altamente mineralizada, por lo que su matriz organiza es muy pobre en fibras colágenas, con un proceso de formación continuo (dependiente de factores ambientales y patológicos) lo que podría reducir la luz de los TDs y pudiendo llegar a ser obliterados.²¹

La dentina intertubular es la dentina que se encuentra entre túbulos y constituye la mayor parte de la dentina del diente. Está formada por una red de fibras colágenas sobre las que se depositan cristales de apatita. Los cristales se orientan con sus ejes mayores paralelos al eje mayor de la fibrilla colágena. Las fibras colágenas se disponen perpendicularmente respecto a los túbulos TDs.²¹

La dentina intertubular, al disponer de un mayor contenido en colágeno, esta menos

calcificada que la peritubular.²¹

La dentina interglobular, también denominada espacios interglobulares de Czermak, conformada por áreas de dentina no mineralizadas o hipomineralizada que persisten dentro de la dentina madura.²¹

II.2. Hidroxiapatita

La hidroxiapatita es un mineral inorgánico cristalino presente en los huesos y en 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 potencial de hidrógeno (pH) a menos 5.5.^{16,28,29}

II.2.1. Composición química

Su fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{HO})_2$ 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.²⁹

II.2.2. Obtención de hidroxiapatita

Se puede obtener este mineral de origen natural y sintético.

II.2.2.1. Origen natural

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.²⁹⁻³¹

II.2.2.2. Origen sintético

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 en como biomaterial.²⁹

II.2.2.3. Síntesis de hidroxiapatita a partir de la cáscara de huevo

La cáscara de huevo tiene un proceso de mineralización biológica y se encuentra compuesta de 1,6% de agua, 95,1% de minerales, de los cuales 93,6% corresponden a carbonato de calcio en forma de calcita, 0,8% de carbonato de magnesio y 0,73% de fosfato tricálcico, y finalmente 3,3% de materia orgánica.³¹

La fuente natural de carbonato de calcio es la materia prima más importante en la síntesis de hidroxiapatita y para el tratamiento la cáscara de huevo pasa un proceso de molienda de alta eficiencia, luego de pasar a un análisis granulométrico para determinar el tamaño de la partícula luego el polvo de la cáscara de huevo es sometido al tratamiento térmico.³⁰

II.3. Aplicaciones de hidroxiapatita

En los años 70's cuando 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.^{28, 32, 33}

Algunas posibles aplicaciones que puede tener la HAP 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 HAP, o bien para recubrir prótesis metálicas, Artrodesis: fijación de una articulación por medio de cirugía, para recubrimiento de implantes dentales y también en la otorrinolaringología para construir prótesis de oído medio.²⁸

II.4. La nanotecnología en la odontología

El aspecto más destacado de la nanotecnología es que los materiales presentan diferentes propiedades a nanoescala. Permite que los biomateriales mejoren sus propiedades fisicoquímicas, magnéticas, conductividad eléctrica, térmica, entre otros. Estos fenómenos únicos suceden a escala nanométrica, estudiados en diferentes campos incluidas la odontología.³⁴

Permitiendo el impulso de nuevos e innovadores materiales con características nanométricas como nanocomposites, nanotubos, nanopartículas los que permiten tener nuevas terapias para su aplicación en la práctica diaria, de esta manera regenerar los tejidos dentarios de una manera total o parcial.³⁵

Actualmente se están aplicando nanopartículas que controlan la señalización del dolor y que incrementan la ramificación de las terminaciones nerviosas al utilizar nanoesferas que contienen factores de crecimiento que favorecen la regeneración del tejido nervioso.³⁵

En el área de implantología introducen biomateriales, que simula la estructura y

composición del hueso. Además, se están creando implantes inteligentes, ya que son capaces de identificar el tipo de tejido que se está formando sobre ellos, para liberar factores de crecimiento, cuando sean necesarios para favorecer el crecimiento y desarrollo tisular.³⁵

Se está utilizando un nanoremineralizador del esmalte dental, mediante el uso de un biomaterial que es una secuencia peptídica con la finalidad de favorecer la remineralización del esmalte, sin la necesidad de utilizar el flúor, los resultados son alentadores y se continua con los mismos.^{34, 35}

II.5. Obliteración de túbulos dentinarios

Diferentes estudios tanto in vitro como clínicos en humanos nos dan la posibilidad de obliterar los TDs para el alivio de la hipersensibilidad, es decir bloquear el mecanismo hidrodinámico, la teoría más aceptada actualmente.^{36, 37} La obliteración de TDs se puede dar mediante la precipitación de minerales como: Fluoruro de sodio, cloruro de estroncio, fluoruro estañoso, fluoruro de plata, oxalato de potasio, fosfato de calcio, vidrios bioactivos, arginina y carbonato de calcio. Por precipitación de proteínas como: Glutaraldehído, nitrato de plata, cloruro de zinc, cloruro de estroncio hexahidratado. Y materiales selladores o laser que pueden actuar dentro o sobre de ellos como: Barnices fluorados, ácido oxálico y resina, cementos ionómero de vidrio, resinas compuestas, adhesivos selladores y el Láser Nd-YAG. Muchos de los cuales son eliminados tras la aplicación, es decir logran efectividad, pero tras la utilización a largo plazo y de forma permanente.³⁸⁻⁴¹

Estos diferentes compuestos son utilizados para la obliteración de TDs, en cuanto al uso de fluoruros su aplicación de sales de flúor precipita los cristales de fluoruro cálcico, existiendo cierto grado de efectividad en la reducción de la hipersensibilidad tras la utilización a largo plazo, pero los estudios sobre obliteración demuestran resultados poco alentadores. La aplicación de cloruro de estroncio es usada en forma limitada en pastas dentales pues es incompatible con formulaciones a base de flúor y cuando se combina con productos abrasivos, pudiendo generar alteraciones en la superficie dentaria.³⁹⁻⁴²

El fluoruro de estaño tiene una eficacia demostrada pero no está disponible en el uso para pastas dentales, pues genera manchas en los dientes y un sabor desagradable. Se cree que el estroncio como el estaño actúan precipitando los compuestos metálicos insolubles en las superficies dentinarios y de esta forma obliteran parcialmente los TDs abiertos.^{39, 42}

Actualmente se realizan estudios para la formulación de pastas dentales experimentales que ofrezcan mejores resultados, combinando compuestos con nueva tecnología a base de nHAP sintética donde comparado con otros agentes activos se obtiene un mayor porcentaje de efectividad hasta 98,1% de oclusión tubular reduciendo la permeabilidad dentinaria significativamente en ausencia de saliva, pero disminuye con saliva a diferencia de las pastas de dientes que contiene arginina y carbonato de calcio quedando por estudiar su eficacia a largo plazo.^{17,43}

II.6. Antecedentes

Investigaciones respecto a la problemática de interés se han dado hace mucho tiempo, la HD aqueja a la gran mayoría de pacientes al margen de su condición económica o país de origen, la teoría existente nos refiere que se han realizado estudios donde se busca reducir la permeabilidad dentinaria mediante el uso de pastas dentales a base de hidroxiapatita (HAP) obtenida de sales sintéticas y aditivos terapéuticos. Al-Maliky y col. (2014) Realizaron una investigación donde se comparó los efectos del láser de CO₂ con o sin nHAP en la oclusión de los TDs, donde evaluaron la temperatura y morfología superficial y de la sección transversal, con una muestra de 46 molares humanos que fueron preparados y encajonados, grabados con ácido cítrico al 1 % ,donde se estableció tres grupos: control (C), grupo de aplicación de pasta nHAP de fuente sintética con un tamaño de partícula (Tp) de 60 nanómetros (nm) sin uso de láser de CO₂ (L-) y nHAP con uso de láser CO₂ (L+), las imágenes obtenidas con MEB en el grupo (C) los TDs estaban ampliamente abiertos, en el grupo (L-) mostraron un menor diámetro de TDs que también se observó en la sección transversal de las micrografías, en el grupo (L+) se ocluyó en un gran número TDs debido al efecto de fusión del láser de CO₂, lo que nos hace concluir que el efecto del láser de dióxido de carbono coadyuva la obliteración de túbulos pero el estudio no proporciona información acerca de su estabilidad en el tiempo del nHAP con y sin láser.⁴⁴

Lelli y col. (2014) realizó un estudio In vivo donde quería comprobar la efectividad de dos tipos de pastas en efectos de remineralización y reparación de la superficie 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. El examen clínico fue al inicio, después de 4 semanas y después de 8 semanas (final del seguimiento). Durante las visitas, evaluaron entre dos y hasta cuatro dientes hipersensibles utilizando las pruebas de estímulos validadas: prueba táctil, prueba de aire comprimido, prueba de agua fría y prueba subjetiva.

Al final, realizaron extracciones en cinco sujetos por grupo de estudio. Los controles negativos consistieron en dos sujetos tratados con pasta de dientes de fluoruro no especificada. Los dientes fueron procesados para caracterizaciones superficiales morfológicas y químico-físicas por medio de microscopía electrónica de barrido, no se observó ninguna deposición sobre las superficies del esmalte después del tratamiento con el fluoruro y las pastas de dientes con KNO_3 / NaF conduciendo a solamente a una sustitución parcial de los grupos hidroxilo con iones fluoruro en la hidroxiapatita nativa del esmalte a diferencia de la pasta dental que contiene nanocristales de CHA sustituidos con Zn puede producir un revestimiento biomimético sobre la superficie del esmalte, imitando así la composición, estructura, morfología y reactividad superficial de la hidroxiapatita del esmalte biológico.⁴⁵

Kulal y col. (2016) Evaluaron y compararon los efectos de tres pastas desensibilizantes sobre la permeabilidad dentinaria y la oclusión de los TDs “in vitro” con una muestra de 40 premolares humanos, Grupo A = discos de dentina sumergidos en solución normal, Grupo B = nHAP al 1%, Grupo C = Novamin[®] (5% fosfato de calcio y sodio), Grupo D = Proargin[®] (arginina al 8%, carbonato de calcio 1450 ppm fluoruro y sodio monofosfato), se tomaron medidas iniciales y

cada muestra conforme a los grupos de tratamiento se trató con la suspensión respectiva durante dos minutos durante un período de siete días, finalmente se analizaron por MEB. El grupo B mostró un 97.62% de oclusión de los TDs. El grupo C mostró un 81.9% de oclusión tubular y un 65.42% en el grupo D. Al comparar las pastas dentífricas desensibilizantes, se observó que había una diferencia estadísticamente significativa entre las tres pastas dentales desensibilizantes. Hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el Grupo B y D (valor $p < 0,005$). Además, como la diferencia media entre los grupos B y D fue de 0,83, el grupo B fue más eficaz en comparación con el grupo D. No hubo una diferencia estadística significativa entre el grupo B y C ($p = 0,235$). Del mismo modo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos C y D como ($p = 0,154$), la nHAP obtenida de sales sintéticas otorga mejores condiciones de obliteración a diferencia de otros agentes, quedando por investigar si dicho efecto resulta ser estable a los efectos erosivos que se encuentra expuesto constantemente el medio bucal.¹⁷

Poggio y col. (2017) 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 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

dentríficas sobre la superficie, B= tratamiento con pasta sin fluoruro, C= tratamiento con pasta con fluoruro, D= tratamiento de pasta sin fluoruro con Zn-nHAP (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.⁴⁶

Masahiro y col. (2017) buscaron comparar el efecto de tres pastas: S-PRG al 0, 5, 30% (relleno que libera 6 iones flúor, sodio, estrancio, aluminio, silicato y borato) reconocido por sus propiedades bioactivas, inhibe la formación de placa y posee notable capacidad de neutralización de ácidos y para la comparación se utilizó Merssge plus[®] no fluorada y Renamel[®] que contiene nHAP de Tokio Japón, la muestra de 38 molares se cortaron las raíces dividiéndolas en mesial y distal en medias coronas y se encapsularon en resina. Luego las superficies del esmalte se pulieron con una pieza de mano de baja velocidad y con un cepillo giratorio se aplicaron las pastas, luego se secaron y enjuagaron. Luego fueron sumergidos en viales de plástico individuales en 2ml de solución desmineralizante durante 5 días a 37 °c a los 5 grupos, se realizaron las pruebas de nanoindentación, medidas de dureza y módulo de elasticidad, las superficies se observaron por (MEB) para la observación superficial y con Microscopía de fuerza atómica (AFM) para la medición de la rugosidad superficial, También se observaron las superficies de las muestras de control que no estaban sumergidas en la solución de desmineralización

para comparación. Resultó que la dureza y la elasticidad de todas las muestras disminuyeron a medida que aumentaba el tiempo de inmersión.⁴⁷

Después de los 5 días de inmersión las muestras pulidas con S-PRG con 0% y Meressage Plus® (No Fluoradas) tenían superficies porosas (como un panal) A diferencia de las muestras que fueron pulidos con S-PRG al 5 y 30 % y los pulidos con Renamel® mostró superficies más suaves. Los especímenes con S-PRG al 30% mostraron una disminución mucho menor que los demás. Los resultados indicaron que la pasta a base de SPRG inhibe la desmineralización del esmalte debido a las propiedades neutralizante de ácido.⁴⁷

Lin y col. (2017) Fabricaron y caracterizaron nHAP con dendrímeros de poliamidoamina carboxilo (comúnmente denominado “proteína artificial”) por un método químico de base acuosa y se verificaron por espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) y microscopio electrónico de transmisión. Con el objetivo de extender y mejorar la bioactividad de las partículas de nHAP de sales sintéticas, mejorando sus propiedades mecánicas como la falta de fuerza, la fragilidad y el alto grado de cristalinidad, Se usaron 120 discos de dentina para los experimentos de cierre de los TDs y se dividieron en 4 grupos, cada uno con 30 muestras que recibieron los siguientes tratamientos: G1:control, las superficies de las muestras de dentina solo se trataron con agua desionizada, G2: nHAP funcionalizado con dendrímeros almacenado en saliva artificial,G3: 0,5 g de nHAP en saliva artificial y el G4: nHAP funcionalizado con dendrímeros de la misma manera que en el Grupo 2 pero almacenado en agua desionizada, se pudo apreciar en micrografías MEB que el G1 no mostró oclusión de túbulos y todos los TDs parecían no estar llenos. Casi todos los TDs en el G2 aparecieron ocluidos. En

cuando al G3 casi todos los TDs todavía estaban vacíos y los diámetros de ciertos TDs se redujeron ligeramente, en el G4 muestran un efecto de sellado relativamente análogo al grupo 2, dentro del túbulo, los cristales en forma de barra casi llenan todo el túbulo, pero en comparación con el grupo 2, los TDs muestran una integridad y uniformidad más débiles.²⁵

El tratamiento con nHAP funcionalizado con dendrímero, almacenado en saliva artificial o agua desionizada, la microdureza de las muestras fueron significativamente mayor que la del grupo de control y el grupo tratado con n-HAP ($p < 0,001$). En cuanto a la comparación entre el grupo 1 (control) y el grupo 3 que trató con nHAP, no hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a microdureza. De manera similar, la conservación de saliva artificial no hace diferencia en los cambios de microdureza de los discos de dentina que aceptaron el mismo tratamiento, pero se guardaron en agua desionizada.²⁵

Hiller y col. (2018) realizaron un estudio in vitro donde se evaluó el efecto de las pastas dentríficas a base de nHAP obtenida de sales sintéticas: Biorepair® (BR), nitrato de potasio (NP) y esta última de arginina y carbonato de calcio (EH) sobre la permeabilidad dentinaria usando varias aplicaciones y varios ciclos de envejecimiento térmico, con y sin presencia de saliva humana la cual se midió por conductancia hidráulica, tuvieron dificultades con las discos de dentina preparados pues muchos en la prueba hidráulica inicial no cumplían con estándar lo que conllevó a la exclusión de la mitad de los mismos, los resultados dieron por entendido que una disminución de la permeabilidad de la dentina representa más túbulos de dentina ocluidos, mientras que un aumento representa túbulos menos ocluidos. La aplicación del material dio como resultado la oclusión de túbulos: Sin

saliva, fue BR (61%), NP (87%), EH (118%), con saliva EH (63%), NP (72%), BR (88%), mientras que los períodos de envejecimiento térmico los reabrieron a un nivel distinto, Biorepair® viene siendo usada en diferentes investigaciones con efectos significativos, resulta útil compararla posteriormente con otras pastas experimentales obtenidas de recursos disponibles.⁴³

Baglar y col. (2018) investigaron la efectividad de la nHAP obtenida de sales sintéticas mediante precipitación, estudio in vitro que se organizó en 5 grupos de estudios, grupo 1 sin tratamiento, grupo 2 con nHAP puro al 10 % y los grupos 3,4,5 con nHAP al 10% dopado de fluoruro al 1%,2%,3% respectivamente para la oclusión de los TDs, se prepararon las muestras N= 40 molares humanos con papeles de pulido de carburo de silicio (SiC) 600, 1,000, 1,200, y 2,000 molidas en húmedo, los TDs de los discos fueron grabados con 10% de ácido cítrico durante 60 segundos, las muestras se sumergieron en una suspensión de agua destilada que contenía el agente activo conforme los grupos durante 3 minutos y se agitó a 150 revoluciones por minuto (rpm) a 37 ° C, tres veces al día durante 7 días. Las muestras se mantuvieron en saliva artificial durante 8 h, se analizaron por FTIR-ATR) y luego por MEB y la mitad de cada muestra se sometieron a un proceso de degradación en SBF (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) durante cuatro semanas y luego se examinaron nuevamente por ATR-FTIR y MEB y también se analizó la citotoxicidad de los discos de dentina tratado donde se determinó que los polvos de nHAP estudiados no eran tóxicos, es decir pueden usarse como agente activos para el tratamiento de la HD, de acuerdo con los estudios en MEB – ATR-FTIR todos los grupos lograron una oclusión efectiva del túbulo, la adición de flúor tuvo efectos positivos sobre la estabilidad química y las propiedades de solubilidad al considerar

los resultados de pérdida de masa (porcentaje de degradación) pero hasta un nivel del % 2 flúor. Y con respecto a la citotoxicidad, la tasa de dopaje con flúor disminuye el porcentaje de viabilidad, aportes importantes sobre el uso de la nHAP para la obliteración de TDs, dejando un vacío por investigar si el uso de nHAP obtenida de productos disponibles podría optimizar la estabilidad y mejorar las propiedades.⁴⁸

Bossú y col. (2019) El propósito de su investigación fue analizar una pasta de dientes sin flúor que contenía nHAP, para evaluar las propiedades de remineralización y reparación del esmalte, Se compararon tres pastas dentales diferentes: (a) común pasta de dientes, (b) pasta de dientes comercial que contiene 500 ppm de flúor ; (c) pasta de dientes comercial que contiene 1400 ppm de flúor; (d) pasta de dientes que contiene nanocristales de hidroxapatita (Biorepair[®], Coswell S.p.A., Funo, Bolonia, Italia). Analizado por MEB, al grupo control (muestras dentales primarias tratadas n=30 las cuales fueron grabadas con 37% de ortofosfórico ácido durante 1 min para reproducir la desmineralización, enjuagadas al terminar con solución salina normal cada fragmento del mismo diente era cepillado por 15 días tres veces al día usando cepillos de dientes pediátricos durante 2 minutos.⁴⁹

Además, se realizó el experimento in situ o in vivo por ofrecen una visión óptima de las interacciones de los dispositivos de cuidado de la salud bucal con los tejidos duros dentales y la biopelícula oral, conformando por un grupo de pacientes entre los 7 y 10 años de edad, el procedimiento fue exactamente del grupo in vitro y posteriormente se llevó a cabo la exodoncia de los primeros molares deciduos. En el Análisis de las micrografías en MEB se apreció la notable diferencia en cuanto a

la morfología de la superficie, después del tratamiento con Biorepair[®], las cifras revelaron la ausencia casi total de rasguños y surcos, obteniendo una superficie es lisa y reparada de manera homogénea gracias a la acción de recubrimiento del material.⁴⁹

Los resultados arrojados fueron estadísticamente significativos entre la pasta de dientes de 500 ppm de flúor y la pasta de dientes común ($p= 0,0630$); los efectos de las pastas son equivalentes. Existió una diferencia estadísticamente significativa cuando la pasta dental de 500 ppm de flúor se compara con la pasta dental de 1400 ppm de flúor ($p = 0,0157$) y cuando la pasta dental de 1400 ppm de flúor se compara con la pasta dental Biorepair[®] ($p = 0,0224$), en estos casos podemos decir que las pastas dentales tienen diferentes propiedades reparadoras. se alcanza un alto nivel estadísticamente significativo cuando el efecto de la pasta de dientes común se compara con el del flúor 1400 ($p = 0,0001$) y con el de Biorepair[®] ($p < 0,0001$).⁴⁹

Adicionalmente realizaron pruebas microbiológicas en pasta de dientes y muestras de dientes deciduos donde han demostrado que la pasta de dientes Biorepair[®] posee propiedades antibacterianas contra las células de *Streptococcus mutans* y la capacidad de inhibir la producción de biopelículas como lo consigue el uso de pastas fluoradas.⁴⁹

Cava y col (2016) evaluaron la prevalencia de la HD en pacientes con recesión gingival de 300 pacientes que acudían a la Clínica Especializada de Odontología de la Universidad San Martín de Porres, de 300 pacientes examinados, fueron seleccionadas 166 piezas dentarias (51 pacientes) que presentaban recesión gingival, solo 51 (17%) presentaron algún tipo de recesión gingival no asociada a enfermedad periodontal. Se observó un aumento de la frecuencia de recesión

gingival en pacientes con edades comprendidas entre los 35 y 50 años, además 58 piezas (equivalentes al 35% de las 166 piezas evaluadas), presentaron algún tipo de sensibilidad dentaria (al aire o al tacto). Se concluyó en este estudio que no existe una relación directa entre pacientes con recesión gingival (no asociada a periodontitis) y la presencia de sensibilidad dentaria.⁸

Ramirez (2019) estudió la prevalencia de HD en pacientes con lesiones cervicales no cariosas que acuden al hospital militar central lima 2019, con una muestra de 244 pacientes adultos, se utilizó la Escala Visual Análoga para evaluar el grado de HD, donde obtuvieron un 51.25 %, predominando en molares y premolares, según edad predominó en el grupo etareo de 31 a 40 años, 41 a 50 años y >de 51 años, la severidad de dolor percibida por los pacientes con HD fue escala 7 con 30.08%.⁹

III. HIPÓTESIS

Hi: La pasta experimental elaborada a base de nanohidroxiapatita de fuente natural obtenida de la cáscara de huevo, es efectiva en la obliteración de túbulos dentinarios.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto de una pasta experimental a base de nanohidroxiapatita obtenida de la cáscara de huevo en la obliteración de túbulos dentinarios.

IV.2. Objetivos específicos

- Caracterizar nanohidroxiapatita a partir de la cáscara de huevo.
- Elaborar la pasta dental a base de nanohidroxiapatita en concentraciones de 3%, 7%,15%.
- Valorar y cuantificar la obliteración de túbulos dentinarios con las pastas dentales experimentales mediante microscopía electrónica de barrido MEB.
- Comparar el efecto de las pastas experimentales según la obliteración de túbulos mediante MEB al inicio, a los 7 días y 15 días.
- Determinar el efecto remineralizante de las pastas experimentales mediante espectroscopia raman confocal al inicio, a los 7 días y 15 días.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se divide en tres etapas:

- Caracterización de nanohidroxiapatita a partir de la cáscara de huevo.
- Formulación de pastas a base de nanohidroxiapatita.
- Evaluación de las pastas experimentales.

Laboratorios

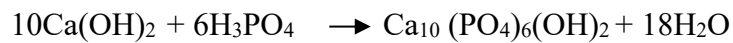
Los procedimientos se llevaron a cabo en:

- Laboratorio de síntesis y caracterización de materiales - Universidad Mayor de San Marcos: Caracterización de nHAP.
- Laboratorio de materiales dentales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia: Elaboración de la pasta dental y preparación de muestras.
- Centro de Caracterización de Materiales - Pontificia Universidad Católica del Perú: Análisis de microscopía electrónica de barrido.
- Laboratorio de Micología y Biotecnología - Universidad Nacional Agraria La Molina: Análisis de espectroscopia raman.

V.1. Caracterización de nHAP a partir de cáscara de huevo:

Se obtuvo nanohidroxiapatita en los Laboratorios de Ciencias físicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, empleamos el método Sol-gel adaptando la metodología usada por Ansari y Col. (2011)⁵⁰. Se realizó el tratamiento de las cáscaras de huevo para lograr las condiciones adecuadas para

alcanzar la síntesis, realizamos el proceso de molienda previo al tratamiento térmico con un molino de alta eficiencia y libre de la mayor cantidad de impurezas posibles. Luego del proceso de molienda, se procedió a tamizar el polvo con un tamiz a 325 (Mesh) para una mejor reacción físico-química entre las partículas de la cáscara de huevo y un buen manejo del material. Seguidamente, los polvos de cáscaras de huevo fueron calcinados a 850 grados Celsius (°C) por 3 horas para obtener óxido de calcio (CaO), que al ser suspendida en agua destilada en agitación magnética por 1 hora a 40 °C, se transformó en hidróxido de calcio - Ca(OH)₂ . También se preparó otra suspensión de ácido Fosfórico (H₃PO₄) a 0,3 molar de la marca Merck. La proporción entre ambos precursores utilizada siguió la siguiente reacción química:



Considerando:

$$m\{\text{CaO}\} = \frac{\overline{\text{PM}} \cdot \{\text{CaO}\}}{\overline{\text{PM}} \cdot \{\text{Ca(OH)}_2\}} * m\{\text{Ca(OH)}_2\}$$

Se añadió gota a gota la solución de H₃PO₄ a la de Ca(OH)₂ con agitación magnética a 200 rpm, e inmediatamente el pH de la mezcla se ajustó a 10,5 usando hidróxido de amonio (Merck). La mezcla se mantuvo en agitación durante 2 horas.

El gel formado se dejó envejeciendo durante 24 horas a temperatura ambiente y se filtró agua destilada usando papel filtro grado 40 (Whatman). El precipitado se secó a 120 °C durante dos horas. Finalmente, la muestra fue sometida a tratamiento térmico a 600 °C por 3 horas en un horno tubular para propiciar la cristalización de

los granos, y se pulverizó manualmente usando un mortero de Ágatha manual hasta obtener partículas menores de 40 micrómetros (μm).

Luego se tamizó la nHAP usando una malla (Mesh 325) para obtener separar las partículas y estas se encuentren menores a 40 μm , lo que facilita una mejor uniformidad al momento de incorporarla a los componentes de la pasta dental.

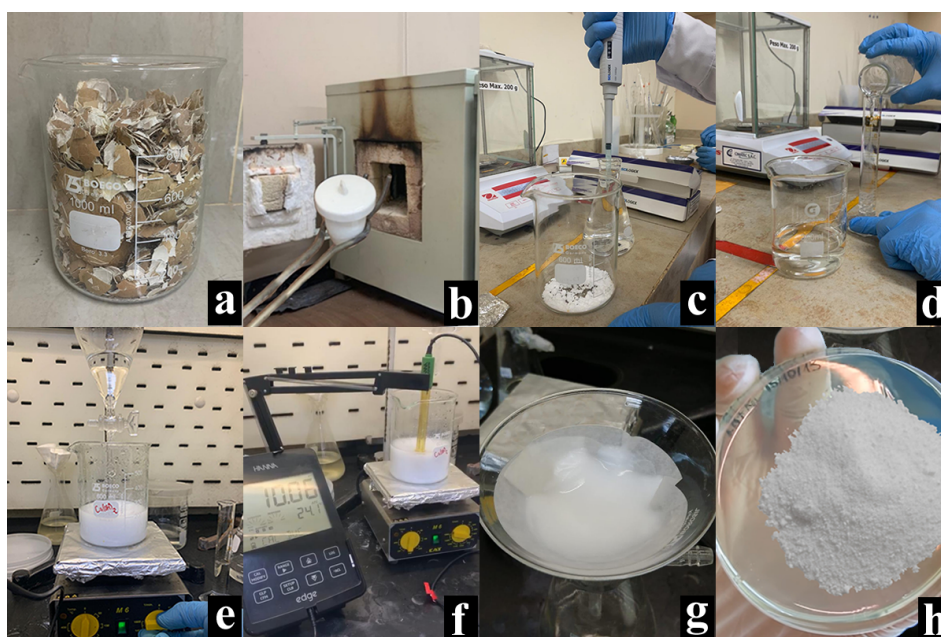


Figura 1. a) Cáscaras de huevo, b) Calcificación, c) Óxido de calcio para la obtención del hidróxido de Calcio, d) Ácido fosfórico, e) Suspensión de hidróxido de calcio agregando gota a gota el ácido fosfórico, d) Control del pH con hidróxido de amonio, g) Envejecimiento, h) nHAP después de proceso térmico.

Caracterización Estructural HAP

Una vez obtenida la nHAP, se realizó una un análisis cristalográfico para confirmar los compuestos eran los deseados, con el equipo de Difractómetro de rayos X (DRX).

La caracterización estructural de la nHAP obtenida se realizó mediante un estudio cristalográfico usando la técnica de difracción de rayos X. Esta consiste en identificar y cuantificar compuestos cristalinos (conocidos como fases) en la muestra en estudio, basándose en los picos de difracción característicos y comparándolos con una base de datos.

Las fases que se pueden encontrar son residuos de los precursores como *calcite* (CaCO_3), *lime* (CaO), *portlandite* (Ca(OH)_2), *orthophosphoric acid* (H_3PO_4), o compuestos resultantes como *whitlockite* ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e *hydroxyapatite* ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Se espera encontrar únicamente la fase *hydroxyapatite* mediante la metodología de síntesis seguida. El equipo utilizado fue un difractómetro de rayos X D8 Focus (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Alemania) del Laboratorio de Síntesis y Caracterización de Materiales (SyCAM) de la Facultad de Ciencias Físicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

V.2. Formulación de pastas a base de nanohidroxiapatita:

Se formularon las pastas dentales a diferentes concentraciones de nHAP en el laboratorio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se realizaron diferentes pruebas para la preparación de la pasta dental, basándonos en la metodología de Appel G y col⁵¹, donde calculamos y pesamos los insumos conforme la literatura indicada con una balanza electrónica.

Tabla 1. Insumos usados para la preparación de la pasta dental en porcentaje y gramos

Insumos	Porcentaje en 100 mililitros (ml) de agua destilada	Cantidad para 40g de pasta dental
Propilenoglicol	20 %	3,74 ml.
Goma xantana	20 %	0,40 g.
Carbonato de calcio	40 %	13,40 g.
Lauril sulfato de sodio	1,2 %	0,66 g.
Esencia de menta	0,75 %	0,15 ml
Sacarina sódica	0,1 %	0,60 g.
Benzoato de sodio	0,25 %	0,10 g.
Carboximetilcelulosa	2 %	0,8 g.

Se preparó a baño maría a 90 °C dos beakers en los cuales se colocó 70 ml y 3ml de agua respectivamente, donde incorporamos carbonato de calcio y goma xantana y Carboximetilcelulosa, luego unimos ambas mezclas y finalmente agregamos el lauril sulfato de sodio, propelinoglicol, sacarina y el benzoato de sodio con agitación magnética constante.



Figura 2. Pesado el producto final de la pasta dental base.

Se obtuvo la pasta dental base, de la cual se reservó 10 mg correspondientes a la pasta base sin nHAP (GV) como control negativo, y a lo resultante se le añadió nanohidroxiapatita en los diferentes porcentajes mediante agitación magnética:

- Pasta dental con nHAP al 3 %.
- Pasta dental con nHAP al 7%.
- Pasta dental con nHAP al 15%.

V.3. Evaluación de las pastas experimentales

V.3.1. Diseño del estudio

- Analítico: Se analizó cuantitativamente la obliteración de túbulos dentinarios en cada uno de los 5 grupos.
- Comparativo: Se comparó los resultados obtenidos de los diferentes grupos I, II, III, IV, y V.

- Longitudinal: La obliteración de túbulos dentinarios se valoró en 3 momentos en el tiempo, al inicio, a los 7 días al culminar las aplicaciones de las pastas dentales y después de quince días de la primera aplicación.
- Experimental: Se analizó el efecto de la variable independiente (concentración de nHAP en pastas dentales) sobre las variables dependientes (obliteración de túbulos y remineralización).
- In Vitro: La investigación se llevó a cabo mediante un estudio y observación en el laboratorio.

V.3.2. Muestra

La muestra estuvo formada por 50 premolares al tratarse de una investigación In vitro y en similitud con otras investigaciones Iijima y col. (2017)⁴⁷, Kulal y col. (2016)¹⁷, Al-Maliky y col. (2014)⁴⁴, Gopinath y col. (2015)⁵², teniendo en cuenta que eran extraídos por razones ortodónticas y entre las edades comprendidas de 25 a 35 años de edad, donados y recolectados en el Policlínico Docente San Luis (PDSL) ubicado en el distrito de Nuevo Chimbote – Ancash – Perú. Los cuáles fueron almacenados en agua destilada previa autorización y consentimientos informado aceptado y firmado por el paciente y cirujanos dentistas donantes. Esta técnica alternativa, se basó en la selección de elementos para la muestra basándonos en nuestra hipótesis relativa a la población de interés, lo que se vendría a ser el criterio de selección.

Técnica de muestreo: No probabilístico.

V.3.2.1. Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Premolares completamente sanos extraídos por razones ortodónticas.
- Premolares de pacientes entre las edades comprendidas de 25 a 35 años de edad.

Criterios de exclusión

- Premolares con restauraciones.
- Premolares con presencia de caries interproximales, mesial, distal o palatina.
- Premolares con dentina expuesta, erosión o abrasiones, fisuras o microfracturas.
- Premolares con presencia de fisuras de esmalte o microfracturas.

V.3.3. Variables

Variable dependiente

Obliteración de túbulos dentinarios: Es el cambio del estado de los TDs, por la precipitación gradual de partículas de nanohidroxiapatita sintetizada a partir de la cáscara de huevo, que al incrementarse cuantitativamente logran ocluir los TDs protegiéndolos de mecanismos hidrodinámicos. Serán estudiados en base porcentaje de área dental con TDs abiertos, y el número total de túbulos abiertos o

parcialmente abiertos.

Remineralización: Será estudiado en base a los valores de intensidad del pico asociado al modo vibracional del fosfato ν_1 (banda 963 cm^{-1}) del espectro obtenido.

Variable Independiente:

Pasta Dental: Compuesto viable para generar que las partículas de nanohidroxiapatita oblitere los túbulos dentinarios.

- GI: Pasta dental con nHAP al 3 %.
- GII: Pasta dental con nHAP al 7 %.
- GIII: Pasta dental con nHAP al 15 %.
- GIV: Biorepair®
- GV: Pasta dental sin nHAP (control negativo).

La pasta dental comercial Biorepair® se utilizó como control positivo, elaborada por el laboratorio Coswell S.p.A., Funo, Bologna, producido en Italia, con fórmula patentada compuesta de nanocristales de hidroxiapatita y zinc como ingrediente activo, no contiene flúor y sulfatos, con un tamaño de partículas que varía de 50 a 100 nm.⁵³ Investigaciones científicas refieren que la pasta dental al contener nanohidroxiapatita de origen sintético es capaz de adherirse al tejido del esmalte natural, capaces de formar una capa sacrificial de mineral de fosfato de calcio, obliterando los TDs, protegiendo así de los daños causados por los ácidos dietéticos, para el alivio de la HD.^{45,46,49,54,55}

Co variable:

Tiempo: comparamos los resultados obtenidos en tres momentos:

- Inicio: Después a la exposición de los túbulos dentinarios.
- 7 días: Culminada la aplicación de las pastas en los diferentes grupos.
- 15 días: Luego de permanecer 7 días adicionales sin cepillado, cambiando el agua diariamente, finalmente sometido a un efecto erosivo.

V.3.4. Técnicas y procedimientos

Preparación de las muestras

Los pacientes que acudían al establecimiento de salud PDSL, para la exodoncia de sus premolares por razones ortodónticas o por motivos terapéuticos fueron evaluados para determinar si las piezas a donación cumplían con los criterios de inclusión, posterior a ello las piezas fueron extraídas. retirando los tejidos blandos o restos de tejido óseo existente con exploradores y curetas, lavado con abundante agua y para conservar la permeabilidad de los TDs se almacenaron en solución de timol al 0,05 % siendo renovado cada semana para una adecuada conservación.

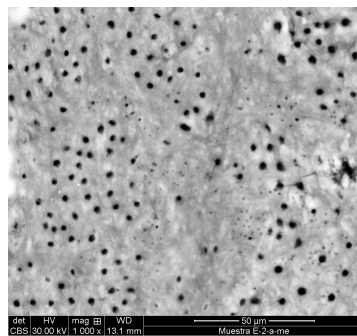


Figura 3. Micrografía electrónica de barrido correspondiente a dentina sin preparación.

Se realizaron diferentes pruebas para exponer los TDs (dentina sensible) en similitud con otras investigaciones realizadas por Baglar y col⁴⁸, Cao y col⁵⁴, Poggio y col⁵⁵, Ghafournia y col⁵⁶, Onwubu y col⁵⁷, una vez determinada la metodología a seguir realizamos la exposición de túbulos dentinarios en todas las muestras de dentina, antes del corte de las piezas dentarias para una mejor manipulación de los especímenes: las cuales fueron lijadas en húmedo con lijas de SiC de 600, 1,000, 1,200, y 2,000, con irrigación constante, una vez expuestos los túbulos dentinarios recibieron un primer efecto erosivo con una bebida comercial carbonatada (Coca-Cola® classic Company Perú)^{46,53,58-60}, (pH 2,3) a 25 °C, 30 ml por espécimen durante 60 segundos, luego se lavó abundantemente con agua destilada, con baños de ultrasonido (DA-968, DADY-China) en agua destilada tres veces durante 10 minutos con el objetivo de retirar el excedente total del detritus de las muestras.

- Se procedió al corte las piezas dentarias, con ayuda de un micromotor (NSK-FX205m) y discos de diamante con refrigeración constante en todo el proceso, seccionando la corona clínica y a 5 mm por debajo realizamos un corte transversal correspondiente a dentina del tercio cervical radicular, se delimitó un área de 4 x 4 mm.^{61,62}
- se realizó un lavado ultrasónico (DA-968).
- Las muestras fueron encajonadas con tubos de PVC y en resina acrílica, colocando una cinta doble faz (3M) para evitar el contacto del acrílico con la parte tratada previamente.
- Lavado ultrasónico final después de retirar la cinta doble faz.
- Todas las muestras se secaron para el primer análisis en MEB y RAMAN

luego fueron almacenadas en agua destilada.

Aplicación de pastas a cada grupo

Las pastas dentales experimentales fueron aplicadas según los grupos de estudio, (GI) Pasta dental con nHAP al 3 %, (GII): Pasta dental con nHAP al 7 %, (GIII): Pasta dental con nHAP al 15 %, (GIV): Biorepair[®], (GV): Pasta dental sin nHAP. Se colocó las pastas dentales en jeringas de tuberculina y se aplicaron 0,1 ml por muestra con un cepillo electrónico (vitis sonic[®] S20 DENTAID-España) con movimientos vibratorios de alta frecuencia en sentido lateral de los filamentos (velocidad de hasta 40 mil movimientos por minuto) por 3 minutos cada 24 horas por 7 días, conforme los grupos establecidos, lavando, renovando y conservando en agua destilada, en condiciones de temperatura promedio del medio ambiente 26 °C.

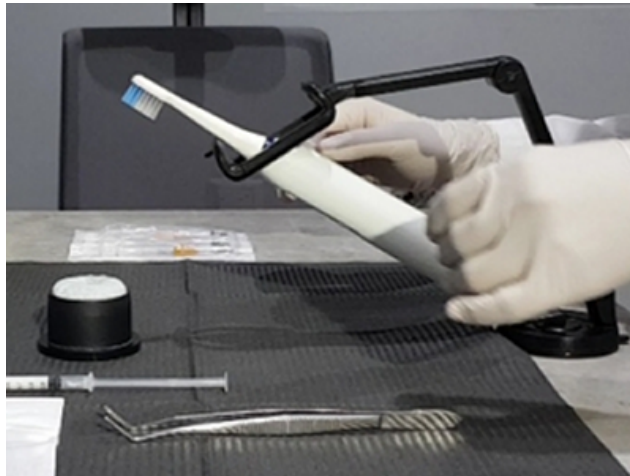


Figura 4. Aplicación de pastas dentales según grupos establecidos.

Las muestras se secaron al culminar los 7 días para ser analizados en microscopía electrónica de barrido y espectroscopia raman por segunda vez, Se almacenaron intercambiando el agua destilada por 7 días adicionales.

Finalmente, las muestras fueron sometidas al último efecto desmineralizante con la bebida comercial (Coca-Cola®) durante 2 min se lavaron y secaron para el último análisis en MEB y RAMAN por tercera vez. La intención de los tiempos del estudio fue evaluar la efectividad de las pastas experimentales al culminar los 7 días de aplicaciones, en similitud con otras investigaciones^{17,46}, posteriormente valorar la resistencia del compuesto terapéutico, frente a un almacenamiento de 7 días adicionales y un efecto erosivo.^{53,55}

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido Quanta 650 (FEI, Hillsboro, EE.UU.) del “Centro de caracterización de materiales” de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Los especímenes se montaron en trozos de aluminio con una cinta de carbono, el voltaje del haz de electrones fue de 30,00 kilovoltios (kV) a alto vacío y se tomaron micrografías a 1000 aumentos bajo un detector CBS (electrones retrodispersados).

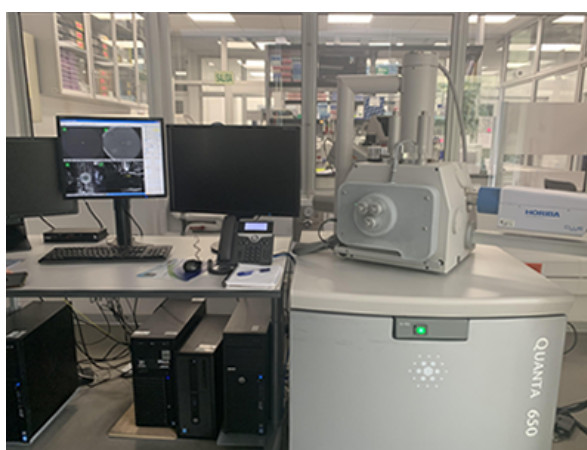


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido - Centro de Caracterización de Materiales – PUCP.

Se observó la morfología superficial de las muestras en 3 momentos:

- MEB inicial: se observó la exposición de los TDs.
- MEB 7 días: se buscó observar la efectividad de la obliteración de TDs como efecto de las pastas experimentales
- MEB 15 días: se buscó observar la morfología a los 15 días de conservación de las muestras en agua destilada cambiadas diariamente y con un efecto erosivo final, para evaluar si la capa de recubrimiento obtenida era conservada.

Espectroscopia raman confocal

Sé utilizó un Microscopio raman confocal alpha 350RA (WITec, Ulm, Alemania) del “Laboratorio de Micología y Biotecnología” de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Las medidas en cada pixel fueron de 0,1 s, mientras que se tomaron 75 pixeles x 75 pixeles en una imagen de 50 x 50 μm^2 . El láser utilizado en las medidas es de 785 nm de longitud de onda con una potencia de 50 mW.

Permitió obtener nos imágenes, una micrografía espacial y otra imagen de los espectros del modo vibracional en base a la concentración de los compuestos moleculares.

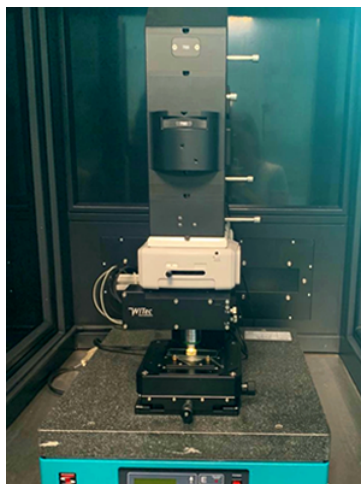


Figura 6. Espectroscopía raman - Laboratorio de Micología y Biotecnología.

V.3.5. Plan de análisis:

Las imágenes fueron analizadas y contabilizadas por un examinador capacitado con formación profesional superior de posgrado, sin conocer la identidad de los grupos con un primer cegamiento.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

El análisis de las micrografías se realizó con el software ImageJ (National Institute of health, bethesda, MD, Estados Unidos de América).⁶³

En el análisis estadístico se contabilizó el número total de túbulos dentinarios abiertos o parcialmente abiertos en cada una de las micrografías, en los tres momentos de tiempo (inicial, 7 días y 15 días), Posteriormente se usó el programa StataSE15 (Software StataCorp LLC) para las pruebas estadísticas respectivas, la importancia estadística se determinó mediante las pruebas de normalidad Shapiro-Wilk, al momento inicial y a los 7 días los grupos tuvieron una distribución normal

por lo que optamos aplicar la prueba ANOVA y al determinar el valor ($p < 0,01$), la prueba complementaria de HSD-Tukey. A los 15 días, los p valores de cada grupo de estudio, encontramos que el grupo III no cumplió con la normalidad, por lo que planteamos la prueba no paramétrica de H Kruskal-W.

El análisis estadístico por porcentaje de área de la región dental correspondiente a los túbulos abiertos en los tres momentos de tiempo, en el momento inicial se obtuvo una distribución normal, optando por la prueba ANOVA, a los 7 días no cumplió con la normalidad por lo que se realizó la prueba no paramétrica de H Kruskal-W y la prueba complementaria de post-hoc (test de Dunn).

A los 15 días, en los valores p de cada grupo de estudio, el grupo V no cumplió con la normalidad, por ello planteamos la prueba no paramétrica de H Kruskal-W.

El estudio contó con un nivel de confianza de 99% y un $p < 0,01$.

Espectroscopia raman confocal

Se contabilizó el valor otorgado a la intensidad del modo vibracional del ión fosfato ν_1 en los tres momentos de estudio, se determinó el aumento de mineral por porcentaje respecto a los 7 días y 15 días, y la disminución de mineral en porcentaje a los 15 días con respecto a los 7 días.

El análisis estadístico de todos los datos recabados se realizó con el paquete estadístico StataSE15 (Software StataCorp LLC).

Para analizar los datos, se evaluó la normalidad de ellos mediante la prueba Shapiro-Wilk, estableciendo valor p mayor a 0.01 eligiendo la prueba ANOVA para datos,

en los tres momentos (0 días, 7 días ,15 días), luego se realizó la prueba complementaria de bonferroni, el estudio contó con un nivel de confianza de 99 %.

V.4. Consideraciones éticas

La presente investigación contó con la aprobación del comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (constancia: 124-07-19).

VI. RESULTADOS

VI.1. Caracterización de nHAP - Análisis cristalográfico

La muestra de nanohidroxiapatita se sintetizó por el método sol-gel, se caracterizó por DRX para determinar la estructura y las fases cristalinas del producto obtenido, la figura 7 muestra la caracterización estructural de la nanohidroxiapatita sintetizada a partir de la cáscara de huevo, se confirmó con el difractómetro de rayos X (DRX), los espectros característicos a la composición molecular, dentro de los parámetros cristalográficos, se muestran las dimensiones de la celda y los ángulos que forman la disposición geométrica de la nanohidroxiapatita, estos datos obtenidos con el DRX, permitieron realizar el procesamiento por refinamiento Rietveld, obteniendo el valor (D): 10nm en donde evidenciamos el tamaño del grano.

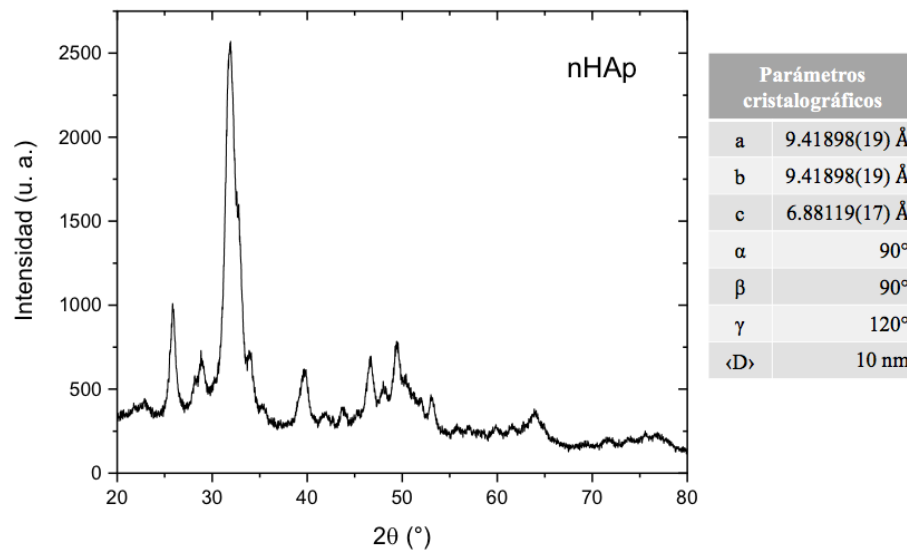


Figura 7. Cristalografía de Rayos X- (DRX)

La figura 8 muestra la representación molecular de la celda unitaria de hidroxiapatita, en base a los valores obtenidos del difractograma, el mineral se encuentra formado por calcio (Ca) representado con color azul, fósforo (P) en color morado, oxígeno (O) en color rojo e hidrógeno (H) en color blanco.

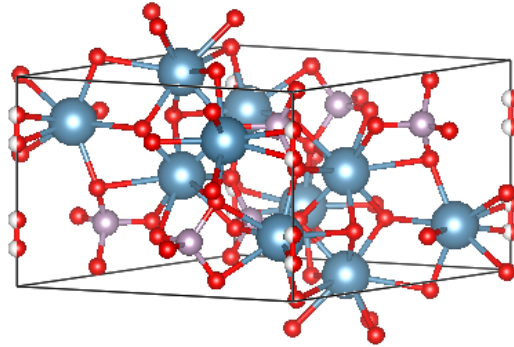


Figura 8. Celda Unitaria de hidroxiapatita

VI.2. Evaluación de las pastas experimentales

El gráfico 1 muestra el porcentaje de área a los túbulos dentinarios abiertos o parcialmente abiertos, en los tres momentos de estudio, al inicio todas las muestras presentaron los túbulos expuestos sin diferencia significativa entre ellos, luego de los 7 días después se aprecia la disminución del porcentaje de área de los TDs abiertos en todos los grupos, sin embargo en los grupos I, II, III se aprecia una mayor obliteración de túbulos que el grupo IV con diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,01$). A los 15 días de ser almacenados en agua y pasar por efecto erosivo se observa un incremento en el porcentaje de área, que es estadísticamente equivalentes entre los grupos. ($p < 0,01$).

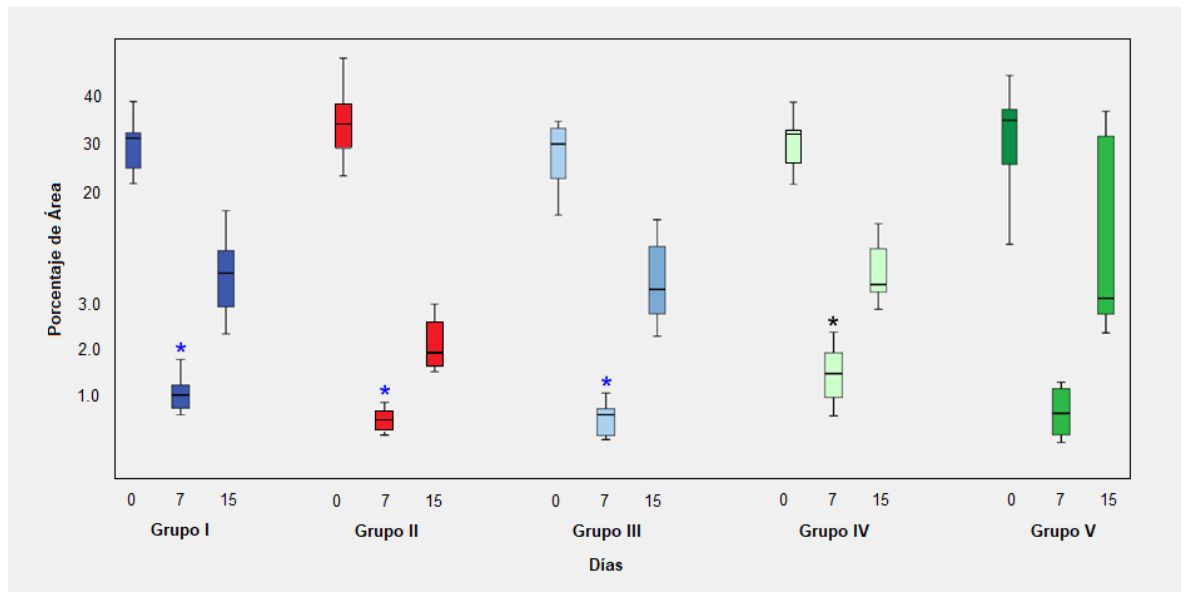


Gráfico 1. Diagrama de caja: Porcentaje de área de túbulos abiertos por micrografía MEB según grupos de estudio en tiempo inicial (0 días), 7 días, 15 días.

El gráfico 2 muestra el diagrama de cajas en base al número de TDs abiertos o parcialmente abiertos mediante MEB, en los tres momentos de estudio, donde se aprecia que un estado inicial (0 días), los 5 grupos de estudio presentan un porcentaje de área estadísticamente equivalentes ($p=0,449$), a los 7 días después de las aplicaciones de las pastas dentales se aprecia una notable disminución del número de TDs abiertos o parcialmente abiertos en todos los grupos ($p=0,085$), a los 15 días de ser almacenados en agua y pasar por otro efecto erosivo se observa un incremento en el número de túbulos, que no difieren significativamente entre los grupos estudiados ($p=0,122$).

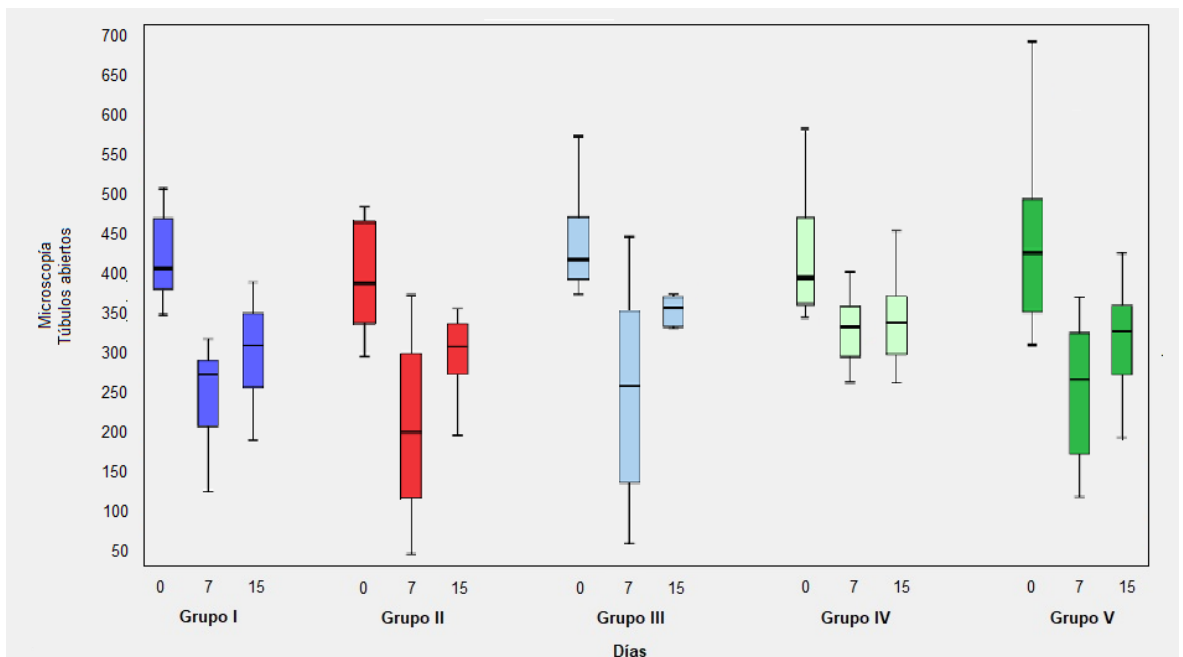


Gráfico 2. Túbulos abiertos por micrografía MEB según grupos de estudio en tiempo: 0 días, 7 días, 15 días.

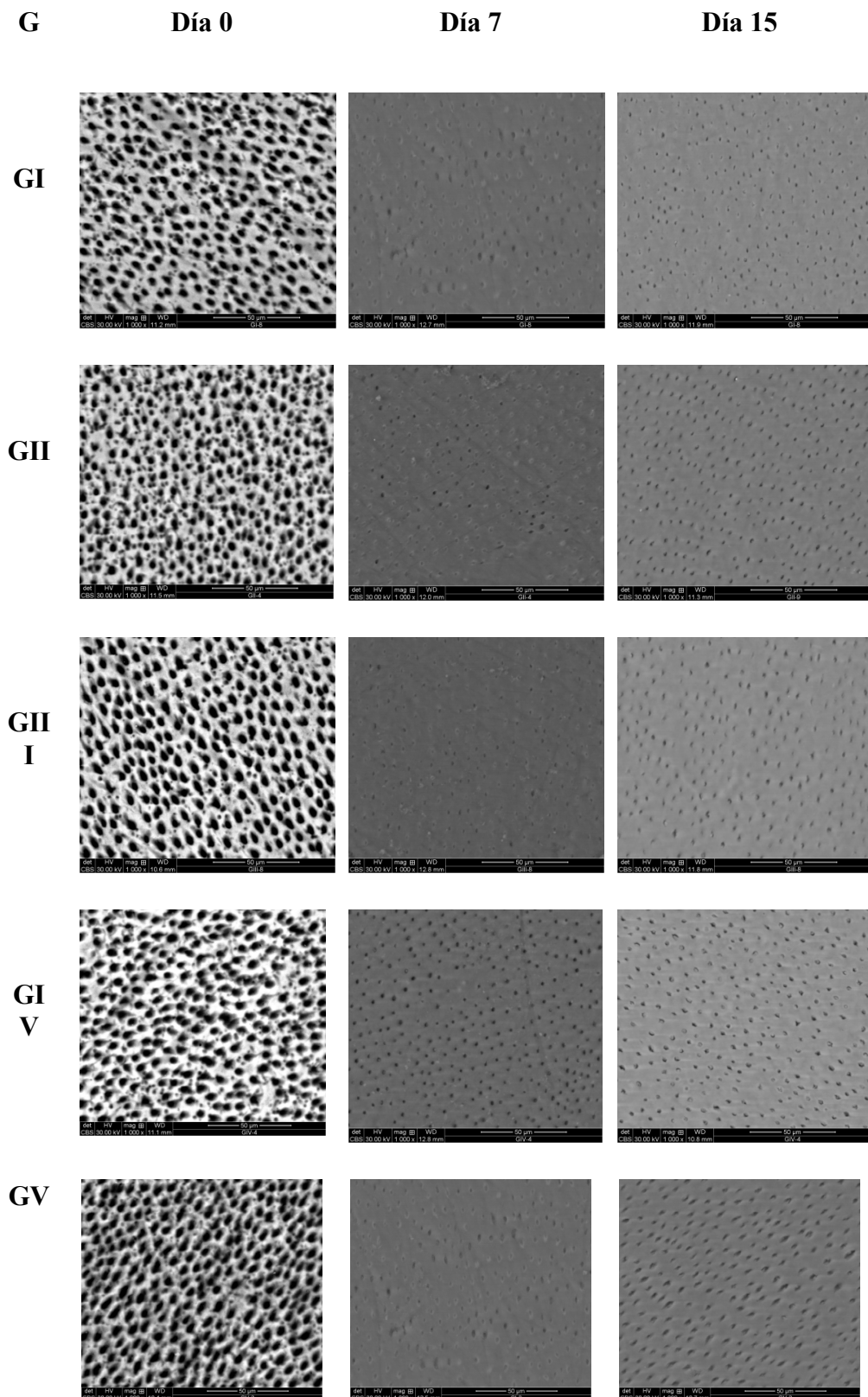


Figura 9. Micrografías MEB a 1000x, al inicio, a los 7 días de la aplicación de las pastas dentales y a los 15 días del efecto erosivo, según los grupos de estudio GI: nHAP al 3 %, GII: nHAP al 7 %, GIII: nHAP al 15 %, GIV: Biorepair[®], GV: Pasta dental sin nHAP.

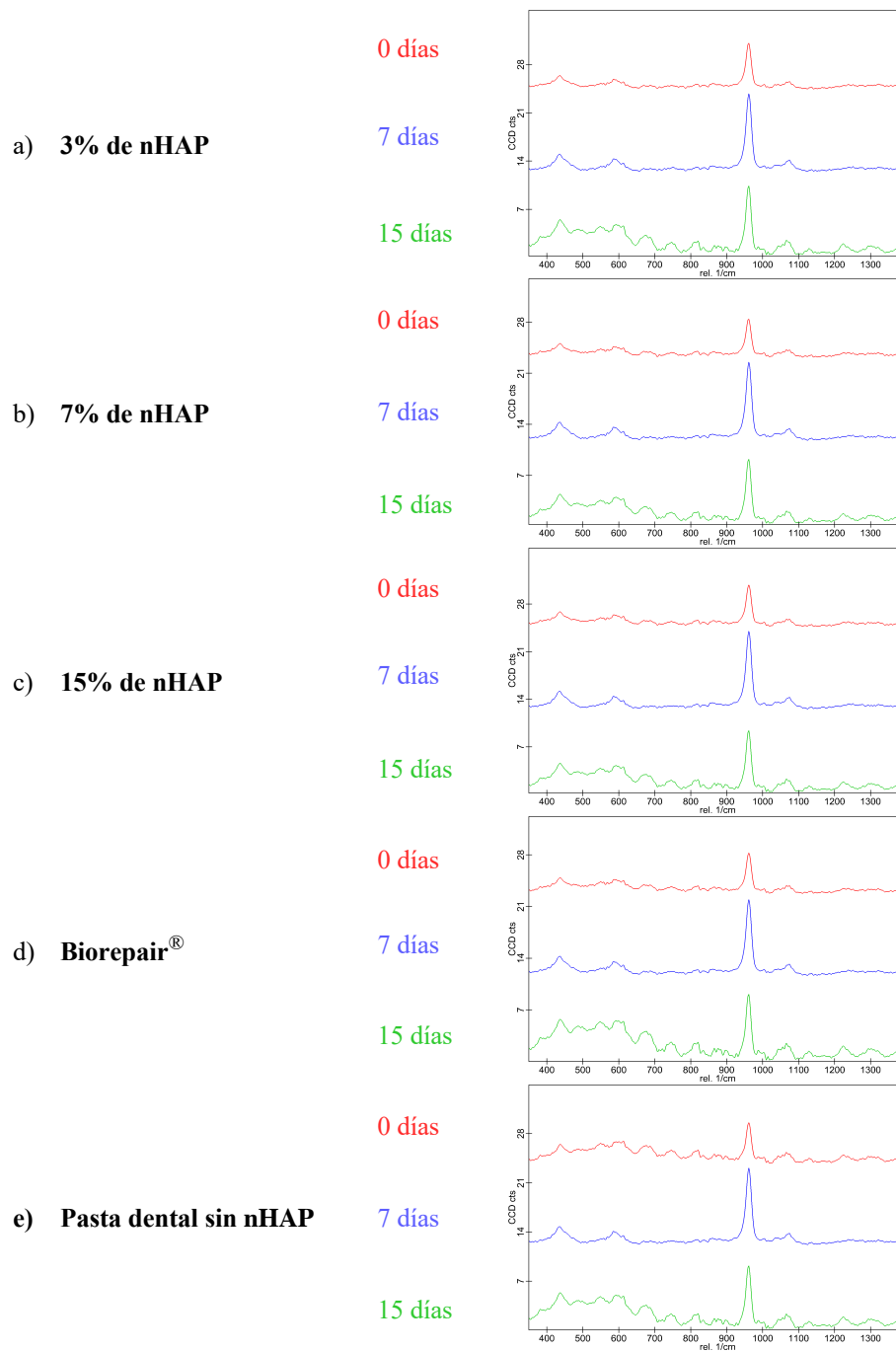


Figura 10. Espectros RAMAN ($400\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$), modo vibracional en base a la concentración del fosfato V_1 (961 cm^{-1}), al inicio, a los 7 días de la aplicación de las pastas dentales y a los 15 días del efecto erosivo, según los grupos de estudio (a,b,c,d,e).

El gráfico 3 se muestra el diagrama de cajas en cuanto a las diferencias en porcentaje de la intensidad del ión fosfato ν_1 mediante RAMAN a los 7 días después de las aplicaciones de las pastas dentales, el GI presentó una diferencia significativa con G5 ($p < 0,01$).

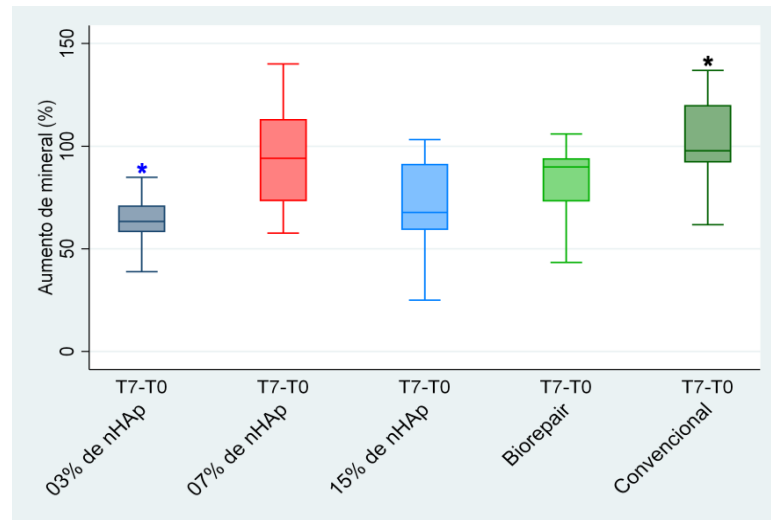


Gráfico 3. Diagrama de cajas del porcentaje de aumento del mineral (intensidad del modo vibracional del ión fosfato ν_1) por grupos de estudio en tiempo, al culminar los 7 días.

El gráfico 4 muestra el diagrama de cajas en cuanto a las diferencias en porcentaje de la intensidad del ión fosfato ν_1 mediante RAMAN a los 15 días después del efecto erosivo, entre los 5 grupos de estudio, no difieren estadísticamente entre los grupos estudiados ($p>0,01$).

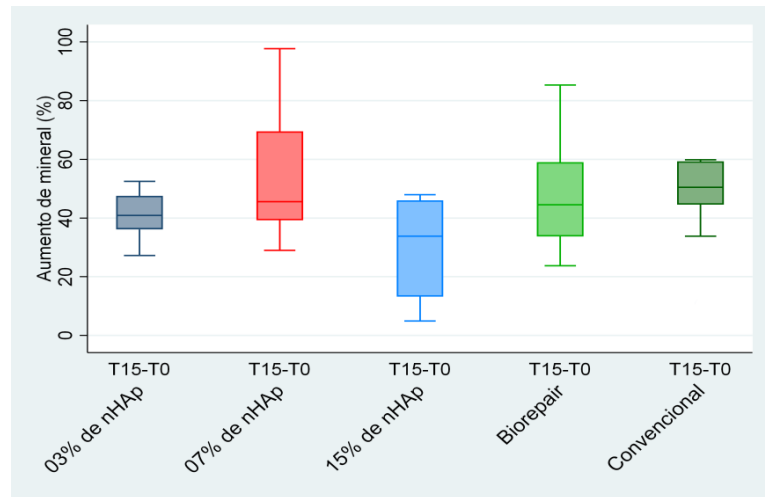


Gráfico 4. Diagrama de cajas del porcentaje de aumento del mineral (intensidad del modo vibracional del ión fosfato ν_1) por grupos de estudio en tiempo, a los 15 días después del efecto erosivo.

El gráfico 5 muestra el porcentaje en base a la diferencia en la disminución del mineral (fosfato ν_1), de los 5 grupos de estudios, después del efecto erosivo a los 15 días, no difieren estadísticamente entre los grupos estudiados ($p > 0,01$).

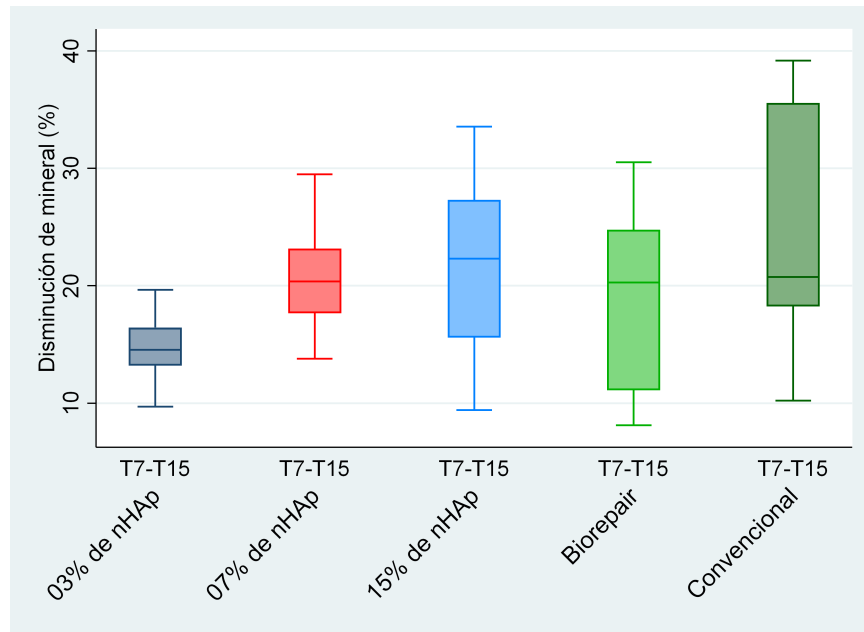


Gráfico 5. Cantidad de mineral (intensidad del modo vibracional del ión fosfato ν_1).

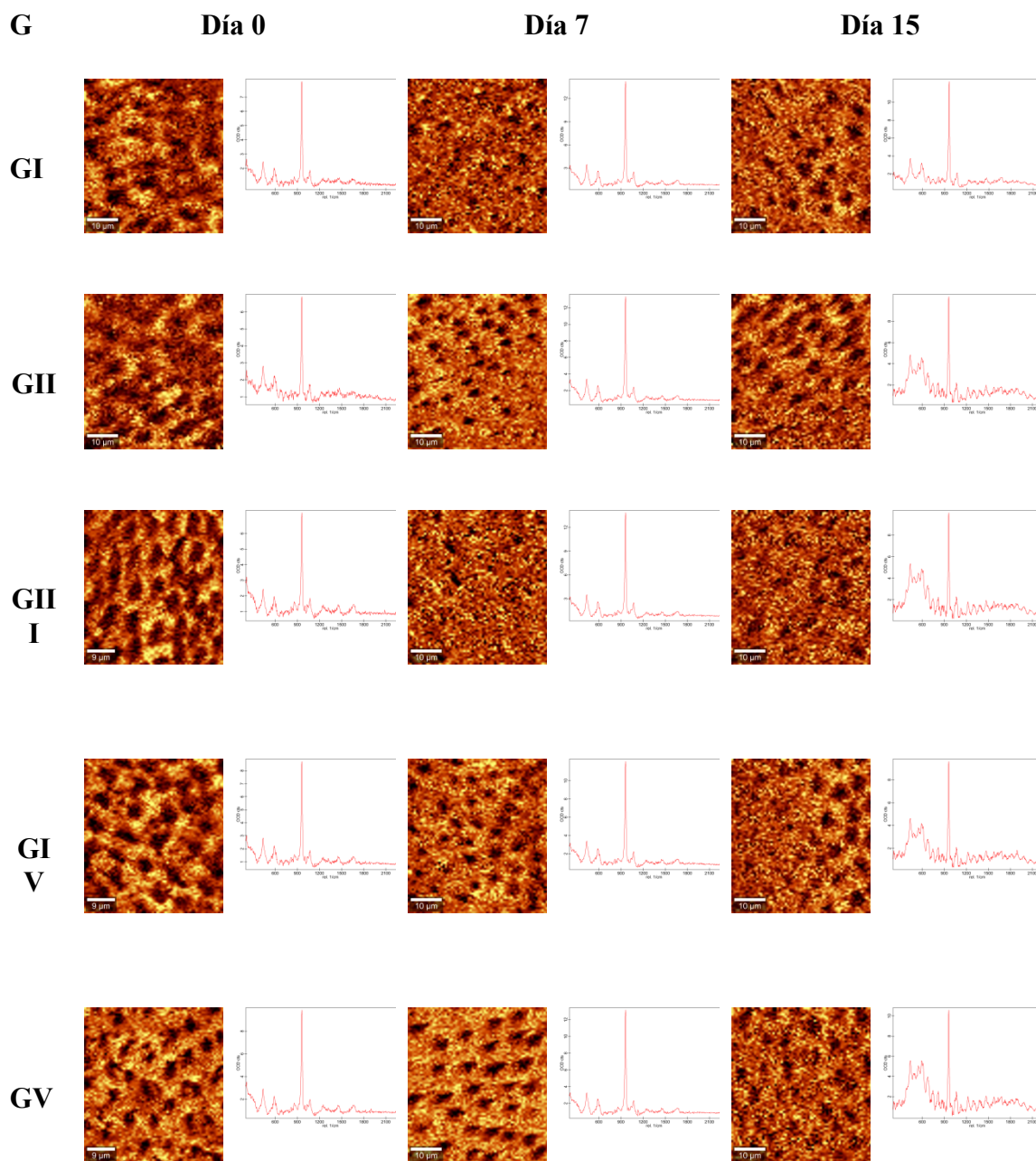


Figura 11. Micrografías espaciales y espectros RAMAN ($600\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$), modo vibracional en base a la concentración de los compuestos moleculares, imágenes de $50 \times 50\ \mu\text{m}^2$ a una potencia de 50 mW, al inicio, a los 7 días de la aplicación de las pastas dentales y a los 15 días del efecto erosivo, según los grupos de estudio GI: nHAP al 3 %, GII: nHAP al 7 %, GIII: nHAP al 15 %, GIV: Biorepair[®], GV: Pasta dental sin nHAP.

VII. DISCUSIÓN

Se logró caracterizar nanohidroxiapatita a partir de la cáscara de huevo mediante el método sol-gel⁵⁰, al ser de un recurso biodisponible, provee de un 98 % de carbonato de calcio y para que se pueda realizar la síntesis química necesita ser soluble en agua, por ello es importante el tratamiento térmico y obtener óxido de calcio como precursor para que a su vez pueda reaccionar con la solución de fosfato, reduciendo el nivel de contaminación al ser de mayor facilidad de producción a diferencia de otras vías de obtención que requieren usar múltiples reactivos controlados, como el ácido nítrico, ácido sulfúrico y el ácido clorhídrico⁶⁰⁻⁶⁶. La difracción de rayos X reveló que los componentes cristalinos de las partículas corresponden a nHAP con un tamaño de grano de (10 nm), nanoestructura obtenida por un adecuado control de agitación, velocidad de goteo, y tiempo de envejecimiento, hace posible que esta nanotecnología nos permite reemplazar la forma del tejido dental perdido, obliterando los TDs expuestos de los diferentes diámetros obtenidos en las micrografías y logrando la remineralización en el esmalte y la dentina, que podrían generar una barrera del mecanismo hidrodinámico en los TDs causantes del dolor. Algunos estudios informaron que en suspensiones que contenía 10% de partículas de nHAP (10–20 nm de diámetro) mejoró la remineralización de la capa superficial en las lesiones iniciales de caries a una profundidad de 20–40 μm .^{67,68}. Sin embargo es necesario analizar su comportamiento físico y químico de la nHAP dependiendo cual sea el medio de acción, este no presentará las mismas características, al ser usado como sustituto óseo, para obliterar los TDs expuestos, o para compuestos de cementación o de restauraciones,⁶⁹⁻⁷² los estudios sobre la estabilidad y las propiedades mecánicas del

nHAP para resinas de restauración agregan que carecen de fuerza y de estabilidad, a diferencias de los estudios de regeneración ósea Lee y col⁷³. Compararon hidroxiapatita de cáscaras de huevo y hidroxiapatita sintética y ambos tipos de nHAP mostraron una formación de hueso mayor que el grupo de no llenado. Sin embargo, la nHAP de cáscara de huevo tuvo una formación ósea significativamente mayor que el control sin relleno a las 8 semanas después de la operación. El presente estudio no obtuvo antecedentes de la elaboración de pastas dentales a base un recurso disponible como la cáscara de huevo, lo que hace necesario dotar a los diversos biomateriales una alta actividad con el uso de la nanotecnología en la superficie de acción, adquiriendo nuevas propiedades, así como funcionalidades específicas y evadir las debilidades como componentes individuales.

Se elaboró las pastas dentales a diferentes concentraciones de nHAP (3, 7, 15%) para su comparación y evaluación, teniendo en cuenta que la incorporación máxima del ingrediente activo para el cuidado oral corresponde al 20% en un dentífrico⁷⁴, para poder establecer si dichas diferencias de concentración del agente terapéutico conllevan a una mejor efectividad y estabilidad, lo que concluimos que a una mayor concentración no es predominante de efectividad, los tres grupos mostraron efectividad en la obliteración de los túbulos en las dos metodologías estudiadas sin embargo no existió diferencias estadísticamente significativa entre los tres grupos, el grupo del 7% de nHAP mostró menor porcentaje de área y menor número de TDs expuestos y mayor concentración del fosfato v_1 ($p > 0,01$ no significativo), es decir no conduciría un mayor efecto a mayor concentración, Huang y col⁷⁵ evaluaron el efecto de las concentraciones de nHAP 1, 5, 10, 15% en las lesiones iniciales del esmalte en condiciones de ciclos de pH dinámicos, concluyeron que la deposición

de mineral eventualmente llegaría a un nivel estable a pesar de que la concentración aumente, lo que resultaría en una diferencia no significativa entre los grupos de nHAP del 10% y 15%, quedando por investigar si estos resultados podrían diferir ante un medio bucal con un pH variable y la capacidad buffer salival^{76,77}, en el estudio de Meyer y col. (2019)⁷⁸ destacaron las propiedades de la hidroxiapatita para reducir la unión bacteriana a las superficies del esmalte, de igual manera que la clorhexidina, pero sin matar bacterias, es decir mantiene el microbioma oral en un estado homeostático.

Hemos evaluado dos metodologías para comparar las pastas experimentales formuladas, previa exposición de los TDs, estrechamente asociada como un efecto negativo que conduce a la hipersensibilidad dentinaria en los pacientes^{79,80}, una fue mediante análisis de imágenes tomadas con microscopía electrónica, en donde encontramos a 1000x aumentos con un tamaño de imagen de 200 x 200 μm^2 , un número de TDs expuestos por área de 277 hasta 672, de diámetros variados desde 2.8 μm hasta 14 μm , con un tamaño promedio de 8.2 μm , el análisis de los diámetros nos advierte de la variabilidad histológica de los TDs para lograr ser obliterados⁸¹, el estudio de la efectividad de las pastas dentales experimentales fue dirigida no solo a la cantidad de TDs abiertos o parcialmente abiertos, sino también al porcentaje de área que este conforme, con la finalidad de una mayor exactitud de efectividad a diferencia de otras investigaciones.^{77,82}

El análisis de espectrometría de raman es otra metodología ampliamente utilizada para investigar la capacidad de remineralización de diferentes materiales.^{83,84} Se examinó los picos espectrales característicos de la hidroxiapatita en función al

modo vibracional del fosfato ν_1 (961 cm^{-1}) dentro del tejido dental en similitud con otras investigaciones⁸⁵⁻⁸⁷, donde comparamos por porcentaje entre los grupos el aumento de $F\nu_1$ con respecto al estado inicial de los TDs expuestos.

A los 7 días después de las aplicaciones de las pastas dentales las muestras en ambas metodologías experimentaron cambios conformacionales y estructurales mediante MEB mostraron diferencias estadísticamente significativas en el grado de obliteración de TDs, se pudo evidenciar que las pastas experimentales a base de nHAP a partir de la cáscara de huevo en las diferentes concentraciones evaluadas logra una mayor obliteración de los TDs en comparación a la pasta comercial y el grupo control, las micrografías mostraron depósitos sustanciales de zonas de mineral que cubría los orificios de los túbulos, encontrándose áreas totalmente mineralizadas a diferencia del Biorepair[®] que el agregado de mineral no fue suficiente para eliminar la luz del túbulo. A su vez mediante RAMAN presentó un aumento considerable de remineralización en todos los grupos, y conforme a la diferencia en porcentaje la nHAP al 3% presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control.

Cuando la nHAP se integra a la superficie dental mediante el cepillado de dientes logra las propiedades físicas adecuadas para generar que las partículas ingresen a los TDs, lo que genera el suministro biodisponible adecuado para la remineralización, ayudando a mantener un estado tóxico de sobresaturación de estos iones con respecto a los minerales del diente⁸⁸, lo que resulta en la obliteración de los TDs, aunque esta teoría aún es poco conocida, su efectividad aumenta cuando sus dimensiones se reducen al régimen nanométrico⁸⁹, promoviendo la formación

de cristales de apatita organizados⁹⁰, esta interacción física, proviene de una similitud molecular, atrayéndose y acomodándose unas a otras, por ser de cargas opuestas, las fronteras del grano se pueden disociar y producir un grano mas grande, dichos granos ingresan por contacto o por presión, basandonos en el principio de adhesión electrostática se estaría formando una estructura cristalina dentro de los TDs. Este sistema biomimético busca mejorar la superficie dental de modo que no se aprecie una lesión ^{71,78,91-93}.

Onwubu y col (2019)⁵⁷ compararon un compuesto modificado de cáscara de huevo-dióxido de titanio (EB-TiO₂) en el manejo de la HD con un Tp de 65nm sobre la remineralización y el potencial de oclusión de las pastas dentales Colgate® y Sensodyne®, Significativamente, las muestras de dentina tratadas con EB-TiO₂ demostraron un sellado sobresaliente, así como características resistentes al ácido, destacaron que EB-TiO₂ podría proporcionar un material terapéutico más barato y eficiente en la gestión de la hipersensibilidad, lo que indica la viabilidad de integrar la cáscara de huevo para obtener tanto el carbonato de calcio como nHAP.

Las pastas experimentales elaboradas a partir de la nHAP de fuente natural, mostraron una eficacia al ser comparada con una nHAP a partir de sales sintéticas, la cual en investigaciones previas demostraron su efectividad en la obliteración de TDs^{17,79,94-96}.

Biorepair Total Protective Repair® contiene una formula patentada “microrepair®”, constituida principalmente por Zinc-Hidroxiapatita sin contenido de flúor, con un Tp que varía de 50 a 100 nm,⁴⁹ a una concentración del ingrediente activo de 15%, ampliamente estudiada por sus propiedades, por ser capaz de adherirse al tejido

dental formando una capa superficial protectora de mineral de fosfato de calcio resistente a los ácidos dietéticos^{45,46,49,53,59}, mientras que el dopaje con las partículas de zinc suministra un efecto antibacteriano⁴⁶, por tal motivo se decidió en la presente investigación comparar su efectividad con las pastas experimentales a base de nHAP.

Obteniéndose en las micrografías del grupo IV (biorepair®) una disminución considerable en el diámetro de los TDs, pero sin embargo existió presencia de una exposición dentinal con bordes definidos, que difiere de los grupos con las pastas experimentales. Nuestros resultados contrastan con hallazgos similares encontrados en el estudio previo realizado por Mathew y col.⁹⁷ donde según los 4 grupos de pastas dentales que contenían agentes remineralizantes, el uso de una pasta dentífrica a base de hidroxiapatita demostró una oclusión del TD muy significativa en comparación con CPP-ACP y fosfato tricálcico.

El grupo control (Pasta dental sin nHAP), contenía carbonato de calcio, sin embargo se pudo comprobar que oblitera los TDs, pero su resistencia y estabilidad es variable^{98,99}, puede ocluir pero no resiste eficientemente con los ácidos Arnold y col. (2015)¹⁰⁰, en comparación con los demás grupos, notándose en sus resultados la notable dispersión de los datos, consideraciones de suma importancia para la toma de decisiones clínicas, nuestros resultados difieren de los obtenidos por Yuan y col.⁷⁷ donde compararon la efectividad en la oclusión de TDs en pastas dentales a base de hidroxiapatita a diferentes tamaños de partícula (80 y 300 nm) y la compararon con un dentífrico a base de carbonato de calcio, este último mostró que la mayoría de los TDs estaban vacíos, con algunas zonas con presencia de

bloques, es decir, el carbonato de calcio no obliteró los TDs, se concluyó que el grupo de dentífricos nHAP de 80 nm mostró el mejor resultado, adicionalmente a la aplicación de las pastas, también se realizó un cepillado mecánico con agua destilada por 7 días adicionales, que coincide con nuestros resultados, porque se evidencia grados de pérdida de mineral, conservándose con mayor resistencia en los grupos de nHAP de 80nm y 300 nm, y contrastan con los resultados obtenidos por Fernández y col.¹⁰¹, al comparar dos dentífricos el Colgate® Sensitive (8% de arginina, bicarbonato y carbonato de calcio) y Sensodyne® Rápido Alivio (estroncio) respecto a un cepillado mecánico con agua destilada (grupo control), concluyendo que ambas pastas desensibilizantes son eficaces mediante la oclusión de TDs a comparación del grupo control, es decir las pastas dentales que contengan carbonato de calcio proporcionarán un efecto ocluser con el depósito de partículas insolubles de calcio, en el presente estudio se empleó un cepillo electrónico (marca vitis sonic® S20), independientemente de su eficacia en comparación a un cepillado manual en la eliminación de la placa bacteriana como bien lo refiere Elkerbout y col (2019)¹⁰², el uso de un cepillo sin pasta dental, no conduciría a ningún efecto abrasivo.¹⁰³ Ya que este actúa solo como vehículo del agente terapéutico a comparación de otras técnicas de higiene diaria.

El almacenamiento de las muestras sin la aplicación de las pastas dentales y el efecto erosivo realizado a los 15 días, eliminó parcialmente las fases precipitadas en la superficie de dentina observadas mediante MEB, pudiendo corroborarse con una disminución en la concentración del mineral en RAMAN, sin embargo la pérdida de mineral corresponde solo a un 20 – 30 % menos de la ganancia sin diferencias estadísticamente significativas, por consiguiente el suministro de iones

de zinc a la pasta comercial Biorepair[®] no reduce el efecto protector significativo frente a un desafío erosivo. En el medio bucal la desmineralización química de los dientes puede ser causada principalmente por el consumo de bebidas o alimentos ácidos y también por el ataque de los procesos metabólicos de las bacterias presentes en la boca, con un pH inferior al 5.5, lo que crea el ambiente propicio para la disgregación de HA, conduciendo a la desmineralización rápida de las superficies dentales^{104,105}, proceso dinámico y paulatino, con los hallazgos obtenidos que podemos concluir que la nHAP presente en las pastas experimentales logra integrarse como una apatita biológica a la superficie de la dentina creando enlaces químicos entre los cristales nuevos y los naturales del esmalte y así ser resistente al ataque ácido.

Al presentar con una amplia variedad de tratamientos para la HD, y sin contar con un agente Gold estándar como lo manifiestan West y col¹⁰⁶ y Pradeep y col¹⁰⁷, sugerimos que en futuros estudios se evalúe y compare la nHAP sintetizada a partir de la cáscara de huevo con un mayor tiempo de seguimiento y en diferentes presentaciones a un mayor tamaño muestral. Con la información obtenida por MEB y RAMAN afirmamos las propiedades de estabilidad y resistencia de las pastas dentales a base nHAP y por consecuencia su fabricación a partir de un recurso disponible como la cáscara de huevo otorga beneficios positivos, lo que hoy claramente la odontología moderna necesita, medidas de remineralización mínimamente invasivas, no solo para mejorar los resultados clínicos, sino también para mejorar el bienestar del paciente.¹⁰⁸

VIII. CONCLUSIONES

1. La pasta experimental a base de nanohidroxiapatita en las concentraciones evaluadas oblitera los túbulos dentinarios.
2. Se logró caracterizar nanohidroxiapatita a partir de la cáscara de huevo.
3. Se formularon las pastas a base nanohidroxiapatita en las diferentes concentraciones 3,7 y 15 %.
4. Mediante microscopía electrónica de barrido se observa obliteración de túbulos en las pastas con las concentraciones de 3, 7 y 15% luego de 7 días de cepillado.
5. Según espectroscopia raman, se evidencia la remineralización de la estructura dentaria a partir de la aplicación de las pastas dentales, sin embargo, ocurre menor remineralización con la pasta experimental con 3% de nHAP.
6. No hay diferencias en los grupos estudiados luego de efecto erosivo realizado a los 15 días, desmineraliza parcialmente las fases precipitadas en la superficie de dentina observada mediante MEB y RAMAN.

IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con la línea de investigación, sintetizando nanohidroxiapatita a partir de la cáscara de huevo, realizando estudios in vitro e in situ y estudios clínicos de hipersensibilidad dentinaria que evalúen periodos de tiempo más prolongados a un mayor tamaño muestral, con las fluctuaciones del medio bucal con un pH variable y la capacidad buffer salival, dotando a la nHAP nuevos agentes como el flúor.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kopycka-kedzierawski DT, Meyerowitz C, Litaker MS, Heft MW, tasgaonkar N, Day MR, et al. Management of dentin hypersensitivity by practitioners in the national dental practice-based research network. *J Am Dent Assoc.* 2017; 148(10):728-736.
2. Dababneh RH, Khouri AT, Addy M. Dentine hypersensitivity- an enigma? A review of terminology, mechanisms, an etiology and management. *Br Dent J.* 1999;187(11):606-611.
3. Kopycka-Kedzierawski DT, Meyerowitz C, Litaker MS, Chonowski S, Heft MW, Gordan VV, et al. Management of dentin hypersensitivity by national dental practice-based research network practitioners: results from a questionnaire administered prior to initiation of a clinical study on the topic. *BMC Oral Health.* 2017; 17(1):41-48.
4. Goh V, Corbet EF, Leung WK. Impact of dentine hypersensitivity on oral health-related quality of life in individuals receiving supportive periodontal care. *J Clin Periodontol.* 2016; 43(7):595-602.
5. Addy M. Clinical aspects of dentine hypersensitivity. *Proc Finn Dent Soc.* 1992; 88(1):23-30.
6. Orchardson R, Gillam DG. Managing dentin hypersensitivity. *J Am Dent Assoc.* 2006; 137(7):990-998.
7. Moraschini V, Da costa LS, Dos Santos GO. Effectiveness for dentin hypersensitivity treatment of non-carious cervical lesions: a meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2018; 22(2):617-631.

8. Cava C, Robello J, Olivares C, Rodríguez L, Reyes J, Salazar G. Prevalencia de la hipersensibilidad dentaria en pacientes con recesión gingival. *KIRU*. 2016; 13(2): 113-119.
9. Ramírez PE. prevalencia de hipersensibilidad dentinaria en pacientes con lesiones cervicales no cariosas que acuden al hospital militar central lima 2019. [tesis para optar el título profesional de cirujano dentista]. Universidad de Huánuco. 2019.
10. Zeola LF, Soares PV, Cunha-Cruz J. Prevalence of dentin hypersensitivity: systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2019; 81(1):1-6.
11. Liu HC, Lan WH, Hsieh CC. Prevalence and distribution of cervical dentin hypersensitivity in a population in Taipei, Taiwan. *J Endod*. 1998; 24(1):45-47.
12. Gillam DG, Seo HS, Bulman JS, Newman HN. Perceptions of dentine hypersensitivity in a general practice population. *J Oral Rehabil*. 1999; 26(9):710-714.
13. Cunha-Cruz J, Wataha JC, Heaton LJ, et al. The prevalence of dentin hypersensitivity in general dental practices in the northwest United States. *JADA*. 2013; 144(3):288-296.
14. Ress JS. The prevalence of dentine hypersensitivity in general dental practice in the UK. *J Clin Periodontol*. 2000; 27(11):860-865.
15. Amarasena N, Spencer J, Ou Y, Brennan D. Dentine hypersensitivity- Australian dentists' perspective. *Aust Dent J*. 2010; 55(2):181-187.

16. 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):90-95.
17. Kula R, Jayanti I, Sambashivaiah S, Bilchidmath S. An In-vitro Comparison of nano hydroxyapatite, novamin and proargin desensitizing toothpastes – A SEM study. *J Clin Diagn Res*. 2016; 10(10):Zc51-Zc54.
18. Cantin M, Vilos C, Suazo I. Nanodontología: El futuro de la odontología basada en sistemas nanotecnológicos. *Int. J. Odontostomat*. 2010; 4(2):127-132.
19. Siva Rama Krishna D, Siddharthan A, Seshadri SK, Sampath Kumar TS. A novel route for synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from eggshell waste. *J Mater Sci Mater Med*. 2007; 18(9):1735-1743.
20. Miranda-Pinto C, Oliveira J, Gomes T. Influencia de la base en la estabilidad térmica de hidroxiapatita sintetizada a partir de cáscara de huevo. *Información Tecnológica*. 1998; 9(2):61-64.
21. Barbero JG. *Patología y terapéutica dental*. 2ª ed. España: Elsevier ; 2014: 09-12.
22. Nanci A. *Ten cate's oral histology-e-book: Development, structure, and function*. 8th Edition. Canada: Elsevier Health Sciences; 2017:157-160.
23. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011; 3(1):711-735.
24. Marshall JR, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent*. 1997; 25(6):441-458.

25. Lin X, Xie F, Ma X, Hao Y, Qin H, Long J. Fabrication and characterization of dendrimer- functionalized nano-hydroxyapatite and its application in dentin tubule occlusion. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2017; 28(9):846-863
26. Fosse G, Saele PK, Eide R. Numerical density and distributional pattern of dentin tubules. *Acta Odontol Scand.* 1992; 50(4):201-210.
27. Olsson S, Oilo G, Adamczak E. The structure of dentin surfaces exposed for bond strength measurements. *Scand J Dent Res.* 1993; 101(3):180-184.
28. Hernández R. Hidroxiapatita y sus aplicaciones *Rev. Mex. Fis.* 1999; 45(1):144-147.
29. Kattimani V, Lingamaneni KP, Chakravarthi PS, Kumar TS, Siddharthan A. Eggshell-Derived Hydroxyapatite: A New Era in Bone Regeneration. *J Craniofac Surg.* 2016; 27(1):112-117.
30. Vélez J, Cardona N, Gómez J, López E. Síntesis de hidroxiapatita por combustión a partir del carbonato de calcio obtenido de cáscaras de huevo de gallina. *Revista Colombiana de Materiales.* 2014; 1(5):97-102.
31. Hincke MT, Nys Y, Gautron J, Mann K, Rodriguez-Navarro AB, McKee MD. The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012; 17(1):1266-1280.
32. Pereda C, Gonzáles R. Aplicaciones de la hidroxiapatita coralina HAP-200 como material de implante ósea en Ortopedia. *Biomédica.* 1994; 14(1):22-9.
33. Adzila S, Sopyan I, Shukor BA, Hamdi M. Mechanochemical synthesis of hydroxyapatite monopowder: Effects of rotation speed and milling time on powder properties. *App Mech Mater.* 2012; 110(116):3639-3644.

34. Martínez M, Domínguez V. Nanotecnología en Odontología: Avances científicos-tecnológicos. Ventajas y riesgos. Rev Museo Fac Odontol B Aires.2010; 25(1):58-67.
35. Martínez HR, Abdale HM, Treviño E, Garza G, Pozas A, Rivera G. Aplicación de la nanotecnología en odontología: Nano-odontología. Rev. CES Odont. 2011; 24(2):87-91.
36. Brännström M, Aström A. The hydrodynamics of the dentine, it's possible relationship to dentinal pain. Int Dent J. 1972; 22(1):219-227.
37. Brännström M. Etiology of dentin hypersensitivity. Proc Fin Dent Soc. 1992; 88(1):7-13.
38. Miglani S, Aggarwal V, Ahuja B. Dentin hypersensitivity: recent trends in management. J Conserv Dent. 2010; 13(4):218-224.
39. Arrais C, Chan D, Giannini M. Effects of desensitizing agents on dentinal tubule occlusion. J Appl Oral Sci. 2004; 12(2):144-148.
40. Cummins D. Hipersensibilidad dentinaria: Desde el diagnóstico hasta una terapia avanzada para el alivio diario de la sensibilidad. J Clin Dent. 2009; 20(1):1-9.
41. Al-Saud LM, Al-Nahedh HN. Occluding effect of Nd: YAG laser and different dentin desensitizing agents on human dentinal tubules in vitro: a scanning electron microscopy investigation. Oper Dent. 2012; 37(4):340-355.
42. Oberg C, Pochapski MT, Farago PV, Granado CJ, Pilatti GL, Santos FA. Evaluation of desensitizing agents on dentin permeability and dentinal tubule occlusion: an in vitro study. Gen Dent. 2009; 57(5):496-536.

43. Hiller KA, 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):1-13.
44. Al-Maliky MA, Mahmood AS, Al-Karadaghi TS, et al. The effects of CO₂ laser with or without nanohydroxyapatite paste in the occlusion of dentinal tubules. *Sci World J.* 2014; 2014(1):1-8.
45. Lelli M, Marchetti M, Foltran I, Roveri N, Putignano A, Procaccini M, et al. Remineralization and repair of enamel surface by biomimetic Zn-carbonate hydroxyapatite containing toothpaste: a comparative in vivo study. *Front Physiol.* 2014; 5(333):1-8.
46. 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.
47. Iijima M, Kawaguchi K, Kawamura N, Ito S, Saito T, Mizoguchi I. The effects of single application of pastes containing ion-releasing particles on enamel demineralization. *Dent Mater J.* 2017; 36(4):461-468.
48. Baglar S, Erdem U, Dogan M, Turkoz M. Dentinal tubule occluding capability of nano-hydroxyapatite; The in-vitro evaluation. *Microsc Res Tech.* 2018; 81(8):843-854.
49. Bossù M, Saccusi M, Salucci A, Di Giorgio, Bruni E, Uccelletti D, Sarto MS, Familiari G, Rulencenti M, Polimeni A. 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.

50. Ansari M, Naghib SM, Moztarzadeh F, Salati A. Synthesis and characterization of hydroxyapatite calcium hydroxide for dental composites. *Ceramics*. 2011; 55(2):123-126.
51. Appel G, Réus M. *Formulações aplicadas à odontologia*. 2da edição. RCN Editora; 2005: 607-610.
52. 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; 7(8):118–122.
53. Colombo M, Mirando M, Rattalino D, Beltrami R, Chiesa M, Poggio C. Remineralizing effect of a zinc-hydroxyapatite toothpaste on enamel erosion caused by soft drinks: Ultrastructural analysis. *J Clin Exp Dent*. 2017; 9(7):e861-e868.
54. Cao Y, Liu W, Ning T, Mei ML, Li QL, Lo EC, et al. A novel oligopeptide simulating dentine matrix protein 1 for biomimetic mineralization of dentine. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(3):873-881.
55. Poggio C, Lombardini M, Dagna A, Chiesa M, Bianchi S. Protective effect on enamel demineralization of a CPP-ACP paste: an AFM in vitro study. *J Dent*. 2009; 37(12):949–954.
56. Ghafournia M, Tehrani MH, Nekouei A, Faghihian R, Mohammad pour M, Feiz A. In vitro evaluation of dentin tubule occlusion by three bioactive materials: A scanning electron microscopic study. *Dent Res J*. 2019; 16(3):166-171.

57. Onwubu SC, Mdluli PS, Singh S, Tlapana T. A novel application of nano eggshell/titanium dioxide composite on occluding dentine tubules: an in vitro study. *Braz. Oral Res.* 2019; 33(1):e016-e026.
58. Duran CL, López AM, Cotrina LD. Evaluación de tres bebidas carbonatadas sobre la superficie del esmalte dental. *Rev Estomatol Herediana.* 2007; 17(2):58-62.
59. Lombardini M, Ceci M, Colombo M, Bianchi S, Poggio C. Preventive effect of different toothpastes on enamel erosion: AFM and SEM studies. *Scanning.* 2014; 36(4):401-410.
60. Pei D, Meng Y, Li Y, Liu J, Lu Y. Influence of nanohydroxyapatite containing desensitizing toothpastes on the sealing ability of dentinal tubules and bonding performance of self-etch adhesives. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2019; 91(1):38-44.
61. Galdames B, Brunoto, M, Marcus N, Grandon F, Priotto E. Diferentes Protocolos de Grabado Ácido en Dentina; Estudio Micromorfológico. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* 2018; 11(2): 91-97.
62. Mesa CM, Henao EA. Composición química y microestructura de la dentina de pacientes colombianos. *Revista Colombiana de Materiales.* 2014; 1(5): 73-78.
63. Roels J, Vernailen F, Kremer A, Gonçalves A, Aelterman J, Luong HQ, et al. An interactive ImageJ plugin for semi-automated image denoising in electron microscopy. *Nat Commun.* 2020; 11(1):1-13.
64. Camacho I, Vela M, Aburto L, Villanueva A, Amanca F, Marcatoma J. Hydroxyapatite synthesized from the eggshell as a potential bone substitute

- in periodontal and peri-implant defects. *Odontol. Sanmarquina*. 2018; 21(4):296-301.
65. Amna T. Valorization of Bone Waste of Saudi Arabia by Synthesizing Hydroxyapatite. *Appl Biochem Biotechnol*. 2018; 186(3):779-788.
66. Mondal S, Mondal B, Dey A, Mukhopadhyay S. Studies on processing and characterization of hydroxyapatite biomaterials from different Bio Wastes. *J. Miner. Mater. Charact. Eng*. 2012; 11(1):55-67.
67. 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(10):811-819.
68. Memarpour M, Shafiei F, Rafiee A, Soltani M, Dashti HM. Effect of hydroxyapatite nanoparticles on enamel remineralization and estimation of fissure sealant bond strength to remineralized tooth surfaces: an in vitro study. *BMC Oral Health*. 2019; 19(92):1-14.
69. Arcos D, Vallet RM. Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants. *J Mater Chem B*. 2020; 8(9):1-45.
70. Pajor K, Pajchel L, Kolmas J. Hydroxyapatite and fluorapatite in conservative dentistry and oral implantology—A review. *Materials*. 2019; 12(17):2683-2699.
71. Scribante A, Farahani MR, Marino G, Matera C, Rodriguez R y Baena, Lanteri V, Butera A. Biomimetic effect of nano-hydroxyapatite in demineralized enamel before orthodontic bonding of brackets and attachments: Visual, adhesion strength, and hardness in vitro tests. *BioMed Res. Int*. 2020; 2020: 6747498.

72. Imura K, Hashimoto Y, Okada M, Yoshikawa K, Yamamoto K. Application of hydroxyapatite nanoparticle-assembled powder using basic fibroblast growth factor as a pulp-capping agent. *Dent Mater J.* 2019; 38(5):713-720.
73. Lee SW, Kim SG, Balázs C, Chae WS, Lee HO. Comparative study of hydroxyapatite from eggshells and synthetic hydroxyapatite for bone regeneration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.*2012; 113(3):348-355.
74. Ramis JM, Coelho CC, Córdoba A, Quadros PA, Monjo M. Safety Assessment of Nano-Hydroxyapatite as an Oral Care Ingredient according to the EU Cosmetics Regulation. *Cosmetics.* 2018; 5(3):53-66.
75. Huang S, Gao S, Yu H. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomed. Mater.* 2009; 4(3):1-6.
76. Zhang J, Sardana D, Wong M, Leung K, Lo E. Factors associated with dental root caries: A systematic review. *DR Clin Trans Res.* 2020; 5(1):13-29.
77. Yuan P, Liu S, Lv Y, Liu W, Ma W, Xu P. Effect of a dentifrice containing different particle sizes of hydroxyapatite on dentin tubule occlusion and aqueous Cr (VI) sorption. *Int J Nanomedicine.*2019; 14(1):5243-5256.
78. Meyer F, Enax J. Hydroxyapatite in oral biofilm management. *Eur J Dent.* 2019; 13(2):287-290.
79. Vano M, Derchi G, Barone A, Pinna R, Usai P, Covani U, Reducing dentine hypersensitivity with nano-hydroxyapatite toothpaste: A double-blind randomized controlled trial. *Clin. Oral Investig.* 2018; 22(1):313-320.

80. Berkathullah M, Farook MS, Mahmoud O. The effectiveness of remineralizing agents on dentinal permeability. *Biomed Res Int.* 2018; 2018:4072815.
81. Manz A, Attin T, Sener B, Sahrman P. Dentin tubule obturation of a bioglass- based dentin desensitizer under repeated exposure to lactic acid and brushing. *BMC Oral Health.*2019; 19(1):1-9.
82. Pinto SCS, Silveira CMM, Pochapski MT, Pilatti GL, Santos FA Effect of desensitizing toothpastes on dentin. *Braz Oral Res.*2012; 26(5):410-417
83. Shipp DW, Sinjab F, Notingher I. Raman spectroscopy: techniques and applications in the life sciences. *Adv Opt Photonics.* 2017; 9(2):315-428.
84. Eliades G, Mantzourani M, Labella R, Mutti B, Sharma D. Interactions of dentine desensitisers with human dentine: Morphology and composition. *J Dent.*2013; 41(4):s28–s39.
85. Ko A, Choo L, Hewko M, Leonardi L, Sowa M. Ex vivo detection and characterization of early dental caries by optical coherence tomography and Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 2005; 10(3):1118-1134.
86. Guentsch A, Fahmy M, Wehrle C, Nietzsche S, Popp J, Watts D, et al. Effect of biomimetic mineralization on enamel and dentin: A Raman and EDX analysis. *Dent Mater.* 2019; 3381(1):1-8.
87. Soares L, Nahórny S, Braga V, Marciano F, Bhattacharjee T, Lobo A. Raman spectroscopy-multivariate analysis related to morphological surface features on nanomaterials applied for dentin coverage. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2020; 228(1):1-35.

88. Hannig M, Hannig C. Nanotechnology and its role in caries therapy. *Adv. Dent. Res.* 2012; 24(2):53-57.
89. Carrouel F, Viennot S, Ottolenghi L, Gaillard C, Bourgeois D. Nanoparticles as anti-microbial, anti-inflammatory, and remineralizing agents in oral care cosmetics: A review of the current situation. *Nanomater.* 2020; 10(1):140-172.
90. Ruan Q, Moradian-Oldak J. Amelogenin and enamel biomimetics. *J Mater Chem B* .2015; 3(16):3112-3129.
91. Amaechi BT, AbdulAzees PA, Alshareif DO, Shehata MA, Lima PP, Abdollahi A, et al. Comparative efficacy of a hydroxyapatite and a fluoride toothpaste for prevention and remineralization of dental caries in children. *BDJ Open.*2019; 5(18):1-9.
92. Niu L, Zhang W, Pashley D, Breschi L, Mao J, Chen J, et al. Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater.* 2014; 30(1):1-35.
93. Philip N. State of the Art Enamel Remineralization Systems: The Next Frontier in Caries Management. *Caries Res.* 2019; 53(3):284-295.
94. Tschoppe P, Zandim D, Martus P, Kielbassa A. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *J Dent.* 2011; 39(6):430-437.
95. Vijayasankari V, Asokan S, GeethaPriya P. Evaluation of remineralisation potential of experimental nano hydroxyapatite pastes using scanning electron microscope with energy dispersive X-ray analysis: an in-vitro trial. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2019; 20(6):529-536.

96. Alencar CM, Leite KLF, Ortiz MIG, Magno MB, Rocha GM, Silva CM. Morphological and chemical effects of in-office and at-home desensitising agents containing sodium fluoride on eroded root dentin. *Arch Oral Biol.* 2020; 110(1):1-22.
97. Mathew MG, Soni AJ, Khan MM, Kauser A, Charan VS, Akula SK. Efficacy of remineralizing agents to occlude dentinal tubules in primary teeth subjected to dentin hypersensitivity in vitro: SEM study. *J Family Med Prim Care.* 2020; 9(1):354-358.
98. Nakashima S, Yoshie M, Sano H, Bahar A. Effect of a test dentifrice containing nano-sized calcium carbonate on remineralization of enamel lesions in vitro. *J Oral Sci.* 2009; 51(1):69-77.
99. Wang Z, Sa Y, Sauro S, Chen H, Xing W, Ma X, et al. Effect of desensitising toothpastes on dentinal tubule occlusion: a dentine permeability measurement and SEM in vitro study. *J Dent.* 2010; 38(5):400-410.
100. Arnold WH, Prange M, Naumova EA. Effectiveness of various toothpastes on dentine tubule occlusion. *J Dent.* 2015; 43(4):440-449.
101. Fernández E, González H, Arias R, Batista O, Fresno C, Casielles M, et al. Influencia de 2 dentífricos con agentes desensibilizantes en la conductabilidad hidráulica dentinaria. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral.* 2014; 7(3):157-163.
102. Elkerbout TA, Slot DE, Rosema NAM, Van der Weijden GA. How effective is a powered toothbrush as compared to a manual toothbrush? A systematic

review and meta-analysis of single brushing exercises. *Int J Dent Hyg.* 2019; 18(1):17-26.

103. Wiegand A, Schwerzmann, M, Sener B. Impacto de la mezcla abrasividad pasta de dientes y la rigidez del filamento del cepillo de dientes en la abrasión del esmalte erosionado—un estudio in vitro. *Acta Odontol Scand.*2008; 66(4): 231-235.

104. Abou Neel EA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM, et al. Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine.* 2016; 19(11):4743-4763.

105. Foong LK, Foroughi MM, Mirhosseini AF, Safaei M, Jahani S, Mostafavi M, et al. Applications of nano-materials in diverse dentistry regimes. *RSC Adv.* 2020; 10(26):15430-15460.

106. West N, Seong J, Davies M. Dentine hypersensitivity. *Monogr Oral Sci.* 2014; 25(1):108-122.

107. Pradeep AR, Sharma A. Comparison of clinical efficacy of a dentifrice containing calcium sodium phosphosilicate to a dentifrice containing potassium nitrate and to a placebo on dentinal hypersensitivity: a randomized clinical trial. *J Periodontol.*2010; 81(8):1167-1173.

108. Pitts NB, Wright JP. Reminova and EAER: keep-ing enamel whole through caries remineralization. *Adv Dent Res.* 2018; 29(1):48-54.