

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

*Caracterización de la fluorosis dental
mediante espectroscopía Raman*

Tesis que presenta:
Marco Antonio Zepeda Zepeda
Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias (Física)



Asesor: **Dr. Michel Picquart**



Ciudad de México

Febrero 2022

Índice general

1. Introducción	7
1. Antecedentes	7
2. Esmalte dental	8
3. Fluorosis dental	13
4. Fluorosis: problema de Salud Pública	15
2. Marco Teórico	17
1. Espectroscopía Raman	17
2. Aproximación Clásica	18
3. Aproximación Cuántica	21
4. Hidroxiapatita: elementos cristalográficos, simetría y modos vibracionales	23
5. Estudios previos de OHAp y esmalte dental mediante espectroscopía Raman	27
6. Técnicas de Análisis Complementarias	30
3. Objetivo	31
4. Método	33
1. Material	33
2. Preparación de las muestras	34
3. Clasificación de las piezas dentales según su estado de fluorosis	34
4. Descripción del equipo utilizado y definición de los parámetros de adquisición de los espectros Raman	35
5. Equipo de Rayos X y parámetros utilizados para la generación de los difractogramas	36
6. Equipo de Microscopía Electrónica de Barrido utilizado para llevar a cabo el estudio SEM/EDS	36
7. Análisis de los datos (Espectros Raman)	36
8. Análisis de los datos (Difractogramas de Rayos X)	38
5. Resultados	43
1. Espectros Raman promedio	43
2. Dispersión de las alturas de las bandas de los espectros Raman correspondientes al ion $(PO_4)^{3-}$ y al ion $(CO_3)^{2-}$, traslape entre categorías diferentes de fluorosis	49
3. Analisis de Componentes Principales (PCA) de los espectros Raman	60

4.	Construcción del modelo de clasificación de aprendizaje supervisado para fluorosis dental a partir de Analisis Discriminante Lineal (LDA) en el espacio 3D-PCA	64
5.	Resultados del Análisis de Difracción de Rayos X (XRD) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) del esmalte dental	70
6.	Discusión	81
7.	Conclusiones	93
A.	Cristalografía, Redes de Bravais y simetrías	95
B.	Análisis de Componentes Principales	105
	Bibliografía	113

Agradecimientos

El trabajo de tesis que presento llega a su fin gracias al apoyo y participación de muchos profesores e investigadores, tanto del campo de la física como el de la salud.

Agradezco al Dr. Michel Picquart, del Departamento de Física de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería, UAM-I, por haber aceptado ser el director de este trabajo de investigación y llevarlo a buen fin. Le agradezco sus enseñanzas en todo lo referente a los aspectos teóricos de la espectroscopía Raman y sus aplicaciones. Me enseñó a trabajar con la tecnología Raman en el laboratorio. Quedo en deuda con él por todo lo que me ha aportado.

Agradezco a la Dra. Izayana Carrasco Morales del Departamento de Atención a la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-X, por haber estimulado mi interés en la intersección del saber médico y la física.

Agradezco a la Dra. Ma. Esther Irigoyen y a la Dra. Adriana Mejía González por su colaboración en partes fundamentales de esta esta investigación. A la Dra. Irigoyen, del Departamento de Atención a la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-X, no sólo le debo haberme motivado para la realización de esta investigación, y que junto con el Dr. Picquart me animaron para involucrarme en la realización de este doctorado. A la Dra. Irigoyen le debo también sus enseñanzas en el campo de la epidemiología y salud pública bucal; gracias a su participación esta investigación pudo contar una adecuada clasificación de los dientes en términos de la severidad de fluorosis; en todo momento conté con su conocimiento para la adecuada interpretación de los resultados de esta investigación, en lo que respecta al campo odontológico. A la Dra. Mejía, del Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades de la Secretaría de Salud, le agradezco todo el esfuerzo y gestiones realizadas para la obtención de las muestras.

Agradezco al Dr. Emmanuel Haro Poniatowski y al Dr. José Luis Hernández, del Departamento de Física de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería, UAM-I. Al Dr. Haro, por sus enseñanzas y asesoría en el campo de la espectroscopía Raman; por todo el apoyo y facilidades otorgadas, junto con el Dr. Picquart, para que este proyecto se pudiera realizar en el Laboratorio Físicoquímica de Nanoestructuras del Departamento de Física. Al Dr. Hernández por sus enseñanzas en lo que respecta a la tecnología láser y su uso.

Agradezco al Dr. Roberto Olayo González del Departamento de Física de la UAM-I y al Dr. Luis Escobar Alarcón del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, por la revisión

que hicieron de este proyecto de investigación y la asesoría que me brindaron respecto al uso de tecnologías complementarias a la espectroscopía Raman, a ser utilizadas en este trabajo.

Agradezco al Dr. Federico González García y al Ing. Ricardo Rosas Cedillo del Laboratorio de Rayos X de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería y a la Dra. Alma Mireya Arrieta Castañeda del Laboratorio de Microscopía Electrónica, ambos laboratorios de la UAM-I, por el apoyo brindado para llevar a cabo el análisis de las muestras utilizadas en esta investigación.

Agradezco a mis profesores del Doctorado en Física, Dra. Rosa María Velasco Belmont, Dr. Eduardo Piña Garza, Dr. Michel Picquart, Dr. José Luis Jiménez Ramírez, Dr. Abel Camacho Quintana, Dra. Lidia Jiménez Lara y Dr. Román Linares Romero, por su valiosa contribución a mi formación en el campo de la física.

Al Dr. José Inés Jiménez Aquino, Coordinador del Doctorado en Física, y a su equipo de trabajo por su apoyo y gestiones para la realización de este doctorado.

Agradezco a los miembros del Jurado de este examen. Al Dr. Haro y al Dr. Picquart del Departamento de Física; al Dr. Ramón González Camarena del Departamento Ciencias de la Salud (UAM-I) ; a la Dra. Socorro Aída Borges Yáñez, a cargo de la Subjefatura de Investigación de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM y al Dr. Faustino Sánchez Garduño del Departamento de Matemáticas de la Facultad de Ciencias, UNAM, por el tiempo que han dedicado a la cuidadosa revisión de este trabajo y por sus valiosos comentarios y aportaciones durante el proceso de revisión del mismo. Todo ello, sin lugar a dudas contribuyó a un mejor producto.

Agradezco a mis compañeros de estudio del Doctorado en Física y del Laboratorio Físicoquímica de Nanoestructuras por el trabajo académico que realizamos conjuntamente y su compañía.

Agradezco a mi familia, a mis compañeros de la UA-X y de la UAM-I y a mis amigos, por sus palabras de aliento y solidaridad durante la realización de mi doctorado.

Marco Antonio Zepeda Zepeda

Capítulo 1

Introducción

1. Antecedentes

El presente estudio tiene como antecedente el trabajo desarrollado por dos grupos de académicos de la Universidad Autónoma Metropolitana. Los miembros de un grupo están adscritos al Área de Investigación Ciencias Clínicas y al Área de Investigación Salud y Sociedad, del Departamento de Atención a la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Xochimilco. El segundo grupo está adscrito al Área de Investigación Fenómenos Ópticos y de Transporte en la Materia del Departamento de Física de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Unidad Iztapalapa.

El grupo de académicos del Departamento de Atención a la Salud desarrolla su actividad de investigación en los campos de la Epidemiología y Salud Pública, particularmente en áreas de la salud oral y nutrición; entre sus temas de interés se encuentra la caries dental, la fluorosis y los efectos de la salud oral en el estado nutricional de las personas.

El segundo grupo de académicos del Departamento de Física trabaja los campos de la Espectroscopía Raman, Sistemas Nanoestructurados y Óptica Cuántica; áreas de interés de este grupo de investigadores lo son el análisis de material orgánico y estudio de sistemas nanoestructurados mediante espectroscopía Raman, ablación láser, pinzas ópticas, entre otras.

En el campo de la Salud Pública, uno de los problemas que afecta la salud en la población, en todos los grupos de edad, es la caries dental y sus consecuencias. Para enfrentar esta situación, la medida preventiva más importante ha sido la utilización de fluoruros, a través de los dentífricos, programas de fluoruración del agua o de la sal. Un problema que enfrenta esta estrategia es la existencia de fluorosis endémica; se ha identificado al consumo de agua proveniente de fuentes naturales con altas concentraciones de fluoruros como su principal factor de riesgo.

Este proyecto nace de la necesidad de contar con métodos validados para la evaluación y diagnóstico preciso de la fluorosis dental.

El trabajo que aquí se presenta es fruto del proyecto de investigación “Caracterización de la fluorosis dental mediante espectroscopía Raman”, registrado ante el programa de Doctorado en Física del Departamento de Física de la UAM-Iztapalapa. La investigación fue desarrollada en el Laboratorio Físicoquímica de Nanoestructuras, del Área de Investigación de Fenómenos Ópticos y de Transporte en la Materia, el cual cuenta con el equipo necesario para llevar a cabo investigaciones en el campo de la espectroscopía Raman.

El trabajo que aquí se presenta ha sido posible gracias al apoyo y experiencia en investigación de los dos grupos de académicos mencionados, y al apoyo brindado por parte del Laboratorio Físicoquímica de Nanoestructuras para la realización esta investigación.

2. Esmalte dental

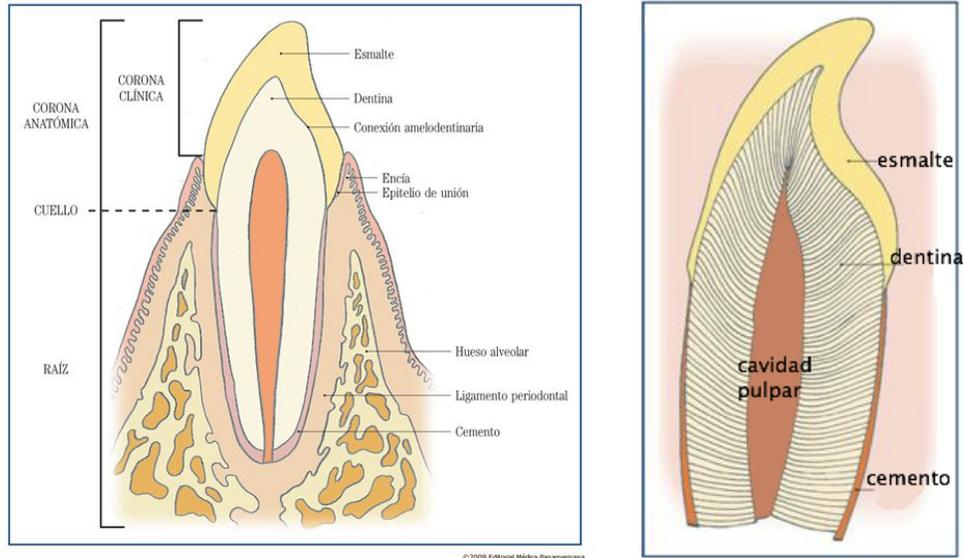
El esmalte dental cubre en forma de casquete al diente en la región coronaria, protegiendo de esta manera al tejido conectivo del complejo tisular dentino-pulpar [1, 2, 3] (Figura 1.1).

El esmalte maduro es una estructura acelular, avascular, sin inervación y altamente mineralizada. Las células secretoras de la matriz orgánica del esmalte (sustancia adamantina), los ameloblastos, involucionan y desaparecen, mediante apoptosis, durante la erupción dentaria. Así, una vez erupcionado el diente, no se presenta aposición ni crecimiento del mismo; esto es, el esmalte del diente erupcionado carece de mecanismos que le permitan su bio-regeneración, pues los ameloblastos han desaparecido; en este sentido, es un componente no bio-renovable [4].

El espesor del esmalte, considerado como la distancia existente entre la conexión amelodentinaria y la superficie externa, presenta variaciones en los distintos órganos dentales y al seno de un mismo diente. El espesor máximo se localiza en las cúspides de los pre-molares y molares, y en el borde libre de incisivos y caninos; esto es, en zonas de alto impacto oclusal, alcanzando valores entre 2 y 3 mm; disminuye en las áreas de surcos intercuspídeos y fosas. En las caras laterales, el espesor del esmalte es mayor en la cara mesial; la cara vestibular presenta mayor espesor que la cara lingual; el espesor disminuye hacia la región cervical, alcanzando ahí, por la morfología propia del diente, sus valores mínimos [4].

El esmalte dental es un material altamente mineralizado [5, 6] y tiene la propiedad de ser el componente corporal más duro. La constitución química del componente mineralizado del diente, así como el de los huesos, mantiene semejanza con el material natural, de la familia de las apatitas, conocido con el nombre de hidroxiapatita (OHAp), cuya fórmula química es $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$; por ello, es considerado como una forma impura de OHAp, manteniendo sus diferencias. Por ejemplo, a pesar de las semejanzas en la composición química y estructura, el esmalte presenta una razón molar Ca/P que varía de 1.6 a 1.7, en tanto que la OHAp tiene un valor de 1.66 [7].

La dureza del esmalte presenta variaciones según la región del diente en donde se mida.



(a) Morfología dental

(b) Corte longitudinal

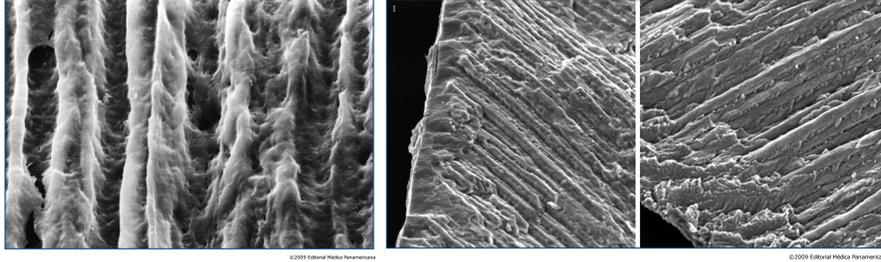
Figura 1.1: Morfología dental (Gómez de Ferraris ME y Campos Muñoz A, 2009).

En la superficie externa la dureza alcanza valores alrededor de 6 GPa; en la parte interna, cerca de la región amelo-dentinaria, disminuye a valores alrededor de 3 GPa [8].

Por su composición altamente mineralizada, la elasticidad del esmalte es pequeña; los valores del módulo de Young se encuentran en un rango aproximado de 70 GPa en la parte interna a 115 GPa en la superficie externa [8]. Su resistencia a la fractura (fracture toughness: tenacidad en fractura) crece conforme se avanza de la superficie exterior hacia el interior; el rango de valores recorridos se ubica entre un mínimo aproximado de $0.6 \text{ MPam}^{1/2}$ a un máximo aproximado de $2.4 \text{ MPam}^{1/2}$ [9]. La permeabilidad del esmalte es escasa, pero esto no niega la posibilidad de que el esmalte capte iones o moléculas del medio salival. Debido a la interacción con el medio y con sustancias que se encuentran en las bebidas y alimentos, el esmalte dental permanentemente está sujeto a procesos de desmineralización y re-mineralización. El esmalte es translúcido, de color amarillo claro a blanco grisáceo [4].

El esmalte está constituido por una matriz inorgánica cristalina, que contiene millones de cristales, agrupados tanto en forma prismática o varillar como en forma aprismática o avarillar (Figura 1.2). La matriz inorgánica representa aproximadamente el 96 % de la materia adamantina; el contenido de agua es alrededor del 3 % y su contenido proteico (no colágeno) oscila entre 0.36 % y 1 % (Tablas 1.1 y 1.2). Los cristales que conforman la matriz inorgánica, en lo fundamental, son cristales de fosfato de calcio con la estructura de OHAp densamente empaquetados [10]; estos cristales son susceptibles a la disolución por los ácidos presentes en el medio bucal. El material orgánico, constituido por proteínas de alto peso molecular, denominadas enamelinas, conforma una delicada red localizada en los espacios intercristalinos [4].

El esmalte de cada pieza dental es el resultado de un proceso de biomineralización que



(a) Prismático (SEM x2,300) (b) Aprismático (SEM x1,200 y x1,000)

Figura 1.2: Esmalte prismático y aprismático (Gómez de Ferraris ME y Campos Muñoz A, 2009).

Tabla 1.1: Composición del tejido duro dental (peso %)

	Esmalte	Dentina	Cemento
Calcio	34-39	29	26
Fósforo	16-18	14	13
Carbonato	2.0-3.6	5.6	5.5
Sodio	0.3-0.9	0.7	?
Magnesio	0.3-0.6	0.9	?
Cloruro	0.2-0.3	0.4	?
Cont. Mineral	99	80	?
Cont. Orgánico	1	20	?
Fejerskov O y Kidd E, 2008			

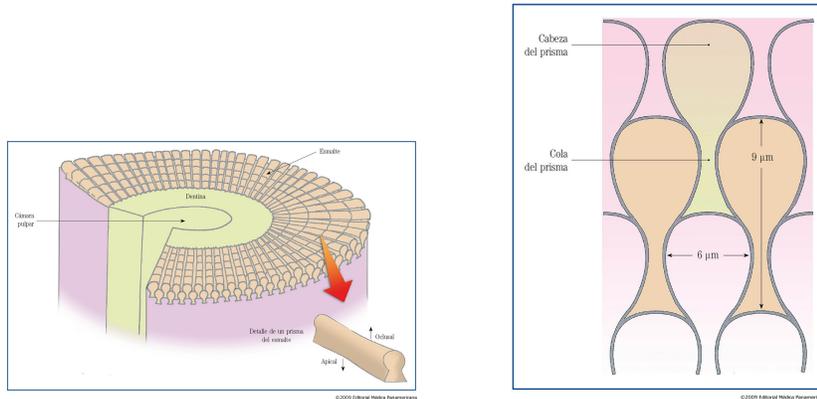
se desarrolla en un periodo de cuatro a cinco años, con una rapidez de mineralización aproximada de $4 \mu\text{m}/\text{día}$. Sus propiedades físicas y funcionales están relacionadas precisamente con su proceso de conformación [4, 5]. Estructuralmente el esmalte presenta varios niveles de organización; en la escala nanométrica se encuentran cristales (nano-fibras), que gruesamente descritos, presentan una forma de prismas hexagonales, cuyas dimensiones aproximadas son de 30 a 70 nm de ancho y $100 \mu\text{m}$ de largo [10, 11]. La agrupación de estos nanocristales conforma estructuras de mayor tamaño en forma prismática, mismas que son consideradas como las unidades básicas del esmalte [12].

El esmalte, en todo su ancho, es atravesado precisamente por este conjunto de prismas abultados [2] que se originan desde la región amelo-dentinaria y corren hacia la superficie (Figura 1.3). En corte transversal, estos prismas presentan la forma del ojo de una cerradura, dando el aspecto de un entramado de escamas de pescado. El trayecto de estos prismas es ondulante; cerca de la superficie son relativamente rectos y alineados paralelamente entre sí; hacia el interior, cerca de la conexión amelo-dentinaria, la estructura prismática de los cristales se pierde [13]. El ancho aproximado de estos prismas (diámetro de la cabeza) es de 5 a $6 \mu\text{m}$; su largo, en corte transversal a su eje mayor, alcanza aproximadamente $9 \mu\text{m}$. La disposición de los prismas tiene su origen en las propiedades de los ameloblastos, con

Tabla 1.2: Composición química del esmalte dental (peso %)

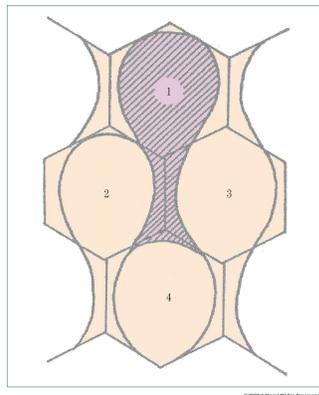
Constituyente	Trautz	Brudevold Somark	LeGeros	Elliot	Mann
<i>Ca</i>	36.0	33.6-39.4	36.5	37.6	37.55
<i>P</i>	17.5	16.1-18.0	17.7	18.3	17.68
<i>PO₄</i>		(49.4.55.2)	54.3		
<i>Ca/P molar</i>	1.64		1.63		
<i>Mg</i>	0.42	0.25-0.56	0.44	0.2	0.27
<i>Na</i>	0.77	0.25-0.90	0.5	0.7	0.75
<i>CO₃</i>	2.5	1.95-2.17	3.5	3.0	3.6
<i>Cl</i>	0.25	0.19-0.30	0.30	0.4	
Sakae T, 2006					

especial participación del proceso de Tomes, consistente en el desarrollo de una extensión citoplasmática en los ameloblastos en la etapa secretora [14].



(a) Prismas

(b) Corte transversal



(c) Forma hexagonal

Figura 1.3: Prismas en el esmalte (Gómez de Ferraris ME y Campos Muñoz A, 2009).

3. Fluorosis dental

En el proceso de amelogenesis intervienen varios factores, entre ellos, el transporte de iones que participan en la conformación de la red cristalina, incluidos el calcio y fluoruros; la matriz orgánica secretada por los ameloblastos; la interacción proteínas-minerales y la degradación enzimática de proteínas; dando paso, así, a la maduración del esmalte [15].

La participación de los fluoruros en el proceso de amelogenesis es fundamental. En particular, los grupos hidroxilos son sustituidos por iones de fluoruro, teniendo como efecto una disminución en la solubilidad del mineral, contribuyendo así a la modulación de la composición iónica del medio circundante y produciendo un potenciamiento de la interacción proteínas-minerales. Todo lo anterior produce un incremento en la estabilidad del esmalte en formación [15].

Se considera que el proceso de incorporación de los fluoruros en la red cristalina está modulado por varios factores; entre ellos, el nivel de fluoruros en plasma y el transporte de fluoruros en el medio [15].

Por otro lado, sin embargo, la presencia de altas concentraciones de flúor en el proceso de amelogenesis no es saludable; se sabe que altas concentraciones de flúor en el proceso de formación del esmalte tiene consecuencias negativas, pues altera el proceso de conformación de la red cristalina de esmalte; esta alteración se conoce con el nombre de fluorosis dental. Histológicamente, la fluorosis dental en esmalte se caracteriza por la presencia de lesiones hipomineralizadas sub-superficiales cubiertas por superficies externas de esmalte bien mineralizadas. En los casos de alteración severa del proceso de formación del esmalte, debido a la presencia de alta concentración de fluoruros en el medio, el esmalte maduro resultante puede sufrir rápidamente fracturas y rompimientos una vez que el diente erupcione [16].

Los mecanismos exactos mediante los cuales los fluoruros afectan negativamente el proceso de amelogenesis no están todavía bien dilucidados; existen varias hipótesis al respecto. Una vía que ha sido señalada es la presencia de efectos secundarios que alteran el metabolismo sistémico del calcio; un segundo mecanismo que ha sido indicado son los efectos sobre la composición de proteínas al momento en que son secretadas por las células; una tercera vía indicada son los efectos sobre la nucleación de apatita y crecimiento del cristal; una cuarta vía posible son efectos sobre la hidrólisis y removimiento de las proteínas de la matriz del esmalte en desarrollo [17, 18].

Clínicamente existen varios criterios que permiten valorar la gravedad de la fluorosis; a saber, el Índice de Dean (Dean's Index; DI, por sus siglas en inglés), el Índice de Thylstrup-Fejerskov (Thylstrup and Fejerskov Index; TFI, por sus siglas en inglés) y el Índice de Fluorosis de Superficie Dental (Tooth Surface Index of Fluorosis; TSIF, por sus siglas en inglés)

El Índice de Dean, adicional al estado sano (normal), considera cinco niveles de gravedad: dudoso, muy leve, leve, moderado y grave. En el nivel dudoso el diente presenta pequeñas

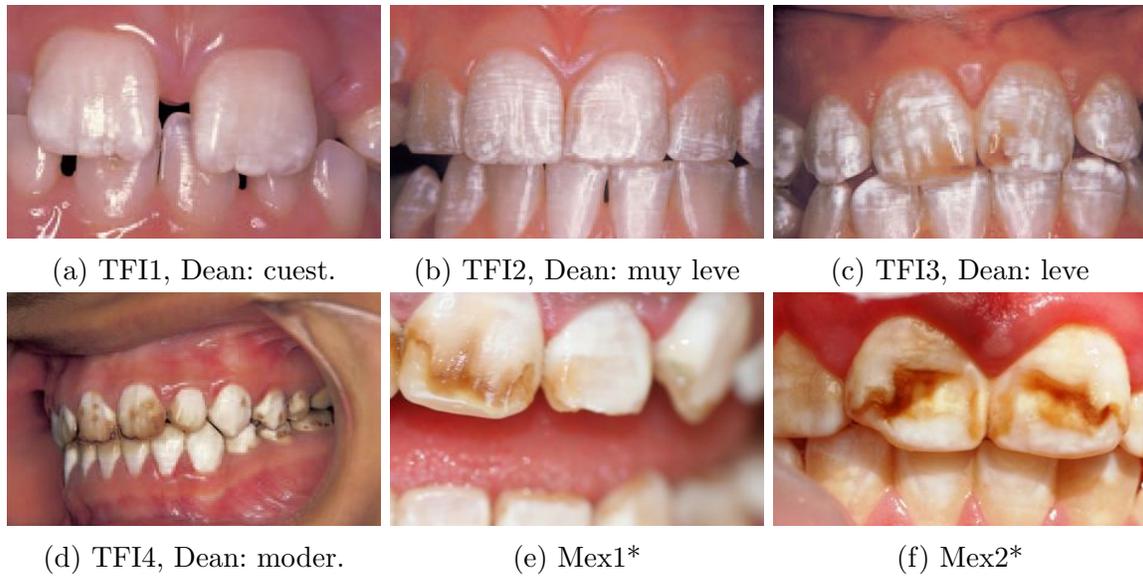


Figura 1.4: Ilustración clínica de la fluorosis dental, según el Índice de Thylstrup-Fejerskov y Dean (Fotos: Fejerskov O y Kidd E, 2008; * Cortesía de Irigoyen ME, 2010).

manchas blancas ocasionales, afectando la translucidez. En el nivel grave todas las superficies del diente están afectadas, presentan aspecto de corrosión, con hoyos discretos o confluyentes; en este caso, es posible la pérdida de porciones del esmalte por fractura o desgaste, llegando incluso a afectar la forma general del diente. La escala clasificatoria propuesta por Thylstrup y Fejerskov, además del estado sano, considera nueve niveles de gravedad de la fluorosis, los cuales tienen correspondencia con los cambios histológicos que ocurren en el diente y con la concentración de fluoruros que se encuentra en el esmalte : TFI1,...,TFI9 (Figura 1.4). Por su parte, el TSIF clasifica en siete niveles la gravedad de la fluorosis, otorgando una calificación a cada superficie facial y lingual de los dientes anteriores y a cada superficie bucal, oclusal y lingual de los dientes posteriores [19, 20, 21, 22, 23].

4. Fluorosis: problema de Salud Pública

De acuerdo con los resultados de la Encuesta Nacional de Caries Dental 2001 (ENCD-2001), realizada en escolares de 12 y 15 años de edad en localidades ubicadas en diferentes estados, la prevalencia promedio de fluorosis en México fue de 27.9 %, con diferencias significativas entre los estados. Las localidades que al momento de realización de la ENCD-2001 presentaron mayor prevalencia de fluorosis se encontraron en Durango (87.5 %), Aguascalientes (83.8 %), Zacatecas (71.9 %), San Luis Potosí (56.6 %), Baja California (50.9 %), Jalisco (47.6 %), Chihuahua (47.4 %), Querétaro (44.7 %) y Guanajuato (43.9 %). Las localidades con baja prevalencia se encontraron en Morelos (3.6 %), Coahuila (3.7 %), Distrito Federal (5.9 %), Quintana Roo (6.4 %), Veracruz (6.6 %), Nayarit (6.7 %), Yucatán (6.8 %), Nuevo León (8.0 %) y Sinaloa (9.1 %). Los datos sobre fluorosis de los estados de Chiapas, Tabasco y Estado de México no están incluidos en la ENCD-2001 [24].

La gravedad de la enfermedad, a nivel poblacional, se puede medir a través del Índice Comunitario de Fluorosis (Community Fluorosis Index; CFI, por sus siglas en inglés). Este índice, basado en la escala de fluorosis de Dean, asigna desde el valor cero al diente sano, hasta el valor 4 al diente con fluorosis severa (Funmilayo ASM y Mojirade AD, 2014). Según los datos de la propia ENCD-2001, las comunidades de Durango presentaron los valores más altos del CFI; a saber, 1.95 y 1.97 para los escolares de 12 y 15 años, respectivamente; en Zacatecas los valores fueron de 1.28 y 1.09; en Aguascalientes, valores de 1.02 y 1.02, y en San Luis Potosí valores de 1.14 y 0.87, para los mismos grupos de edad, respectivamente [24]. A este respecto, cabe señalar que OMS indica que un valor del CFI mayor a 0.4 debe considerarse como un problema de salud pública [25].

Adicional a los resultados de la ENDC-2001, diversos estudios epidemiológicos específicos realizados en distintos estados de la República Mexicana informan sobre la prevalencia de fluorosis en escolares, corroborando el hecho de que este padecimiento se ha transformado en un problema importante de Salud Pública en México (Tabla 1.3).

Tabla 1.3: Fluorosis dental en México

Estudio	n	Edad	Prev. (%)	CFI	Estado
Hernández Montoya V <i>et al.</i> , 2003 [26]	445	9-11	50.0-100		Aguascalientes
Juárez López MLA <i>et al.</i> , 2003 [27]	1569	10-12	60.4	0.96	Distrito Federal
Beltrán Valladares PR <i>et al.</i> , 2005 [28]	320	6-9	56.3	0.7	Campeche
Irigoyen Camacho ME <i>et al.</i> , 2006 [29]	229	8-12	55.9*	0.86	Distrito Federal
Irigoyen Camacho ME <i>et al.</i> , 2010 [30]	248	9.99*	91.1		Morelos
Molina Frechero N <i>et al.</i> , 2007 [31]	250	11	17.6	0.28	Distrito Federal
	163	11	31.3	0.43	Distrito Federal
Azpeitia Valadez <i>et al.</i> , 2008 [32]	456	6-15	59.2		Guanajuato
Azpeitia Valadez <i>et al.</i> , 2009 [33]	1284	6-15	52.6		Guanajuato
Jiménez Farfán MD <i>et al.</i> , 2011 [34]	1569	11-12	60.1	0.96	Distrito Federal
* Incluye la categoría dudoso					

Capítulo 2

Marco Teórico

1. Espectroscopía Raman

Los físicos indios Chandrasekhara Venkata Raman y Kariamanikkan Srinivasa Krishnan, mejor conocidos como Raman y Krishnan, descubrieron el efecto que, en honor a Raman, ahora lleva su nombre. Este efecto es resultado de una interacción inelástica radiación-materia. Este fenómeno fue predicho en 1923 por Adolf G.S. Smekal [35], pero no fue sino hasta 1928 que fue descubierto por los trabajos experimentales de Raman y Krishnan. Por este descubrimiento, Raman fue reconocido con el Premio Nobel en Física en 1930.

El efecto Raman es un fenómeno de dispersión de la luz, en el que, a diferencia de la dispersión Rayleigh, se presenta intercambio de energía entre el haz incidente y la materia sobre la que incide dicho haz; de esta manera, el haz incidente puede entregar energía al material sobre el que incide, y así obtenerse un haz dispersado de menor energía (dispersión Stokes) o el haz incidente puede tomar energía del material sobre el que incide y de esta manera producir un haz dispersado de mayor energía (dispersión anti-Stokes). Expresado en términos de frecuencia, en el efecto Raman, el haz dispersado presenta una frecuencia diferente a la del haz incidente; para el caso de la dispersión Raman Stokes, la frecuencia del haz dispersado es menor a la del haz incidente; en tanto que en la dispersión Raman anti-Stokes, la frecuencia del haz dispersado es mayor que el valor de la frecuencia del haz incidente.

Desde que fue descubierto, este efecto ha sido utilizado para multitud de aplicaciones. Particularmente, con el desarrollo del láser, a partir de los 60's del siglo pasado, la espectroscopía Raman, basada en este efecto, ha tenido un desarrollo espectacular. A la fecha, la espectroscopía Raman cuenta ya con una amplia gama de aplicaciones. Estas aplicaciones abarcan campos tan amplios y diversos como lo es el análisis de materiales, la medicina, la medicina forense, la arqueología, la química, la pintura, etc. En el campo del análisis de materiales, la espectroscopía Raman actualmente es ampliamente utilizada en el estudio de biomateriales y semiconductores. En el campo médico, la espectroscopía Raman ha sido utilizada para el estudio del cáncer de cerebro, caracterizando células normales y células patógenas. Esta técnica también ha sido utilizada en el estudio de fósiles. En fin, la lista es

interminable.

El patrón de intensidades que presenta el espectro Raman de una material corresponde con modos normales de vibración de las moléculas que lo conforman. Esto significa que el espectro Raman constituye una huella digital del material a partir del cual ha sido adquirido. Una gran ventaja de esta espectroscopía vibracional sobre otras técnicas utilizadas para la investigación de materiales es su carácter no-invasivo y no-destructivo. De ahí que el campo de aplicación de la espectroscopía Raman, particularmente en la medicina, crezca día a día.

La explicación del efecto Raman puede abordarse desde diversas perspectivas teóricas; a saber, clásica, clásica-cuántica o cuántica [37, 38, 39, 40, 41, 42].

2. Aproximación Clásica

En la explicación clásica la radiación es considerada como una onda electromagnética con frecuencia determinada, digamos ν_0 y la materia es considerada como un conjunto de átomos; los cuales, en el caso de los sólidos, se encuentran enlazados, constituyendo una red. Se considera que los átomos en esta red mantienen movimientos vibratoriales harmónicos permanentes, y que en presencia de un campo electromagnético se presentan fenómenos de polarización debidos al movimiento de las nubes de electrones de los átomos que conforman dicha red. Al ser desplazados los electrones respecto de sus núcleos, se induce un momento dipolar eléctrico.

A manera de ejemplificación, tomemos una molécula diatómica. En el caso particular de campos eléctricos pequeños, el momento dipolar inducido, denotado por μ , puede considerarse proporcional al campo; esto es, tenemos

$$\mu = \alpha E \tag{2.1}$$

donde la constante α , denominada polarizabilidad de la molécula, indica la facilidad o la dificultad con la cual la nube electrónica puede distorsionarse por la presencia del campo eléctrico.

Si el campo eléctrico al que está sujeto la molécula es un campo eléctrico fluctuante, entonces se produce un momento dipolar fluctuante, de igual frecuencia.

Supongamos, como caso particular, que el campo está dado como

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \tag{2.2}$$

donde E_0 es la amplitud del campo y ν_0 es la frecuencia de la radiación incidente. La radiación electromagnética incidente induce un dipolo fluctuante en la molécula, de frecuencia ν_0 .

El dipolo inducido fluctuante emite (o dispersa) radiación con frecuencia precisamente igual a ν_0 . (Dispersión Rayleigh)

La molécula diatómica sin perturbar se encuentra vibrando, supongamos como oscilador armónico, a una frecuencia ν_v . Podemos asegurar, entonces, que la coordenada de vibración q a lo largo del eje de vibración al tiempo t está dada por

$$q_v = q_0 \cos(2\pi\nu_v t) \quad (2.3)$$

En el caso en que la polarizabilidad cambie durante el curso de la vibración, podemos considerarla, entonces, como función de la coordenada q_v . Restringiéndonos a amplitudes pequeñas, aproximamos su valor mediante la expansión de Taylor, quedándonos únicamente hasta el término lineal; así, tenemos que

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_v} \right)_0 q_v \quad (2.4)$$

Sustituyendo el valor de la coordenada de vibración (Ec. 2.3) en esta expresión, obtenemos

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_v} \right)_0 q_0 \cos(2\pi\nu_v t) \quad (2.5)$$

Por las Ecs. 2.1 y 2.2, tenemos que

$$\mu = \alpha E = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (2.6)$$

Sustituyendo el valor de la polarizabilidad (Ec. 2.5) en esta ecuación, obtenemos

$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_v} \right)_0 E_0 q_0 \cos(2\pi\nu_v t) \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (2.7)$$

Esta última expresión puede reescribirse en la forma

$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_v} \right)_0 \frac{E_0 q_0}{2} [\cos 2\pi(\nu_0 + \nu_v)t + \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_v)t] \quad (2.8)$$

El primer término de esta ecuación describe la dispersión Rayleigh, los términos restantes describen precisamente la dispersión Raman anti-Stokes y Raman Stokes, respectivamente.

Así, se puede afirmar que el haz incidente será dispersado en las frecuencias siguientes:

- ν_0 , correspondiente a dispersión Rayleigh y
- $\nu_0 \pm \nu_v$, correspondiente a dispersión Raman (Stokes y anti-Stokes)

Y que la dispersión Raman, de acuerdo con la Ec. 2.8, ocurrirá sólo cuando

$$\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q_v}\right)_0 \neq 0 \quad (2.9)$$

Esto es, para que una vibración sea Raman activa, es necesario que la polarizabilidad de la molécula cambie durante la vibración.

Para el caso tridimensional, al considerar a una molécula inmersa en un campo eléctrico, $\vec{E} = (E_x, E_y, E_z)$, el dipolo que se induce no necesariamente es paralelo a la dirección del campo. En realidad lo que resulta es un dipolo, denotado por $\vec{\mu} = (\mu_x, \mu_y, \mu_z)$, en donde cada una de sus componentes se ve influenciada por las componentes del campo eléctrico según las siguientes relaciones

$$\begin{aligned} \mu_x &= \alpha_{xx}E_x + \alpha_{xy}E_y + \alpha_{xz}E_z \\ \mu_y &= \alpha_{yx}E_x + \alpha_{yy}E_y + \alpha_{yz}E_z \\ \mu_z &= \alpha_{zx}E_x + \alpha_{zy}E_y + \alpha_{zz}E_z \end{aligned} \quad (2.10)$$

Escrito en notación matricial, tenemos

$$\begin{pmatrix} \mu_x \\ \mu_y \\ \mu_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix} \quad (2.11)$$

esto es, la polarizabilidad puede ser considerada como un tensor de orden 2. Por tanto, podemos trabajar con la expresión tensorial

$$\vec{\mu} = \bar{\alpha}\vec{E} \quad (2.12)$$

donde el tensor de polarizabilidad, denotado por $\bar{\alpha}$, está dado por

$$\bar{\alpha} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \quad (2.13)$$

El tensor de polarizabilidad tiene dos propiedades invariantes bajo cambio de orientación de la molécula; a saber,

- el valor medio, denotado por $\bar{\alpha}$
- la anisotropía, denotada por γ

dados, respectivamente, por

$$\bar{\alpha} = (1/3)(\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz}) \quad (2.14)$$

$$\gamma^2 = 1/2 [(\alpha_{xx} - \alpha_{yy})^2 + (\alpha_{yy} - \alpha_{zz})^2 + (\alpha_{zz} - \alpha_{xx})^2 + 6(\alpha_{xy}^2 + \alpha_{xz}^2 + \alpha_{yz}^2)] \quad (2.15)$$

En la mayoría de los casos se tiene que el tensor de polarizabilidad es un tensor simétrico; si este es el caso, las componentes del tensor de polarizabilidad se pueden expresar en términos de los elementos invariantes; esto es

$$\bar{\alpha}_{ii}^2 = \bar{\alpha}_{xx}^2 = \bar{\alpha}_{yy}^2 = \bar{\alpha}_{zz}^2 = (1/45) (45\bar{\alpha}^2 + 4\gamma^2) \quad (2.16)$$

$$\bar{\alpha}_{ij}^2 = \bar{\alpha}_{xy}^2 = \bar{\alpha}_{xz}^2 = \bar{\alpha}_{yz}^2 = (1/15)\gamma^2 \quad (2.17)$$

Con base en este resultado, independientemente de la orientación del sistema coordenado elegido, el tensor de polarizabilidad no cambia, pues sus componentes están expresadas en términos de los invariantes; esto significa que un ensamble molecular puede quedar representado como una molécula promedio, orientada respecto a un sistema de ejes coordenados, de forma tal que $\bar{\alpha}$ se puede tomar como el tensor de polarizabilidad promedio. Bajo esta consideración, se pueden identificar dos tipos de direcciones de dispersión; a saber, la dispersión isotrópica y la dispersión anisotrópica. La dispersión isotrópica es función de los términos $\bar{\alpha}_{ii}^2$ del tensor de polarizabilidad promedio y es dispersada por dipolos que están orientados en la dirección del campo eléctrico del haz de excitación. La dispersión anisotrópica, por su parte, es función de los términos $\bar{\alpha}_{ij}^2$ del tensor de polarizabilidad promedio y es dispersada por dipolos orientados en el plano perpendicular al campo eléctrico del haz de excitación. Si el campo eléctrico del haz incidente lo orientamos en la dirección z , la intensidad de cada una de las dispersiones es proporcional al cuadrado del momento dipolar inducido; esto es

$$I_z = k\bar{\alpha}_{ii}^2 E_z^2 \quad (2.18)$$

$$I_y = k\bar{\alpha}_{ij}^2 E_z^2 \quad (2.19)$$

Con lo cual se obtiene que la razón de intensidades de la dispersión anisotrópica respecto de la isotrópica, denominada razón de depolarización, denotada por ρ , siguiente

$$\rho = \frac{I_y}{I_z} = \frac{\bar{\alpha}_{ij}^2}{\bar{\alpha}_{ii}^2} = \frac{(1/15)\gamma^2}{(1/45)(45\bar{\alpha}^2 + 4\gamma^2)} = \frac{3\gamma^2}{45\bar{\alpha}^2 + 4\gamma^2} \quad (2.20)$$

3. Aproximación Cuántica

En la aproximación cuántica, al igual que en la aproximación clásica, el efecto Raman es una interacción inelástica entre radiación y materia, sólo que ahora se considera que la radiación está conformada por fotones con una determinada energía y la energía de los osciladores está cuantizada.

La energía de los fotones de un haz de frecuencia ν_0 y la energía de los estados vibracionales de frecuencia ν de la molécula están dadas por las siguientes expresiones, respectivamente

$$E_p = h\nu_0 \quad (2.21)$$

$$E_v = h\nu (v + 1/2) \quad (2.22)$$

donde h representa la constante de Planck y v representa el número cuántico que controla la energía vibracional, con $v = 0, 1, 2, 3, \dots$

Se puede lograr una descripción del efecto Raman considerando las transiciones de un estado base vibracional a estados excitados virtuales, logradas mediante la perturbación de la función de onda; la función de onda perturbada indica la energía del estado excitado.

De esta forma, la dispersión Rayleigh sucederá cuando la transición inicia y finaliza en el mismo nivel de energía vibracional. En este enfoque, la dispersión Raman-Stokes corresponde a transiciones que finalizan en un estado de energía vibracional mayor del cual iniciaron. Por su parte, la dispersión Raman anti-Stokes corresponde a transiciones de un nivel de energía vibracional alto hacia uno de energía más bajo. A temperatura ambiente, la mayoría de las vibraciones moleculares se encuentran en el estado base; esto es, $v = 0$. Así, en la dispersión Raman Stokes, por lo general, las transiciones iniciaran desde el estado base; en tanto que las transiciones correspondientes a dispersión Raman anti-Stokes serán menos intensas.

En los casos en que pueda considerarse que las moléculas que conforman el material bajo estudio no presentan movimientos rotatorios, tienen un estado base singulete que hace posible utilizar la aproximación Born-Oppenheimer, y la frecuencia del haz incidente es mucho menor que las frecuencias electrónicas de las moléculas, entonces la intensidad total de una señal Raman Stokes de frecuencia de desplazamiento ν , dispersada sobre un ángulo sólido de 4π , correspondiente a una transición del estado vibracional inicial m al estado vibracional final n está dada por

$$I_{mn} = \left(\frac{2^7 \pi^5}{3^2 c^4} \right) I_0 (\nu_0 - \nu)^4 \sum_{ij} |(\alpha_{ij})_{mn}|^2 \quad (2.23)$$

donde I_0 representa la intensidad del haz incidente y $(\alpha_{ij})_{mn}$ la componente ij del tensor de polarizabilidad asociado con la transición $m \rightarrow n$.

Tomando el desarrollo en serie de Taylor, a primer orden, de las componentes del tensor de polarizabilidad y considerando sólo el término correspondiente a la dispersión Raman, se llega a que la intensidad de la señal Raman Stokes puede expresarse como

$$\begin{aligned} I_{mn} &= \left(\frac{2^4 \pi^3}{3^2 c^4} \right) \left(\frac{hN}{\mu\nu(1-e^{-h\nu/k_B T})} \right) I_0 (\nu_0 - \nu)^4 \sum_{ij} \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q} \right)^2 \\ &= \left(\frac{KI_0 N (\nu_0 - \nu)^4}{\mu\nu(1-e^{-h\nu/k_B T})} \right) [45\alpha^2 + 7\gamma^2] \end{aligned} \quad (2.24)$$

donde h representa la constante de Planck, k_B la constante de Boltzmann, N el número de moléculas del arreglo, μ la masa reducida del oscilador y K recoge todos los términos constantes una vez realizada la suma.

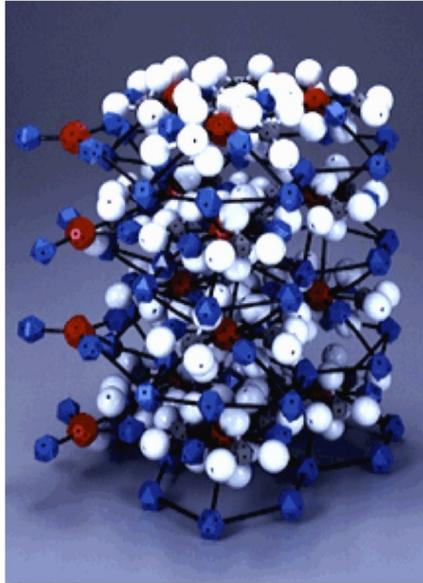
4. Hidroxiapatita: elementos cristalográficos, simetría y modos vibracionales

La hidroxiapatita forma parte del grupo amplio de minerales denominado apatitas, cuya composición química está dada por $Ca_{10}(PO_4)_6X_2$, donde X puede ser *OH* (hidroxiapatita, OHAp), flúor *F* (flúorapatita, FAp) o cloro *Cl* (cloroapatita, ClAp), etc. [7]. Desde los estudios de Náray-Szabó y Mehmel, se sabe que la estructura general de estos cristales es la de un sistema cristalino hexagonal, con simetría que corresponde, siguiendo la notación Herman-Mauguin, al grupo espacial $P6_3/m$ [7, 43, 44]; esto es, la celda de la red de Bravais es una celda primitiva (*P*), cuyo eje de simetría de orden mayor es un eje helicoidal de orden 6, con traslación de 1/2 en la dirección de dicho eje y un plano especular ortogonal a dicho eje helicoidal [45].

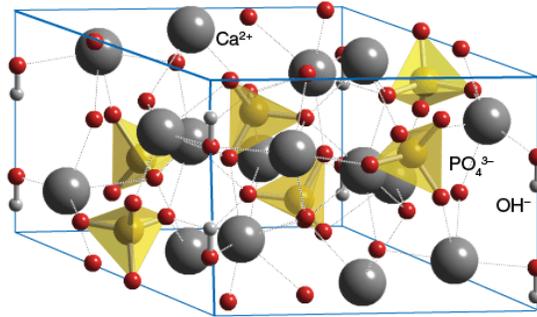
Los parámetros de red están dados por $a = b = 9.432 \text{ \AA}$ y $c = 6.881 \text{ \AA}$, con ligera variación según se trate de OHAp o FAp [46, 47]. La estructura de la hidroxiapatita es compleja (Figura 2.1) [48, 49]. Con el objeto de entender algunos elementos básicos de su estructura conviene considerar un arreglo de empaquetamiento hexagonal compacto de esferas (hexagonal close-packing; *hcp*, por sus siglas en inglés), el cual está integrado por planos de esferas en contacto, colocadas en un arreglo hexagonal en un plano; los planos se encuentran superpuestos siguiendo una secuencia tipo ABABAB [50]. El radio de las esferas es aprox 2.6 \AA , representando cada una de ellas a un ion fosfato $(PO_4)^{3-}$ tetraédrico [7]. En este arreglo se forman, por su tamaño, dos tipos de hoyos ubicados entre las esferas. Los hoyos grandes octaédricos forman columnas paralelas a la dirección *c*; ellos son ocupados por los iones Ca^{2+} , y iones OH^- o F^- . De este modo, cada celda unitaria de la apatita contiene seis esferas del arreglo *hcp*, que corresponden a seis 6 iones de fosfato $(PO_4)^{3-}$ y seis hoyos grandes octaédricos. Los iones F^- y 4/10 de los iones Ca^{2+} forman columnas, el resto de los 6/10 de iones Ca^{2+} forman triángulos alrededor de los iones F^- (Figura 2.2)[51]. Esta composición y estructura le permite a la apatita tener la propiedad de ser bastante tolerante a las sustituciones, vacancias y otras alteraciones [7].

En los cristales iónicos pueden existir dos tipos de modos vibracionales; a saber, los modos externos y los modos internos [52]. En los modos externos los grupos iónicos vibran como unidades rígidas; en tanto que los modos internos involucran las vibraciones de los átomos que conforman el grupo iónico, manteniendo su centro de masa fijo [53]. El espectro Raman de la hidroxiapatita está fuertemente dominado por la señal correspondiente a los modos vibracionales internos de los grupos fosfato [54]; en ellos pondremos nuestra atención.

El ion $(PO_4)^{3-}$, de disposición tetraédrica, cuenta con una simetría que corresponde a la del grupo puntual de simetría T_d (notación de Schönflies) del sistema cristalino cúbico [45]. Este grupo contiene 5 clases de simetría. La primera clase de simetría está conformada por la operación identidad (*E*). La segunda clase está conformada por las operaciones que contienen los cuatro ejes de rotación de orden 3 (C_3); cada uno de estos ejes pasa por un vértice del tetraedro y es ortogonal a la cara opuesta a dicho vértice. La tercera clase contiene a los tres ejes de rotación de orden 2, (C_2); cada uno de estos ejes pasa por los puntos medios de



(a) Modelo de la molécula de OHAp. (rojo: P ; azul: O ; blanco: Ca)



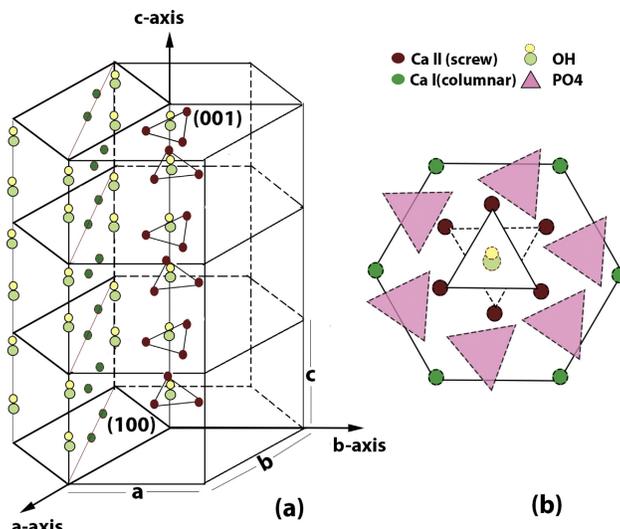
(b) Celda unitaria de OHAp

Figura 2.1: Molécula de hidroxiapatita (Dashevskiy I *et al.*, 2019 [49]).

aristas opuestas. La cuarta clase está conformada por tres ejes de rotación impropia de orden 4, (S_4); estos ejes son los mismos elementos geométricos de la clase anterior, sólo que ahora son considerados en su calidad ejes de rotación impropia. La quinta y última clase contiene a los seis planos especulares diagonales, (σ_d); cada uno de estos planos contiene a una de las aristas del tetraedro y bisecta el ángulo formado por las otras dos aristas que convergen en dicho vértice (Figura 2.3) [42].

El número de modos vibracionales que tiene un arreglo molecular tridimensional está dado por $3n - 6$, donde n representa el número de átomos que conforman el arreglo. Así, en el caso del ion $(PO_4)^{3-}$, conformado por 5 átomos, existen 9 modos vibracionales internos diferentes posibles.

Con el objeto de obtener información sobre el carácter de los 9 modos vibracionales del ion $(PO_4)^{3-}$, conviene considerar las representaciones irreducibles del grupo de simetría T_d . La Tabla de Caracteres del grupo puntual de simetría T_d (Tabla 2.1) [40, 103] indica que este grupo puede ser representado por 5 representaciones irreducibles; a saber, del tipo A , E y T (Notación de Mulliken: las representaciones 1-*dimensional* están indicadas con la letra A ; las representaciones 2-*dimensional* con la letra E y las representaciones 3-*dimensional* quedan indicadas con la letra T) [40]. En la Tabla 2.1 se han agregado los dos últimos renglones. $N_{\hat{R}}$ indica el número de núcleos invariantes bajo la acción de cada una de las operaciones de simetría del grupo sobre el espacio. El último renglón, Γ_{3N} , indica los caracteres de la representación reducible total (representación de los vectores de desplazamiento); para ello, se ha utilizado la relación siguiente



(a) Prisma hexagonal (b) Corte transversal

Figura 2.2: Geometría hexagonal del arreglo molecular de hidroxiapatita (Behroozibakhsh M *et al.*, 2019 [51]).

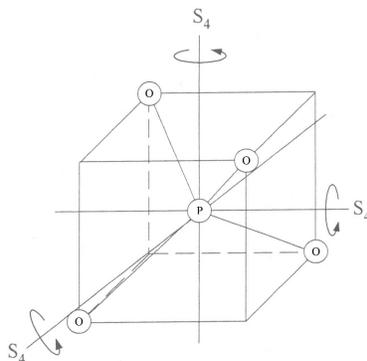


Figura 2.3: Tetraedro del fosfato (Requena A y Zúñiga J, 2004).

$$\chi_{3N}(\hat{R}) = N\chi_{(x,y,z)}(\hat{R}) \quad (2.25)$$

la cual indica que el caracter de la representación total reducible Γ_{3N} , correspondiente a la operación \hat{R} , puede obtenerse mediante el producto del número de átomos que son invariantes bajo la operación \hat{R} multiplicado por el caracter correspondiente de la representación $\Gamma_{(x,y,z)}$.

La representación reducible Γ_{3N} puede expresarse en términos de las representaciones irreducibles indicadas en la Tabla de Caracteres del grupo, mediante la siguiente relación

$$n_i = (1/h) \sum_{\hat{R}} \chi_{3N}(\hat{R})\chi_i(\hat{R}) \quad (2.26)$$

donde n_i indica el número de veces que aparece la representación χ_i en representación total. En esta expresión h corresponde al orden del grupo (número de elementos del grupo), en

Tabla 2.1: Tabla de Caracteres del grupo puntual de simetría T_d

T_d	E	$8C_3$	$3C_2$	$6S_4$	$6\sigma_d$	Lineales y rot.	Cuadráticas
A_1	1	1	1	1	1		$x^2 + y^2 + z^2$
A_2	1	1	1	-1	-1		
E	2	-1	2	0	0		$2z^2 - x^2 - y^2, x^2 - y^2$
T_1	3	0	-1	1	-1	(R_x, R_y, R_z)	
T_2	3	0	-1	-1	1	(x, y, z)	(xy, xz, yz)
$\Gamma_{x,y,z}$	3	0	-1	-1	1		
$N_{\hat{R}}$	5	2	1	1	3		
Γ_{3N}	15	0	-1	-1	3		

este caso 24; $\chi_{3N}(\hat{R})$ indica el caracter de la representación total Γ_{3N} para la operación \hat{R} y $\chi_i(\hat{R})$ indica el caracter de la representación χ_i correspondiente a la operación \hat{R} ; la suma se toma sobre las 24 operaciones indicadas en la tabla de caracteres. Al realizar el cálculo señalado, se obtiene

$$\Gamma_{3N} = A_1 + E + T_1 + 3T_2 \quad (2.27)$$

De la Tabla de Caracteres del grupo, se sabe que

$$\Gamma_{tras} = T_2 \quad (2.28)$$

$$\Gamma_{rot} = T_1 \quad (2.29)$$

donde Γ_{tras} y Γ_{rot} corresponden a los modos traslacionales y rotacionales, respectivamente. Por tanto, se puede concluir, que

$$\begin{aligned} \Gamma_{vib} &= \Gamma_{3N} - (\Gamma_{tras} + \Gamma_{rot}) \\ &= A_1 + E + 2T_2 \end{aligned} \quad (2.30)$$

Es decir, los nueve modos vibracionales del ion $(PO_4)^{3-}$ pueden expresarse como $A + E + 2T$. Esto es, uno de los modos vibracionales es simple, (A); este modo es de tipo elongación (stretching vibration) (también denominado de tensión) simétrico, denotado por ν_1 , y corresponde a los enlaces $P-O$. Otro modo vibracional es doblemente degenerado, (E); es de tipo deformación (bending vibration), denotado por ν_2 , involucra a los enlaces $O-P-O$. Un tercer modo vibracional es triplemente degenerado, (T); es de tipo elongación asimétrico; involucra a los enlaces $O-P-O$, con movimiento del átomo P , denotado por ν_3 . El último modo también es triplemente degenerado, (T); es de tipo deformación, denotado por ν_4 e involucra a los enlaces $O-P-O$. Adicionalmente, a partir de la Tabla de Caracteres del grupo, se observa que todos los modos vibracionales del ion $(PO_4)^{3-}$ son Raman activos [40, 53, 103, 56].

La celda unaria de HAp, como ya fue mencionado, contiene 6 iones $(PO_4)^{3-}$. La frecuencia de los modos vibracionales de estos componentes ionicos de la celda unitaria sufre alteraciones y desdoblamientos por la pérdida de simetría de los tetraédros $(PO_4)^{3-}$, debido a la presencia del campo cristalino producido por los iones a su alrededor. Para el caso del ion $(PO_4)^{3-}$ aislado, las frecuencias asignadas a sus modos de vibración observadas en el espectro Raman están ubicadas, aproximadamente, en $\nu_1=938\text{ cm}^{-1}$, $\nu_2=420\text{ cm}^{-1}$, $\nu_3=1017\text{ cm}^{-1}$ y $\nu_4=517\text{ cm}^{-1}$ [57, 58].

En este estudio pondremos especial atención en los modos vibracionales internos del ion $(PO_4)^{3-}$; por esta razón, las frecuencias Raman arriba señaladas nos servirán de guía para el establecimiento del rango de observación de las frecuencias de desplazamiento Raman que utilizaremos en nuestra investigación.

5. Estudios previos de OHAp y esmalte dental mediante espectroscopía Raman

Iqbal y colaboradores realizaron un estudio con OHAp y FAp sintéticas, utilizando un haz incidente y señal Raman polarizados [54]. La configuración geométrica utilizada en sus experimentos fue de la forma $x_i(x_jx_k)x_l$. Los autores tomaron como base que la simetría de la OHAp puede aproximarse por la simetría del grupo espacial $P6_3/m$. Al seleccionar el eje z paralelo al eje c de la celda unitaria y el eje x ortogonal al eje c y a la cara cristalina (100), cada una de las configuraciones utilizadas siguientes $x(zz)y$, $x(yx)y$ y $x(yz)y$ quedaron asociadas con las representaciones de simetría A , E_2 y E_1 , respectivamente. Los espectros recolectados abarcaron desde bajas frecuencias de desplazamiento Raman hasta aproximadamente $3,800\text{ cm}^{-1}$. Mediante la comparación de los espectros obtenidos en los modos A y E_2 , se concluyó que la suposición de simetría hexagonal es una buena aproximación a la simetría de la OHAp, a pesar de las alteraciones a la simetría causadas por la posición de los iones OH^- . Con base en el análisis de las componentes longitudinal (LO) y transversal (TO) de la señal Raman, se pudo concluir que las interacciones electrostáticas de largo alcance no están presentes en la OHAp. En relación a los modos internos de vibración del ion PO_4^{3-} , se tomaron como base las siguientes asignaciones de los modos vibracionales del ion aislado; a saber, $\nu_1=980\text{ cm}^{-1}$, $\nu_2=363\text{ cm}^{-1}$, $\nu_3=1082\text{ cm}^{-1}$ y $\nu_4=515\text{ cm}^{-1}$ [59]. A partir de esta información y tomando en cuenta las frecuencias observadas en los espectros obtenidos para el caso de la OHAp, los autores realizaron las siguientes asignaciones: $\nu_1=962\text{ cm}^{-1}$, $\nu_2=430-460\text{ cm}^{-1}$, $\nu_3=1020-1080\text{ cm}^{-1}$ y $\nu_4=580-610\text{ cm}^{-1}$. Los autores señalan que el considerable desplazamiento observado en las líneas Raman de los modos internos del PO_4^{3-} , así como su desdoblamiento, respecto a lo reportado para el caso del PO_4^{3-} aislado, se debe a la acción de la fuerza del campo cristalino de la OHAp; señalan que el desdoblamiento observado en las líneas Raman es consistente con la suposición de una simetría C_6 en el cristal. En particular, el modo ν_1 del ion PO_4^{3-} resultó ser relativamente más intenso para el caso de la OHAp respecto al de la FAp; los autores lo atribuyeron al hecho de que la FAp sigue una simetría hexagonal, en tanto que la OHAp presenta alteraciones monoclinicas. En

esta investigación también se analizaron los modos externos de vibración y fueron estudiados cambios que presentan los espectros, en bajas frecuencias, en función de la temperatura utilizada para realizar la síntesis del cristal.

de Aza y colaboradores llevaron a cabo dos estudios para analizar, mediante espectroscopía Raman, las propiedades vibracionales del β -fosfato tricálcico (β -Tricalcium Phosphate; β -TCP, por sus siglas en inglés) [53], con fórmula química $Ca_3(PO_4)_2$ y de la OHAp [56]. Los investigadores trabajaron con β -fosfato tricálcico sintético policristalino y OHAp sintética policristalina, un haz de $\lambda=488$ nm y adquisición no polarizada. Adicional a la presencia de picos asociados con vibraciones de los grupos OH^- en la OHAp, los autores estudiaron otros rasgos característicos de estos materiales. Respecto de los modos internos del PO_4^{3-} en OHAp, el modo vibracional más intenso fue asignado al modo de elongación simétrico de $P-O$ en 962 cm^{-1} ; las bandas en los rangos de frecuencia $400-490\text{ cm}^{-1}$, $570-625\text{ cm}^{-1}$ y $1020-1095\text{ cm}^{-1}$ fueron asignadas a los modos ν_2 (modo de deformación doblemente degenerado de $O-P-O$), ν_4 (modos triplemente degenerados principalmente de deformación $O-P-O$) y ν_3 (modo de elongación asimétrico triplemente degenerado de $P-O$), respectivamente. A partir de los 9 modos vibracionales del PO_4^{3-} , del tipo $A + E + 2T_2$, los autores señalan el carácter de los 54 modos internos del PO_4^{3-} esperados, desdoblados por el campo cristalino en la OHAp, algunos de los cuales pueden estar muy cercanos en nivel de energía; también se encontró que las bandas de los modos internos del PO_4^{3-} estuvieron centradas aproximadamente en los mismos valores para β -TCP y para OHAp, pero aproximadamente 20 cm^{-1} por arriba de las frecuencias correspondientes al ion PO_4^{3-} libre. Estos desplazamientos y desdoblamientos observados, señalan los autores, sugiere la existencia de un campo local fuerte cuyos efectos incluyen la deformación de los tetraedros PO_4^{3-} , pues se reducen las distancias interatómicas y se refuerzan los enlaces intratetraédricos. Los investigadores encontraron que el ancho de frecuencia de las bandas internas de la OHAp es menor que el de las bandas internas del β -TCP. El modo de elongación del grupo OH^- fue observado en 3576 cm^{-1} , encontrando que su intensidad es altamente sensible a la cristalinidad de la muestra. Los modos que ocurrieron en frecuencias por debajo de 320 cm^{-1} fueron asignados a modos de carácter traslacional que involucran a subredes de Ca^{2+} y PO_4^{3-} y a modos libracionales de los grupos PO_4^{3-} .

Tsuda y Arends realizaron un estudio sobre la orientación de los cristales en OHAp y en esmalte dental; para ello utilizaron una configuración óptica que les permitió obtener un haz incidente y señal Raman polarizadas [60]. Con base en un diseño experimental de tipo $x_i(x_jx_j)\bar{x}_i$, los autores encontraron que la intensidad de las bandas Raman de los cristales de OHAp son invariantes respecto de la orientación de los ejes a y b de la celda unitaria, dependiendo únicamente de la orientación del eje c de la celda unitaria. Con base en este resultado, lograron constatar que la orientación del eje c de los cristallitos en el esmalte dental es, en promedio, perpendicular a la superficie exterior del esmalte. En cuanto a los modos vibracionales del ion $(PO_4)^{3-}$ de la OHAp, el modo vibracional ν_1 quedó localizado en 962 cm^{-1} ; el modo vibracional ν_2 en $432, 439$ y 454 cm^{-1} ; el modo vibracional ν_3 en bandas distribuidas desde 1020 cm^{-1} a 1077 cm^{-1} ; y el modo vibracional ν_4 en $581, 593, 609$ y 617 cm^{-1} . Conviene señalar que, para asignar el tipo y número de simetrías, los autores utilizaron el grupo puntual de simetría $C_6^6(P6_3)$, en lugar del grupo puntual $C_{6h}^2(P6_3/m)$,

por considerar que los iones OH^- no están localizados en el plano especular σ_h .

Sowa MG *et al.* llevaron a cabo un estudio a fin de caracterizar diversas propiedades ópticas del esmalte dental sano y de las lesiones cariosas incipientes, utilizando espectroscopía Raman y Tomografía Óptica Coherente (Optical Coherence Tomography; OCT por sus siglas en inglés) [61]. En el experimento con espectroscopía Raman utilizaron una óptica que les permitió obtener un haz incidente y señal Raman polarizados. Los investigadores tomaron como base la propiedad de anisotropía de la polarización Raman en OHAp del esmalte y midieron, tanto para esmalte sano como para lesiones cariosas incipientes, la razón de polarización, definida como $\rho = I_{(\perp)}/I_{(\parallel)}$, donde $I_{(\perp)}$ e $I_{(\parallel)}$ representan la intensidad (integrada) de la señal Raman polarizada perpendicular y paralela a la dirección de polarización de haz incidente, respectivamente; para este análisis únicamente se tomó en cuenta el modo vibracional ν_1 del ion $(PO_4)^{3-}$ de la OHAp, en 959 cm^{-1} . En este estudio se puso especial atención en el cálculo de la precisión de los resultados, tanto en el aspecto de la repetibilidad como en el de la reproducibilidad; para ello, en correspondencia con el diseño experimental de toma de espectros en distintos sitios de una misma pieza dental, se llevó a cabo el análisis estadístico ANOVA para mediciones repetidas (Repeated measures One-way ANOVA). Se encontró diferencia significativa entre las medias de la razón de polarización correspondientes a esmalte sano y a lesiones cariosas incipientes ($p < 0.01$); sin embargo, varios valores de la razón de polarización correspondientes a lesiones cariosas se encontraron en el intervalo de confianza al 95 % (CI95 %) de la media correspondiente al esmalte sano, tanto en el análisis de la repetibilidad como en el de la reproducibilidad. El resultado anterior muestra la dificultad existente para diferenciar esmalte sano respecto de esmalte con caries incipiente, debido a la variabilidad y heterogeneidad del proceso estudiado.

González Solís JL *et al.* realizaron una investigación de la fluorosis dental mediante espectroscopía Raman [62]. Los investigadores utilizaron una línea láser con longitud de onda de 830 nm. El experimento consistió en obtener el espectro de un total de 39 muestras dentales, tanto sanas como con distintos grados de fluorosis. La región de desplazamiento Raman considerada fue de 200 a $1,800\text{ cm}^{-1}$. En los espectros obtenidos fueron observadas las bandas de CO_3^{2-} ($240\text{-}300\text{ cm}^{-1}$), CaF_2 (322 cm^{-1}), $PO_4^{3-}\nu_2$ (437 y 450 cm^{-1}), $PO_4^{3-}\nu_4$ (582 , 598 y 609 cm^{-1}), $PO_4^{3-}\nu_1$ (960 cm^{-1}), $PO_4^{3-}\nu_3$ ($1,045\text{ cm}^{-1}$) y $CO_3^{2-}\nu_1$ ($1,073\text{ cm}^{-1}$). Los autores encontraron que la banda $PO_4^{3-}\nu_1$ (960 cm^{-1}) decrece en intensidad conforme se incrementa la gravedad de fluorosis; por lo cual, señalan los autores, la intensidad de esta banda puede utilizarse para medir cuantitativamente el nivel de gravedad de fluorosis. Adicionalmente, los investigadores llevaron a cabo un Análisis de Componentes Principales (Principal Components Analysis; PCA, por sus siglas en inglés); señalan que mediante esta técnica pudieron discriminar entre las categorías leve y moderado, con una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 89 %; y para las categorías leve y severo, con una sensibilidad de 91 % y una especificidad de 100 %. Los autores no informaron sobre los resultados obtenidos al comparar esmalte sano contra esmalte con fluorosis.

6. Técnicas de Análisis Complementarias

La presencia de flúor en exceso, durante la etapa odontogénica, interfiere con la remoción de las proteínas en la matriz del esmalte, causando un retardamiento en el proceso de mineralización de la matriz del esmalte. Lo anterior, como ya fue mencionado, provoca alteraciones en la formación del esmalte, dando como resultado un esmalte hipomineralizado [63].

A nivel clínico, siguiendo el criterio de clasificación de Thylstrup-Fejerskov, la fluorosis dental se manifiesta mediante la aparición de delgadas líneas blancas opacas que siguen a las periquimatas en la superficie del diente (TFI1); la confluencia de líneas de opacidad adyacentes (TFI2); la aparición de nubes de manchas irregulares blanquecinas (TFI3); una marcada opacidad de la superficie completa del diente o apariencia de blanco tiza (TFI4); una marcada opacidad de la superficie completa y pérdida localizada del esmalte en la superficie (pits, por su designación en inglés; fositas), con diámetro menor a 2 mm (TFI5); la confluencia de áreas de pérdida de esmalte en la superficie (TFI6); la pérdida de esmalte superficial, involucrando menos de la mitad de la superficie del diente (TFI7); la pérdida de esmalte superficial, involucrando más de la mitad de la superficie del diente (TFI8); por último, en la forma más severa de fluorosis, la pérdida de partes del esmalte, con cambios en la apariencia anatómica de la superficie o del diente (TFI9) [64].

A nivel estructural, el esmalte con fluorosis presenta defectos y alteraciones de diversa índole. Existen áreas fuertemente hipomineralizadas que se extienden desde las partes internas del esmalte hacia la capa superficial. En la superficie, la capa de esmalte que cubre estas zonas hipomineralizadas presenta un alto grado de mineralización. Las áreas hipomineralizadas se caracterizan por la presencia de cristales hexagonales planos arreglados en forma dispersa, con alteraciones o defectos en su centro y en su perímetro; por su parte, las zonas superficiales hipermineralizadas que las cubren presentan tanto cristales grandes hexagonales planos como cristales pequeños sin defectos [65]. Los dientes con mayor hipomineralización, una vez que erupcionan, son más susceptibles a daños por los efectos mecánicos y químicos que normalmente ocurren [64].

En la presente investigación, adicional al criterio clínico utilizado para clasificar a las muestras según el nivel de fluorosis que presentan, y aunado al estudio de la fluorosis dental mediante espectroscopía Raman, haremos uso de técnicas adicionales, que nos permitan obtener información sobre aspectos morfológicos, estructurales y de composición química de las muestras consideradas en esta investigación. En esta dirección, llevaremos a cabo un Análisis de Difracción de Rayos X (X-Ray Diffraction, XRD, por sus siglas en inglés) de muestras características a fin de obtener información cristalográfica de las mismas; particularmente, obtendremos información sobre el tamaño de los cristalitos y los parámetros de celda unitaria [66, 67, 68]. Adicionalmente, utilizaremos Microscopía Electrónica de Barrido/Análisis de Energía Dispersiva de Rayos X (Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-Ray Spectrometer, SEM/EDS, por sus siglas en inglés) para obtener información adicional sobre aspectos morfológicos y de composición química de estas muestras [69]

Capítulo 3

Objetivo

Objetivo General

- Caracterizar la fluorosis en esmalte de dientes permanentes mediante Espectroscopía Raman y técnicas complementarias (Microscopía Electrónica de Barrido, Análisis de Energía Dispersiva de Rayos X y Difracción de Rayos X).

Objetivos Específicos

- Identificar los modos vibracionales del esmalte de piezas dentales que se encuentran en distintos niveles de fluorosis (TFI) mediante Espectroscopía Raman, así como sus relaciones.
- Determinar el tamaño de los cristalitas y parámetros de celda unitaria de los cristales que conforman el esmalte de piezas dentales que se encuentran en distintos niveles de fluorosis (TFI) mediante Difracción de Rayos X (XRD).
- Caracterizar la morfología del esmalte de piezas dentales que se encuentran en distintos niveles de fluorosis (TFI) mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).
- Determinar la composición química del esmalte de piezas dentales que se encuentran en distintos niveles de fluorosis (TFI) mediante Análisis de Energía Dispersiva de Rayos X (SEM/EDS).

Con el desarrollo de los láseres, la espectroscopía Raman se ha constituido en una herramienta poderosa para el estudio de materiales, bajo muy diversas condiciones y estados de la materia, pues nos proporciona huellas digitales que contienen información de los materiales analizados. Aunado a su carácter no invasivo, no destructivo y poder ser utilizada en tiempo real, la espectroscopía Raman constituye, por tanto, un método que ofrece grandes ventajas y oportunidades para ser utilizado en el área de la salud, abriendo un campo de aplicación sumamente prometedor e inagotable.

Con base en las consideraciones establecidas en las secciones previas de este documento, el problema a resolver, planteado en términos de pregunta de investigación, podría ser formulado de la siguiente manera:

¿Pueden ser identificados los diversos niveles de gravedad de fluorosis presentes en esmalte dental mediante el uso de espectroscopía Raman?

Así, este trabajo de investigación está orientado a aportar elementos que contribuyan a conformar un método, basado en espectroscopía Raman, que permita establecer la caracterización de los distintos niveles de gravedad de la fluorosis dental.

Capítulo 4

Método

1. Material

Las muestras dentales utilizadas en este estudio fueron recolectadas de diversas Clínicas Dentales de la Secretaría de Salud, ubicadas en los estados de Morelos, Zacatecas y Oaxaca, mismas que fueron donadas por los pacientes. Cada una de las piezas dentales fue extraída del paciente por razones de atención a su salud bucal, ya sea por necesidades ortodóncicas, protésicas o parodontales. En estas zonas del país el rango de concentración de flúor en agua oscila desde 0.1 hasta 4 ppm.

En la adquisición y manejo de las muestras dentales se siguieron los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana Lineamientos para el Transporte de especímenes biológicos de la Secretaría de Salud [70]. La realización de esta investigación se llevó a cabo con base en el Protocolo de Investigación “Caracterización de la fluorosis dental mediante espectroscopía Raman”, aprobado por el Comité Académico del Doctorado en Física de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapala (CBI.AP.962.2015), quien revisó tanto los aspectos éticos como metodológicos.

La muestra de piezas dentales quedó conformada por 40 dientes, asegurando que para cada categoría de fluorosis se contara con 10 piezas. La caracterización clínica del estado de fluorosis de cada pieza se llevó a cabo mediante un procedimiento estandarizado, descrito en la siguiente sección. Se obtuvieron espectros Raman de todas la piezas dentales. Adicionalmente, se llevó a cabo el estudio de difracción de Rayos X (DRX, por sus siglas en inglés) de tres dientes representativos de las categorías extremas estudiadas: un diente con esmalte sano y dos con fluorosis ubicados en las categorías más altas. Y se llevó a cabo también el estudio de esmalte dental correspondiente a la categoría de fluorosis más alta mediante Análisis de Energía Dispersiva de Rayos X (SEM/EDS).

2. Preparación de las muestras

Después de la extracción, cada una de las muestras fue depositada en un recipiente con agua deionizada saturada con thymol al 0.1 % a fin de ser transportadas al laboratorio.

Con el fin de eliminar el material orgánico procedente de restos de comida o de productos de extracción del diente, y la grasa depositada en las superficies de las piezas dentales por el manejo de las mismas, cada una de las piezas dentales fue lavada y, posteriormente, sometida a un baño ultrasónico en agua bidestilada (deionizada), a temperatura ambiente, durante 30 minutos; el procedimiento de lavado ultrasónico fue realizado con un equipo Ultrasonic Cleaner Cole Parmer, modelo 8890R-MYH. Posteriormente, la muestra fue secada con aire seco (Dust-Off Compressed Air, Edmund Optics, Barrington, NJ, US) y guardada en un contenedor asegurando la separación de las mismas. Una vez lavadas las piezas dentales, se procedió a su clasificación según su estado de fluorosis.

3. Clasificación de las piezas dentales según su estado de fluorosis

Cada una de las muestras dentales utilizadas en este estudio fue evaluada para determinar su estado de fluorosis, usando el Índice de Thyrsrup y Fejeslov (ITF). Este índice puede tomar 10 valores diferentes, mismos que están relacionados con los características histológicas que subyacen a cada categoría de fluorosis.

Para ello, se procedió de la manera siguiente. Las piezas dentales fueron evaluadas, de manera independiente, por dos examinadores entrenados y calibrados (MEI y AMG) que han participado en el proceso de fijamiento de los criterios de estandarización de la Encuesta Nacional de Caries y Fluorosis en México. En los casos en que se presentó desacuerdo entre los examinadores en cuanto a la clasificación del nivel de fluorosis que presentaba el diente, se llevaron a cabo sesiones de trabajo adicionales a fin de tomar un acuerdo entre los examinadores sobre la clasificación que correspondía.

La evaluación del nivel de fluorosis de cada diente consideró únicamente la superficie vestibular de cada uno de ellos. Finalmente, todos los dientes fueron clasificados en alguno de los siguientes cuatro grupos: esmalte sano (ITF=0), fluorosis leve (ITF=1-3), fluorosis moderada (ITF=4-6) y fluorosis severa (ITF=7-9). En total, para este estudio, fueron considerados 40 dientes posteriores, 10 en cada una de las categorías mencionadas. El grupo de dientes sanos se tomó como grupo de referencia, grupo control.

4. Descripción del equipo utilizado y definición de los parámetros de adquisición de los espectros Raman

Los espectros Raman de cada muestra fueron adquiridos utilizando un espectrómetro Raman Triple Monocromador T64000 (Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ, US), con opción macro y micro. El espectrómetro tiene acoplado un microscopio confocal Olympus (Olympus, 20097 Hamburg, Germany), con juego de objetivos intercambiables (Olympus, 10x-100x, de corta y larga d.f.). El microscopio cuenta con una plataforma para colocación de muestras, la cual tiene desplazamiento en la dirección vertical controlado manualmente y desplazamiento en el plano horizontal (ejes X,Y) controlado digitalmente mediante un joystick, con un paso de $0.1 \mu\text{m}$ que permite la selección del área de trabajo de la muestra. La recolección de la señal Raman se llevó a cabo utilizando el detector CCD acoplado al propio equipo, enfriado a -70° mediante el efecto Peltier [71].

Como fuente de excitación se utilizó un láser de estado sólido (Láser Quantum DPSS, modelo Ventus 532+mpc 6000, Laser Quantum, Stockport, Cheshire SK4 3GL, UK), a una longitud de onda $\lambda=532.1 \text{ nm}$, con potencia de salida hasta 500 mW . En la adquisición de los espectros se utilizó el objetivo 100x (Olympus, 20097 Hamburg, Germany). La resolución espectral fue de 0.1 cm^{-1} . Para la calibración del espectrómetro se utilizó material semiconductor de silicio, tomando como referencia el pico en 520 cm^{-1} de desplazamiento Raman.

Con el fin de lograr una buena relación señal/ruido y no dañar la muestra, la configuración utilizada para la adquisición de cada espectro fue de 10 acumulaciones con tiempo de integración de 60s cada una de ellas; la potencia de la línea de excitación fue de 20mW a la salida del láser, antes de pasar por la óptica del espectrómetro.

El rango espectral de la ventana de registro (desplazamiento Raman) en la adquisición de los espectros fue de 250 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} ; con ello se aseguró que las frecuencias de desplazamiento Raman fundamentales, características de la hidroxiapatita, particularmente las correspondientes a los modos vibracionales de grupos fosfato $(\text{PO}_4)^{3-}$, quedaran consideradas en el espectro adquirido.

La adquisición de los espectros de cada diente se realizó en un área seleccionada de la superficie vestibular del diente que fuera representativa de las regiones de fluorosis en el esmalte; ésta fue tomada en la dirección del eje sagital de la superficie bucal, perpendicular aproximadamente a las líneas de la periquimata. Dentro de esta región fueron seleccionados 10 diferentes puntos, ubicados en dos líneas paralelas entre sí, de 5 puntos cada una de ellas, con una separación de $100 \mu\text{m}$, muestreados a partir de una micro-área rectangular de $400 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$.

La operación y configuración del espectrómetro con los parámetros seleccionados para llevar a cabo la adquisición de los espectros se realizó utilizando el software LabSpec(NGS LabSpec V 5.78.24, Horiba, Kyoto, Japan)[72].

Este estudio se llevó a cabo con base en la infraestructura y equipo del Laboratorio Físicoquímica de Nanoestructuras del Departamento de Física de la UAM-Iztapalapa.

5. Equipo de Rayos X y parámetros utilizados para la generación de los difractogramas

El estudio del esmalte dental, a escala atómica, fue realizado mediante la técnica de difracción de Rayos X (XRD), utilizando un Sistema de Difracción de Rayos X, marca Bruker (Bruker, D8 Advance-Da Vinci), con geometría Bragg-Brentano (divergente) y haces paralelos. El equipo permite realizar análisis de muestras policristalinas, ya sea sólidas o líquidas; en el caso de muestras sólidas, el equipo puede llevar a cabo el análisis de muestras en polvo o en bulto.

Los difractogramas fueron obtenidos sobre la cara vestibular del diente (en bulto), misma que fue utilizada para la adquisición de los espectros Raman. Con ayuda del portamuestras que utiliza el equipo de difracción utilizado, se buscó que la cara bajo estudio estuviera en posición paralela a la línea horizontal del difractómetro. La línea de radiación utilizada para la generación de los difractogramas fue de $\text{Cu K}\alpha_1\alpha_2$, con longitud de onda $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$, generada a 40 kV. El rango del ángulo de difracción utilizado, 2θ , fue de 20° a 70° , con un paso de 0.02° .

Esta parte del estudio fue realizada en el Laboratorio de Difracción de Rayos X de la División de Ciencias Básicas de la UAM Iztapalapa.

6. Equipo de Microscopía Electrónica de Barrido utilizado para llevar a cabo el estudio SEM/EDS

La realización del estudio del esmalte dental con fluorosis, por microscopía electrónica de barrido (SEM/EDS), se llevó a cabo con el apoyo del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la UAM-Iztapalapa. El microscopio electrónico utilizado para el análisis de las muestras fue un Microscopio Electrónico de Barrido de Alta Resolución, marca Jeol, modelo HRSEM Jeol 7600F.

7. Análisis de los datos (Espectros Raman)

Se conformó una base de datos inicial con la información cruda de los espectros. La preparación, el pre-análisis y todo el análisis de los espectros se realizó con el software R.

A fin de poder llevar a cabo la comparación de los espectros Raman obtenidos, removiendo las diferencias relativas a línea basal y escala, todos los espectros fueron preprocesados con

herramienta computacional que forma parte del software R (R Core Team 2017), específicamente diseñada para tal fin. Todos los espectros fueron previamente alisados (smoothing) con una función de ajuste de regresión polinomial local (local polynomial regression fitting function) disponible en el software hyperSpect [73] a ser utilizada en lenguaje R, en el ambiente para análisis de cómputo estadístico (R Foundation for Statistical computing, Vienna, Austria). Adicionalmente, en todos los espectros se llevó a cabo la corrección basal de concavidad de banda rubber (concave band baseline correction) haciendo uso de las herramientas mencionadas. Para la estandarización de los espectros se tomó como referencia el área total bajo la gráfica de cada espectro en el rango espectral de 250 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} . El análisis estadístico de los espectros se realizó haciendo uso de las rutinas estadísticas disponibles en R. La utilización de estos recursos computacionales para análisis de espectros Raman exigió la generación de los scripts en R correspondientes. En esta investigación, todas las gráficas que presentan resultados del análisis de los espectros Raman fueron generadas en este ambiente.

Una vez conformado el archivo de datos correspondiente a los espectros pre-procesados (data.frame de dimensión 951×401), se procedió a generar estadísticas descriptivas de los datos y posteriormente se aplicaron procedimientos ANOVA para estudiar diferencia de medias entre los grupos de fluorosis y pruebas Tukey para estudiar diferencia de medias en la comparación por pares [74, 75].

Adicionalmente, a partir de la posibilidad de que cada espectro Raman puede ser representado en un espacio vectorial \mathbb{R}^p , en donde la dimensión del espacio queda determinada por el número de bandas que conforman el espectro, se llevó a cabo el Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés). Este procedimiento de análisis multidimensional permitió conformar un subespacio de dimensión menor, generado por los eigenvalores de la matriz de varianzas-covarianzas de los datos, en el que fueron analizados los datos.

Finalmente, se construyó un modelo de clasificación de aprendizaje supervisado basado en el procedimiento Análisis Discriminante Lineal (LDA, por sus siglas en inglés). Mediante el procedimiento LDA se construyen funciones discriminantes que permiten llevar a cabo la predicción sobre la membresía de un objeto específico. Para ello, el modelo se generó con un subconjunto de datos, denominado conjunto de entrenamiento, y su desempeño se evaluó con el resto de los datos, denominado conjunto de prueba. Lo anterior permitió llevar a cabo la validación del modelo, obteniendo medidas de sensibilidad, especificidad y precisión del modelo para las diferentes categorías de fluorosis.

8. Análisis de los datos (Difractogramas de Rayos X)

En análisis a escala atómica del esmalte dental fue realizado en tres muestras seleccionadas, mediante Análisis de Difracción de Rayos X. La primera muestra correspondió a un diente con esmalte sano; la segunda y tercera correspondieron a dientes con fluorosis moderada y fluorosis severa, respectivamente. La medición de los difractogramas, en los tres casos, se realizó para el ángulo de difracción 2θ ubicado en el rango de 20° a 70° . Con este rango se garantizó que en el difractograma quedaran registrados los picos ubicados en los ángulos que cumplen con la condición que establece la Ley de Bragg y que son característicos de la hidroxiapatita.

Con los datos obtenidos mediante difracción de Rayos X, primero se llevó a cabo un pre-procesamiento de los difractogramas, consistente en un suavizado (smoothing) y en la construcción y eliminación de la línea basal; dicho procedimiento se realizó con el software R. El cálculo de los parámetros de red (celda unitaria), volumen de celda unitaria, distancia entre planos cristalográficos adyacentes y tamaño de los cristalitos fue realizado con base en la determinación de los ángulos de difracción y ancho de banda a media altura (FWHM, por sus siglas en inglés) de los picos de difracción correspondientes, utilizando modelos Gaussiano, Lorentziano y Voigt. El análisis de los difractogramas fue realizado con el software OriginPro 8 SR0 (OriginLab Corporation, Northampton, 01060 MA, United States, 2020).

Los difractogramas del esmalte obtenidos fueron indizados conforme al estándar para apatita indicados en la carta cristalográfica JCPDS: 9-432 (International Centre for Diffraction Data) [76, 77]. En la Figura 4.1 se muestra el difractograma correspondiente a esta carta cristalográfica; en él están indicados los planos de difracción correspondientes a los picos del difractograma conforme al índice de Miller [78].

A partir de los difractogramas obtenidos, el cálculo de los parámetros de la celda unitaria se llevó a cabo considerando que la estructura general de la hidroxiapatita corresponde a la del sistema cristalino hexagonal, identificada en el grupo espacial $P6_3/m$. En los sistemas cristalinos hexagonales la relación que guardan los planos cristalográficos con los parámetros de celda unitaria está dada por la siguiente ecuación [51].

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c} \quad (4.1)$$

En esta ecuación h, k, l denotan los índices de Miller del plano cristalográfico involucrado; a y c corresponden a la longitud de los ejes de la celda unitaria. d_{hkl} denota la distancia existente entre planos adyacentes de la misma familia. Puede observarse que esta ecuación se simplifica para los planos con índices de Miller $(h00)$, $(0k0)$ y $(00l)$.

Los planos de difracción utilizados para obtener los parámetros de celda fueron el (002) y el (300) . La determinación del ángulo de Bragg 2θ correspondiente al plano (002) se llevó

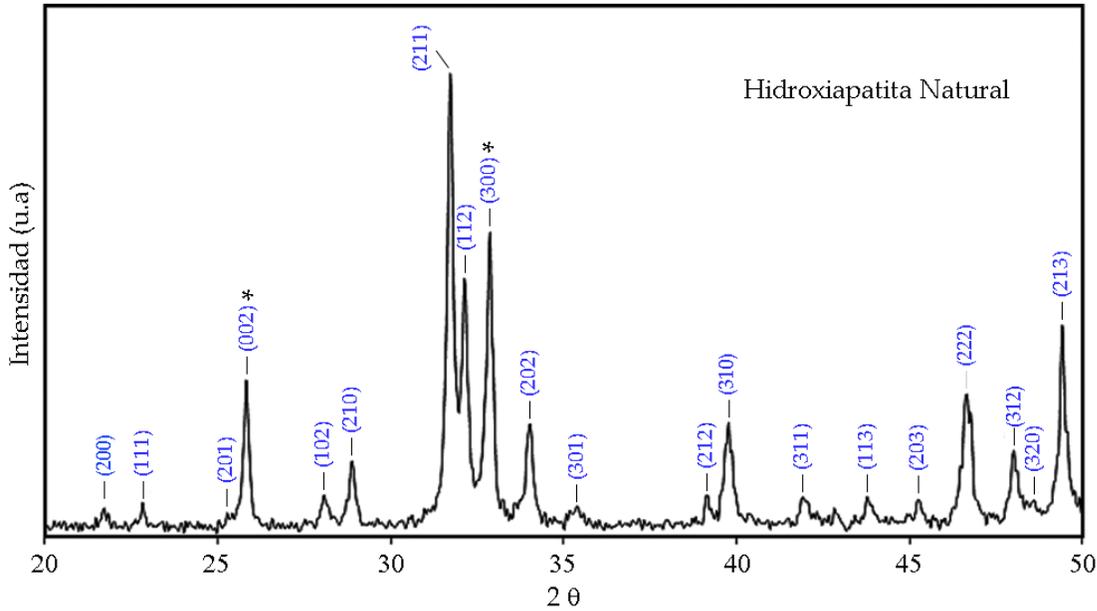


Figura 4.1: Difractograma de rayos X de polvo de hidroxiapatita natural, según carta cristalográfica JCPDS:9-432. Se muestran los índices de Miller de los planos cristalográficos correspondientes a los picos del difractograma (modificado de Pourmollaabbassi B *et al.*, 2016) [78].

a cabo mediante ajuste con los modelos Gaussiano, Lorentziano y Voigt. El plano (300) únicamente aceptó ajuste gaussiano. Las ecuaciones de ajuste de los modelos utilizados fueron las siguientes (OriginPro 8 SR0, 2020) :

Modelo Gaussiano

$$y = y_0 + \frac{A}{w\sqrt{\pi/2}} e^{-2\frac{(x-x_c)^2}{w^2}} \quad (4.2)$$

donde cada uno de los parámetros de la ecuación representa lo siguiente:

y_0 - línea basal

A - área total bajo la curva

x_c - coordenada x del centro de la curva gaussiana

w - parámetro que controla ancho de banda de la curva gaussiana

Modelo Lorentziano

$$y = y_0 + \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(x-x_c)^2 + w^2} \quad (4.3)$$

donde cada uno de los parámetros de la ecuación representa lo siguiente:

y_0 - línea basal
 A - área total bajo la curva
 x_c - coordenada x del centro de la curva lorentziana
 w - parámetro que controla ancho de banda de la curva lorentziana

Modelo Voigt

$$y = y_0 + A \frac{2 \ln 2}{\pi^{3/2}} \frac{w_L}{w_G} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{e^{-t^2}}{\left(\sqrt{\ln 2} \frac{w_L}{w_G}\right)^2 + \left(\sqrt{4 \ln 2} \left(\frac{x-x_c}{w_G}\right) - t\right)^2} dt \quad (4.4)$$

donde cada uno de los parámetros de la ecuación representa lo siguiente:

y_0 - línea basal
 A - área total bajo de la curva
 x_c - coordenada x del centro de la curva Voigt
 w_L - parámetro que controla ancho de banda de la curva Voigt, contribución lorentziana
 w_G - parámetro que controla ancho de banda de la curva Voigt, contribución gaussiana

Conocido el ángulo de difracción de Bragg para los planos (002) y (300), se procedió a calcular la distancia entre planos de cada una de estas familias, haciendo uso de la Ley de Bragg, según la siguiente ecuación [50]:

$$2d_{hkl} \text{sen}(\theta) = n\lambda \quad (4.5)$$

donde θ representa el ángulo de difracción correspondiente a la familia de planos (hkl) y λ la longitud de onda del haz de rayos X utilizado para obtener los difractogramas.

El cálculo del volumen de la celda unitaria considerada como prisma hexagonal se realizó mediante la siguiente fórmula [79]:

$$V = \frac{3}{2} \sqrt{3} a^2 c \quad (4.6)$$

donde V indica el volumen de la celda unitaria hexagonal; a y c indican la longitud del eje a y del eje c de dicha celda unitaria, respectivamente.

El cálculo para el tamaño del cristalito se llevó a cabo mediante el método de Williamson-Hall [51]. Este método considera que el ensanchamiento total de una banda, denotado por β_t , es producido por dos factores. El primer factor está asociado al tamaño del cristal en la dirección ortogonal al plano de difracción, denotado por β_1 . El segundo factor está asociado a la micro-deformación del cristal, denotado por β_2 .

El factor asociado al tamaño del cristal, β_1 está dado por la ecuación de Scherrer [80]:

$$\beta_1 = \frac{k\lambda}{L \cos(\theta)} \quad (4.7)$$

donde k es el factor de forma del cristalito ($k = 0.94$)
 λ es la longitud de onda de la radiación utilizada
 L es el tamaño del cristal ortogonal al plano de difracción
 θ es el ángulo de difracción de Bragg

El segundo factor, β_2 , está dado por la siguiente ecuación

$$\beta_2 = C \tan(\theta) \quad (4.8)$$

donde C es la micro-deformación de la red
 θ es el ángulo de difracción de Bragg

El método de Williamson-Hall considera que el ancho total es la suma de estos dos factores; esto es, el ancho total puede expresarse mediante la siguiente ecuación

$$\beta_t = \beta_1 + \beta_2 \quad (4.9)$$

De esta forma, el ancho de banda cumple con la siguiente condición

$$\beta_t \cos(\theta) = C \sin(\theta) + \frac{k\lambda}{L} \quad (4.10)$$

Para conocer el tamaño del cristal en dirección ortogonal a un plano de reflexión se procede a evaluar esta ecuación en distintos ángulos de difracción, correspondientes a planos paralelos y obtener la ordenada al origen de la recta

$$y = mx + b \quad (4.11)$$

donde

$$x = \sin(\theta) \quad (4.12)$$

$$y = \beta_t \cos(\theta) \quad (4.13)$$

y

$$b = \frac{k\lambda}{L} \quad (4.14)$$

Capítulo 5

Resultados

En total fueron analizados 400 espectros Raman de esmalte dental. Los espectros fueron adquiridos a partir de 40 dientes. La muestra total de dientes fue balanceada, se tomaron 10 dientes en cada una de las cuatro categorías consideradas; a saber, dientes sanos, con fluorosis leve, con fluorosis moderada y con fluorosis severa. Los dientes sanos sirvieron como grupo de referencia. Se obtuvieron 10 espectros Raman de cada diente en el rango espectral de 250 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} .

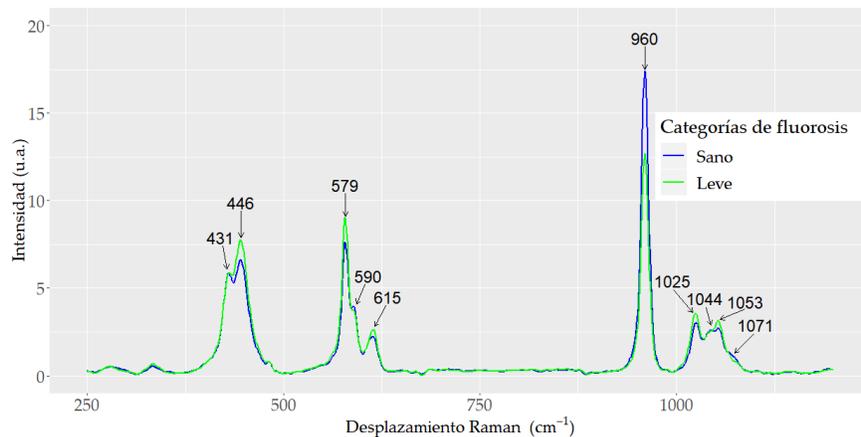
1. Espectros Raman promedio

En la Figura 5.1 se muestran los espectros Raman estandarizados promedio correspondientes a los grupos de fluorosis considerados, incluido el grupo de referencia; en cada caso el espectro promedio fue obtenido sobre la base de 100 espectros en cada categoría de fluorosis.

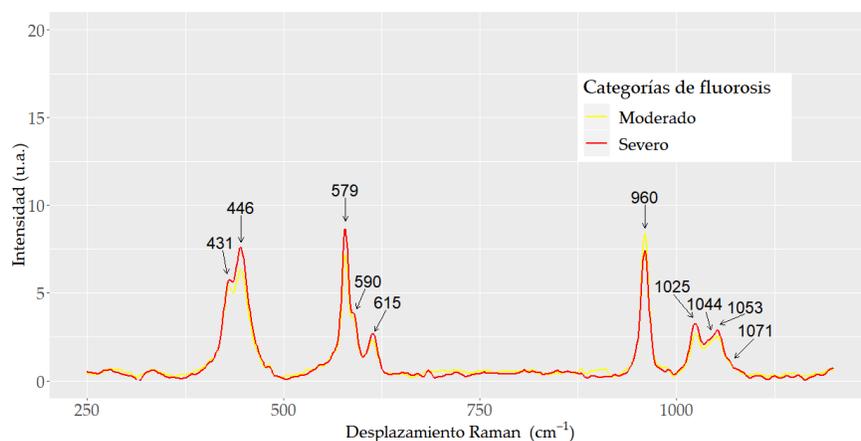
En cada uno de estos espectros promedio puede observarse la presencia de modos vibracionales característicos del ion fosfato (PO_4)³⁻, el cual es elemento constitutivo de la hidroxiapatita del esmalte dental. Las bandas correspondientes a estos modos vibracionales están ubicadas en 431 cm^{-1} , 446 cm^{-1} , 579 cm^{-1} , 590 cm^{-1} , 615 cm^{-1} , 960 cm^{-1} , 1025 cm^{-1} , 1044 cm^{-1} y 1053 cm^{-1} . Adicionalmente, en estos espectros promedio se muestra la banda ubicada en 1071 cm^{-1} , correspondiente al ion carbonato $\nu_1(CO_3)$ ²⁻.

En términos generales, los cuatro espectros promedio exhiben el mismo patrón de bandas. Puede observarse, sin embargo, que la altura de estas bandas varía conforme varía el grupo de dientes con fluorosis considerado.

En las Tablas 5.1 y 5.2 se muestran los valores promedio de la intensidad de las bandas mencionadas. En estas tablas se muestran también los resultados, obtenidos al aplicar el procedimiento ANOVA, sobre la diferencia de medias entre las alturas de las bandas de los grupos. Adicionalmente, en la Tabla 5.3 se muestran los resultados obtenidos, al aplicar en cada banda la prueba Tukey para diferencia de medias, para todas las comparaciones por pares posibles.



(a) Esmalte sano y esmalte con fluorosis leve



(b) Esmalte con fluorosis moderada y esmalte con fluorosis severa

Figura 5.1: Espectros Raman promedio de esmalte, según estado de fluorosis.

El pico más alto, en los cuatro casos, corresponde al modo vibracional de elongación simétrico $\nu_1(PO_4)^{3-}$ ubicado en la banda 960 cm^{-1} . Se observa que la altura de este pico sigue un patrón bien definido; conforme el nivel de fluorosis crece, la altura del pico $\nu_1(PO_4)^{3-}$ decrece. Para esta banda, aplicando ANOVA, la diferencia de medias entre los cuatro grupos de fluorosis resultó ser estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$). Se constató que en todas las comparaciones por pares la diferencia de medias, aplicando Tukey, también fue significativa.

Los picos asociados con el modo vibracional de deformación $\nu_2(PO_4)^{3-}$ se observaron en las bandas 431 cm^{-1} y 446 cm^{-1} . La intensidad más alta en ambas bandas correspondió al grupo de dientes con fluorosis leve. Ambas bandas presentaron el mismo patrón en cuanto a la altura del pico según el nivel de fluorosis; sin embargo, no se observa patrón alguno que relacione en forma creciente o decreciente la altura del pico con el nivel de fluorosis del diente para ninguna de las dos bandas. La diferencia de medias entre los cuatro grupos, utilizando ANOVA, fue estadísticamente significativa en cada una de las bandas ($p \leq 0.001$,

para ambos casos). Sin embargo, al realizar las comparaciones por pares, la prueba Tukey mostró que hay comparaciones cuya diferencia de medias no es estadísticamente significativa.

Los picos correspondientes al modo vibracional de elongación antisimétrico $\nu_3(PO_4)^{3-}$ se observaron en las bandas 1025 cm^{-1} y 1053 cm^{-1} , con la presencia de un hombro en la banda 1044 cm^{-1} . La intensidad más alta en las bandas 1025 cm^{-1} y 1053 cm^{-1} correspondió al grupo con fluorosis leve. Ambas bandas presentaron el mismo patrón en cuanto a la altura del pico según el nivel de fluorosis; sin embargo, no se observó patrón alguno que relacione en forma creciente o decreciente la altura del pico con el nivel de fluorosis del diente en ninguna de las dos bandas. En cada una de las bandas el procedimiento ANOVA mostró que la diferencia de medias entre los cuatro grupos de fluorosis es estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$, en las tres bandas). Sin embargo, al realizar las comparaciones por pares, la prueba Tukey mostró que hay comparaciones cuya diferencia de medias no es estadísticamente significativa; solo en el caso de la banda 1025 cm^{-1} , en todas las comparaciones por pares la diferencia de medias resultó ser estadísticamente significativa.

Los picos correspondientes al modo vibracional de deformación $\nu_4(PO_4)^{3-}$ se observaron en las bandas 579 cm^{-1} y 615 cm^{-1} , con la presencia de un hombro en la banda 590 cm^{-1} . La intensidad más alta en la banda 579 cm^{-1} , correspondió al grupo de fluorosis leve; en el caso de la banda 615 cm^{-1} correspondió al grupo con fluorosis severo; en el caso del hombro en la banda 590 cm^{-1} , el valor más alto correspondió al grupo sano. En ninguna de las tres bandas se observó patrón alguno que relacione en forma creciente o decreciente la altura del pico con el nivel de fluorosis del diente. En cada una de las bandas el procedimiento ANOVA mostró que la diferencia de medias entre los cuatro grupos de fluorosis es estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$, en las tres bandas). Sin embargo, al realizar las comparaciones por pares, la prueba Tukey mostró que hay comparaciones cuya diferencia de medias no es estadísticamente significativa; solo en el caso de la banda 579 cm^{-1} , en todas las comparaciones por pares la diferencia de medias resultó ser estadísticamente significativa.

El pico característico asociado al modo vibracional simétrico $\nu_1(CO_3)^{2-}$ se observó en la banda 1071 cm^{-1} . La intensidad más alta correspondió al grupo sano. No se observó patrón alguno que relacione en forma creciente o decreciente la altura de la banda con el nivel de fluorosis del diente. En acuerdo con los resultados del procedimiento ANOVA, la diferencia de medias entre los cuatro grupos de fluorosis es significativa ($p \leq 0.001$). Sin embargo, al realizar las comparaciones por pares, la prueba Tukey mostró que hay comparaciones cuya diferencia de medias no es estadísticamente significativa.

En resumen, sólo en la banda 960 cm^{-1} , que corresponde al modo vibracional $\nu_1(PO_4)^{3-}$ se observó un patrón bien definido en cuanto a la relación de la altura de la banda con el nivel de fluorosis que presenta el diente; en este caso se observó que a mayor fluorosis menor altura del pico 960 cm^{-1} . Con excepción de las bandas 579 cm^{-1} , 960 cm^{-1} y 1025 cm^{-1} , en todos los casos siempre existe al menos una comparación de pares cuya diferencia de medias no es estadísticamente significativa; en todas las demás bandas siempre existe, al menos, un par de grupos de fluorosis cuyas medias no se diferencian estadísticamente.

Tabla 5.1: Valores promedio de las alturas de las bandas del espectro Raman correspondientes a los iones $(PO_4)^{3-}$ y $(CO_3)^{2-}$, según estado de fluorosis del diente

Estado de fluorosis	Media \bar{x}	Error Estándar (EE)	Valor p^*
431 cm^{-1}			
Sano	5.889	0.098	<0.001
Leve	5.928	0.053	
Moderado	5.408	0.079	
Severo	5.819	0.070	
446 cm^{-1}			
Sano	6.657	0.096	<0.001
Leve	7.780	0.085	
Moderado	6.375	0.079	
Severo	7.644	0.077	
579 cm^{-1}			
Sano	7.662	0.119	<0.001
Leve	9.089	0.101	
Moderado	7.242	0.102	
Severo	8.700	0.089	
590 cm^{-1}			
Sano	3.969	0.061	<0.001
Leve	3.750	0.041	
Moderado	3.622	0.057	
Severo	3.859	0.041	
615 cm^{-1}			
Sano	2.234	0.031	<0.001
Leve	2.651	0.025	
Moderado	2.290	0.047	
Severo	2.688	0.028	
960 cm^{-1}			
Sano	17.426	0.203	<0.001
Leve	12.678	0.115	
Moderado	8.383	0.110	
Severo	7.170	0.117	
1025 cm^{-1}			
Sano	3.047	0.055	<0.001
Leve	3.578	0.056	
Moderado	2.743	0.049	
Severo	3.273	0.058	

* El valor p corresponde a la prueba ANOVA.

Tabla 5.2: (...continuación) Valores promedio de las alturas de las bandas del espectro Raman correspondientes a los iones $(PO_4)^{3-}$ y $(CO_3)^{2-}$, según estado de fluorosis del diente

Estado de fluorosis	Media \bar{x}	Error Estándar (EE)	Valor p^*
1044 cm^{-1}			
Sano	2.642	0.045	<0.001
Leve	2.582	0.036	
Moderado	2.288	0.045	
Severo	2.476	0.043	
1053 cm^{-1}			
Sano	2.763	0.049	<0.001
Leve	3.205	0.040	
Moderado	2.576	0.049	
Severo	2.932	0.051	
1071 cm^{-1}			
Sano	1.230	0.030	<0.001
Leve	1.023	0.026	
Moderado	0.908	0.043	
Severo	0.999	0.037	

* El valor p corresponde a la prueba ANOVA.

Tabla 5.3: Diferencia de los valores promedio de las alturas de las bandas del espectro Raman correspondientes a los iones $(PO_4)^{3-}$ y $(CO_3)^{2-}$ entre categorías de fluorosis

Comparación por pares	Valor p^*	Comparación por pares	Valor p^*
431 cm^{-1}		960 cm^{-1}	
Leve - Sano	0.984	Leve - Sano	<0.001**
Moderado - Sano	<0.001**	Moderado - Sano	<0.001**
Severo - Sano	0.917	Severo - Sano	<0.001**
Moderado - Leve	<0.001**	Moderado - Leve	<0.001**
Severo - Leve	0.746	Severo - Leve	<0.001**
Severo - Moderado	<0.001**	Severo - Moderado	<0.001**
446 cm^{-1}		1025 cm^{-1}	
Leve - Sano	<0.001**	Leve - Sano	<0.001**
Moderado - Sano	0.087	Moderado - Sano	<0.001**
Severo - Sano	<0.001**	Severo - Sano	0.019**
Moderado - Leve	<0.001**	Moderado - Leve	<0.001**
Severo - Leve	0.667	Severo - Leve	<0.001**
Severo - Moderado	<0.001**	Severo - Moderado	<0.001**
579 cm^{-1}		1044 cm^{-1}	
Leve - Sano	<0.001**	Leve - Sano	0.750
Moderado - Sano	0.022**	Moderado - Sano	<0.001**
Severo - Sano	<0.001**	Severo - Sano	0.029**
Moderado - Leve	<0.001**	Moderado - Leve	<0.001**
Severo - Leve	0.040**	Severo - Leve	0.284
Severo - Moderado	<0.001**	Severo - Moderado	0.010**
590 cm^{-1}		1053 cm^{-1}	
Leve - Sano	0.014**	Leve - Sano	<0.001**
Moderado - Sano	<0.001**	Moderado - Sano	0.028**
Severo - Sano	0.478	Severo - Sano	0.057
Moderado - Leve	0.288	Moderado - Leve	<0.001**
Severo - Leve	0.435	Severo - Leve	<0.001**
Severo - Moderado	0.006**	Severo - Moderado	<0.001**
615 cm^{-1}		1071 cm^{-1}	
Leve - Sano	<0.001**	Leve - Sano	<0.001**
Moderado - Sano	0.630	Moderado - Sano	<0.001**
Severo - Sano	<0.001**	Severo - Sano	<0.001**
Moderado - Leve	<0.001**	Moderado - Leve	0.091
Severo - Leve	0.869	Severo - Leve	0.961
Severo - Moderado	<0.001**	Severo - Moderado	0.252
* El valor p corresponde a la prueba Tukey.			
** Indica diferencia significativa.			

2. Dispersión de las alturas de las bandas de los espectros Raman correspondientes al ion $(PO_4)^{3-}$ y al ion $(CO_3)^{2-}$, traslape entre categorías diferentes de fluorosis

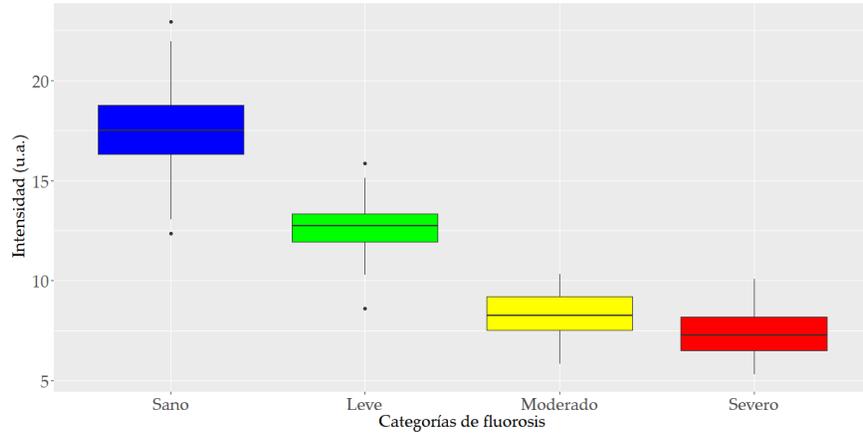
En lo que respecta a la altura de las bandas estudiadas se observó que, en el conjunto de los 400 espectros (100 espectros en cada categoría), la variación de ésta contribuye a la presencia de traslapes entre espectros Raman que provienen de dientes pertenecientes a diferentes grupos de fluorosis.

En las Figuras 5.2 - 5.11 se representa la distribución de las alturas, basada en cuartiles, de los espectros Raman, para cada banda estudiada, correspondientes a cada uno de los grupos de fluorosis considerados. En ellas se señala la mediana, así como el rango intercuartílico Q3-Q1. Adicionalmente, se presenta también el histograma de cada una de ellas.

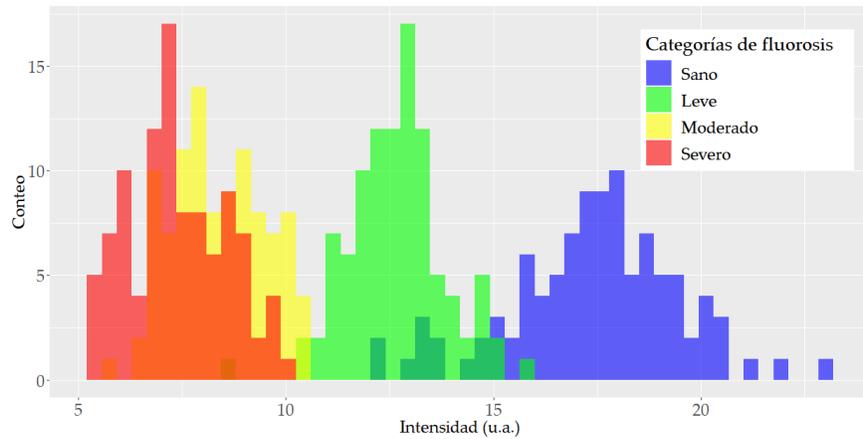
En todos los casos se observa variabilidad en los valores que toman estas intensidades en cada grupo. Esta variabilidad provoca la presencia de traslapes entre las alturas que presentan los espectros correspondientes a los distintos grupos.

En el caso particular de de la banda ubicada en 960 cm^{-1} , asignada al modo vibracional $\nu_1(PO_4)^{3-}$, se observa traslape entre las categorías sano y fluorosis leve; también se observa traslape entre los grupos moderado y severo. Vale la pena destacar que, para esta banda, no se observa traslape entre estas dos parejas de grupos.

Sin embargo, en todo los demás casos, en todas las bandas se observa traslape en las alturas entre todos los grupos considerados. Así, dada una altura de banda, en general, ésta puede provenir de al menos dos espectros que corresponden a categorías diferentes.

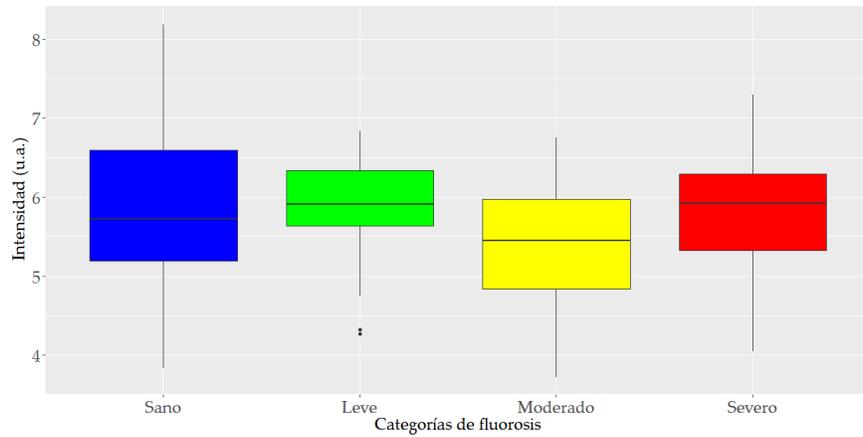


(a) Mediana y distribución en cuartiles de las alturas de la banda, según estado de fluorosis.

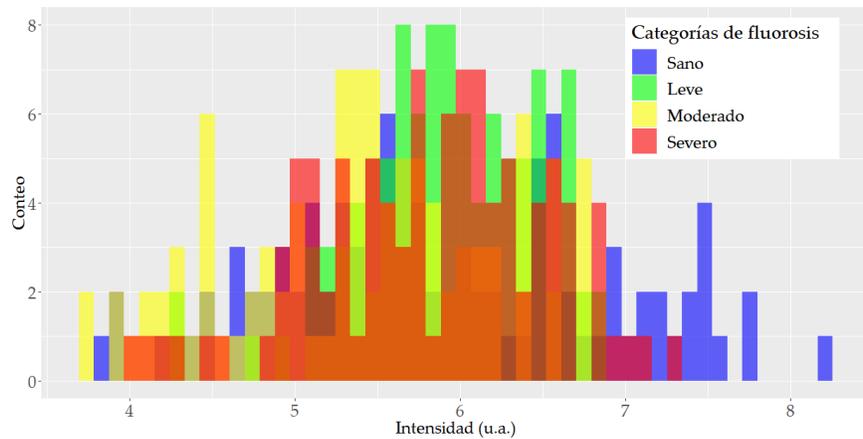


(b) Histogramas para las alturas de la banda, según estado de fluorosis.

Figura 5.2: Variación y traslape de la altura de la banda 960 cm^{-1} en los espectros Raman, según estado de fluorosis del diente.

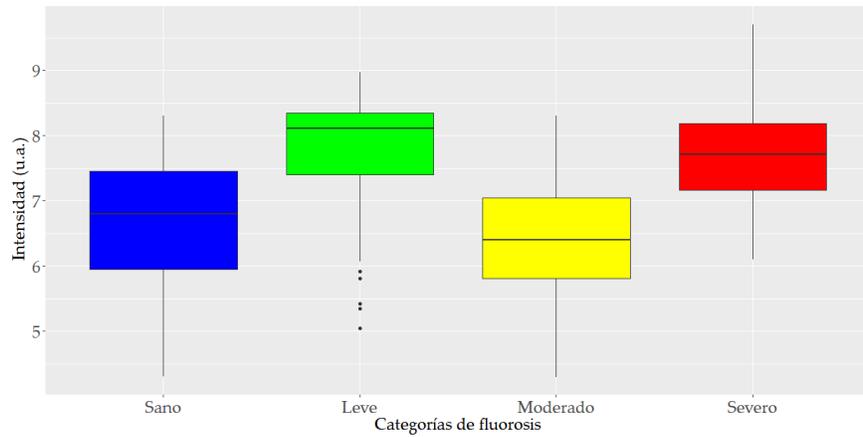


(a) Mediana y distribución en cuartiles de las alturas de la banda, según estado de fluorosis

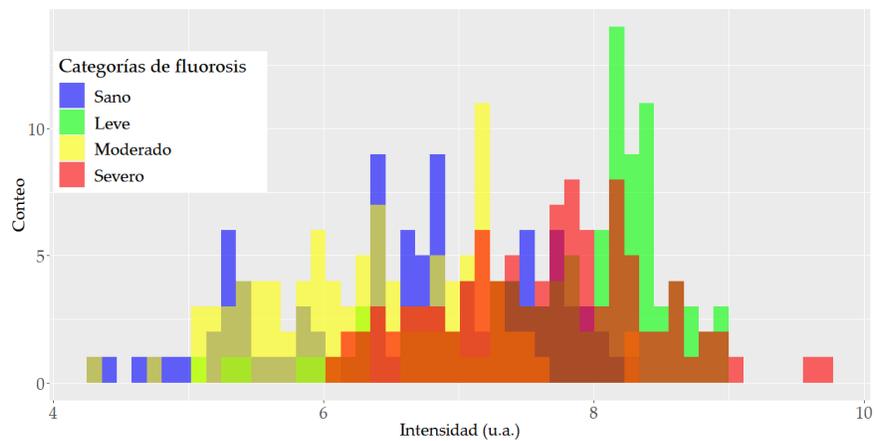


(b) Histogramas para las alturas de la banda, según estado de fluorosis

Figura 5.3: Variación y traslape de la altura de la banda 431 cm^{-1} en los espectros Raman, según estado de fluorosis del diente.

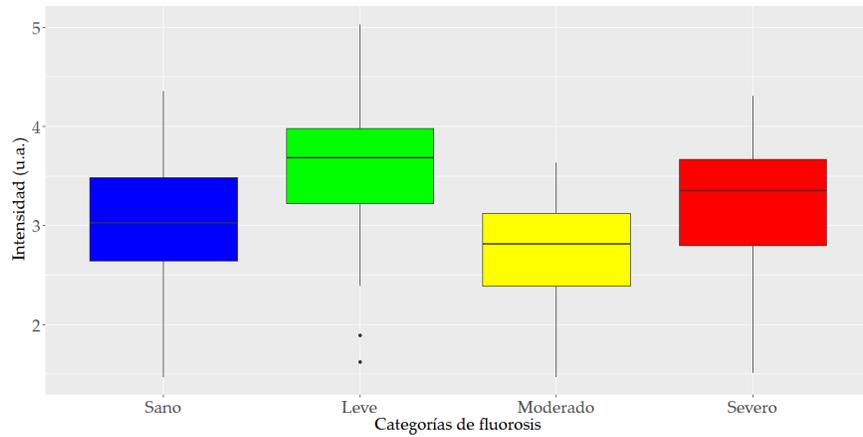


(a) Mediana y distribución en cuartiles de las alturas de la banda, según estado de fluorosis

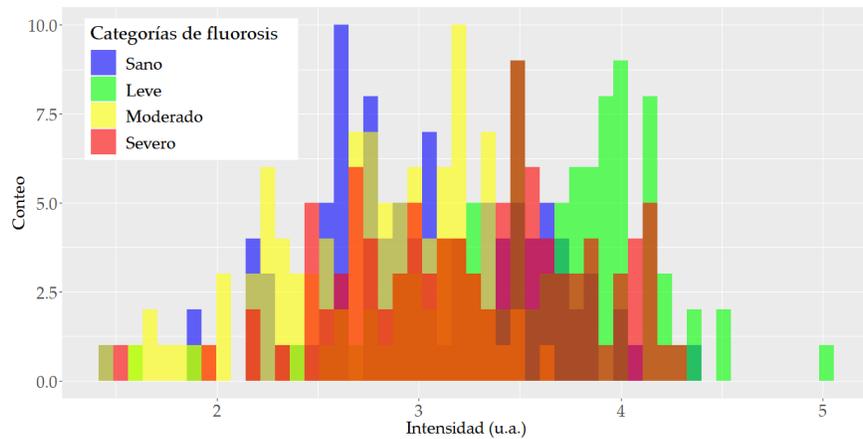


(b) Histogramas para las alturas de la banda, según estado de fluorosis

Figura 5.4: Variación y traslape de la altura de la banda 446 cm^{-1} en los espectros Raman, según estado de fluorosis del diente.

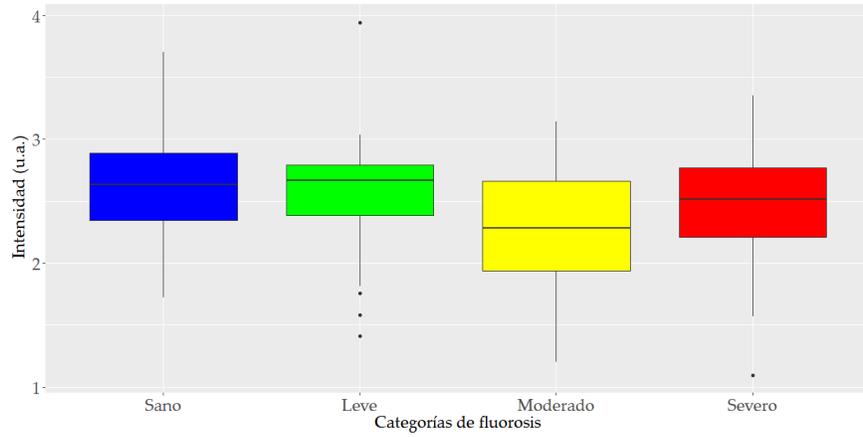


(a) Mediana y distribución en cuartiles de las alturas de la banda, según estado de fluorosis

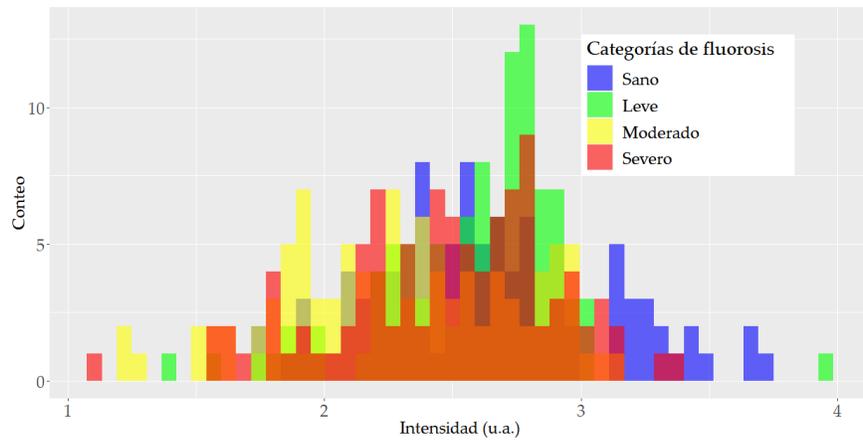


(b) Histogramas para las alturas de la banda, según estado de fluorosis

Figura 5.5: Variación y traslape de la altura de la banda 1025 cm^{-1} en los espectros Raman, según estado de fluorosis del diente.

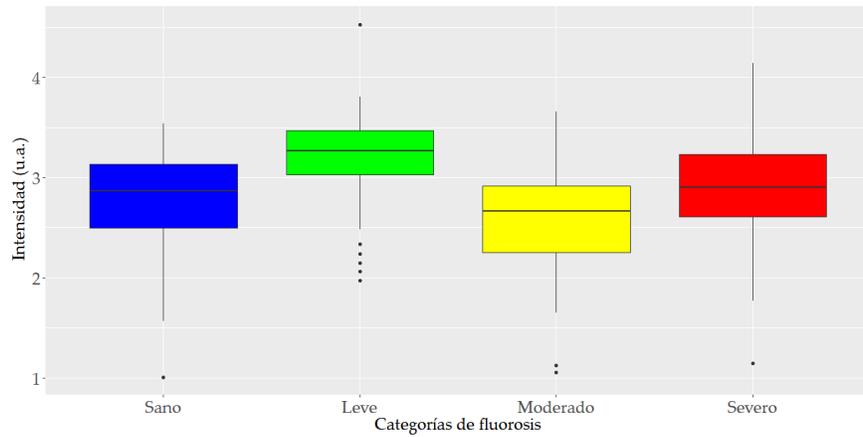


(a) Mediana y distribución en cuartiles de las alturas de la banda, según estado de fluorosis

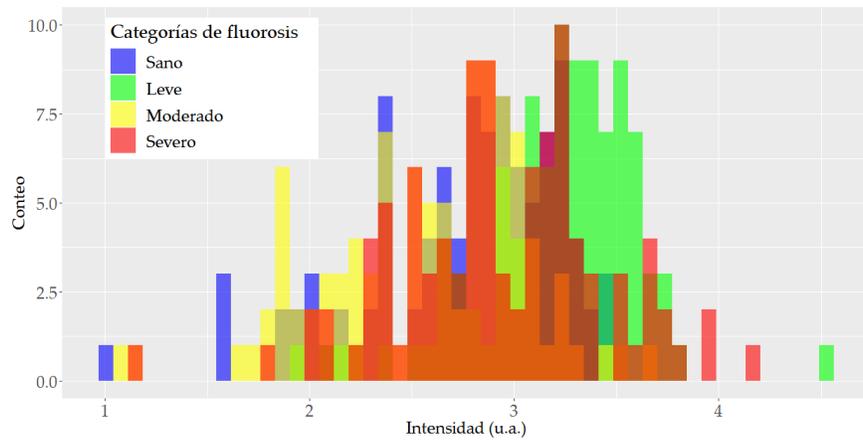


(b) Histogramas para las alturas de la banda, según estado de fluorosis

Figura 5.6: Variación y traslape de la altura de la banda 1044 cm^{-1} en los espectros Raman, según estado de fluorosis del diente.

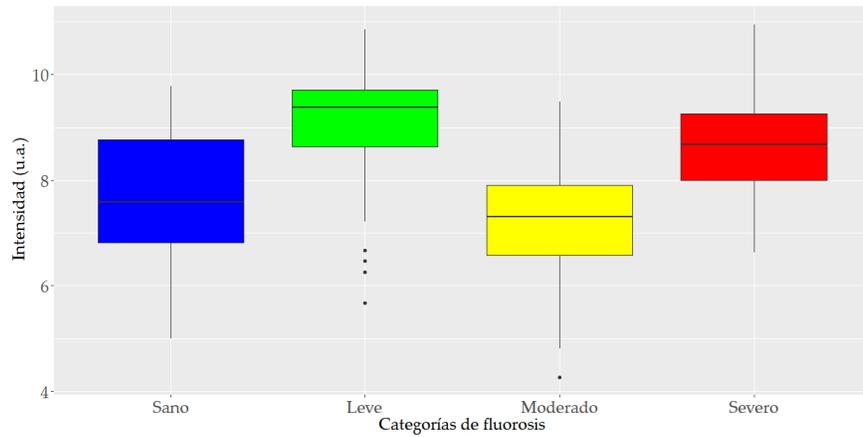


(a) Mediana y distribución en cuartiles de las alturas de la banda, según estado de fluorosis

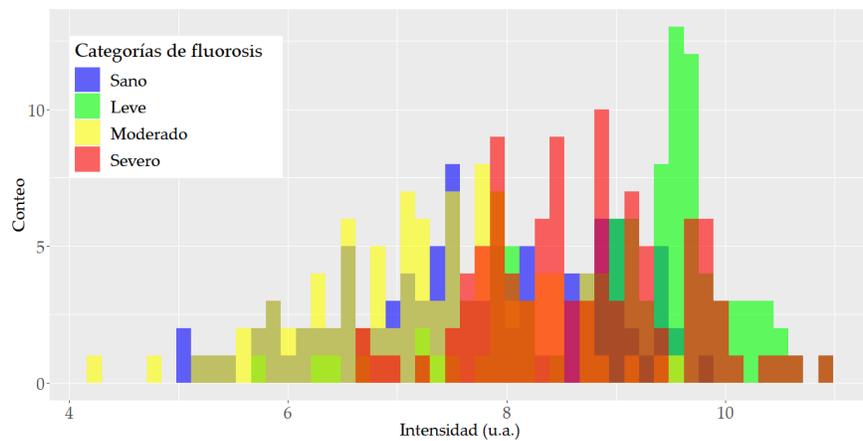


(b) Histogramas para las alturas de la banda, según estado de fluorosis

Figura 5.7: Variación y traslape de la altura de la banda 1053 cm^{-1} en los espectros Raman, según estado de fluorosis del diente.

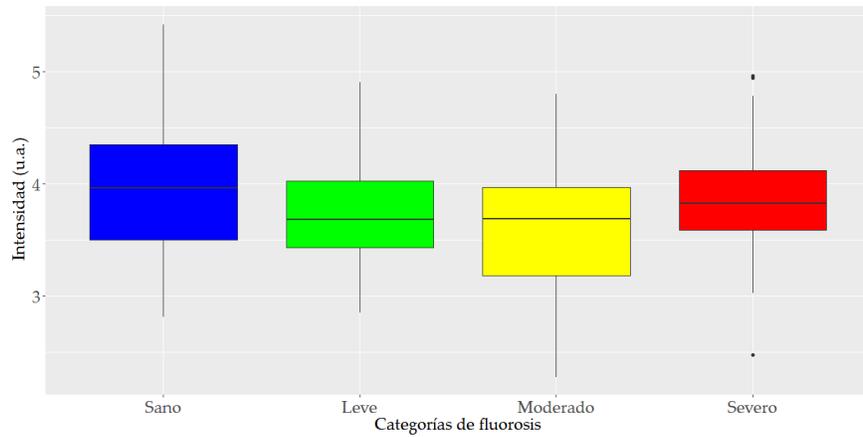


(a) Mediana y distribución en cuartiles de las alturas de la banda, según estado de fluorosis

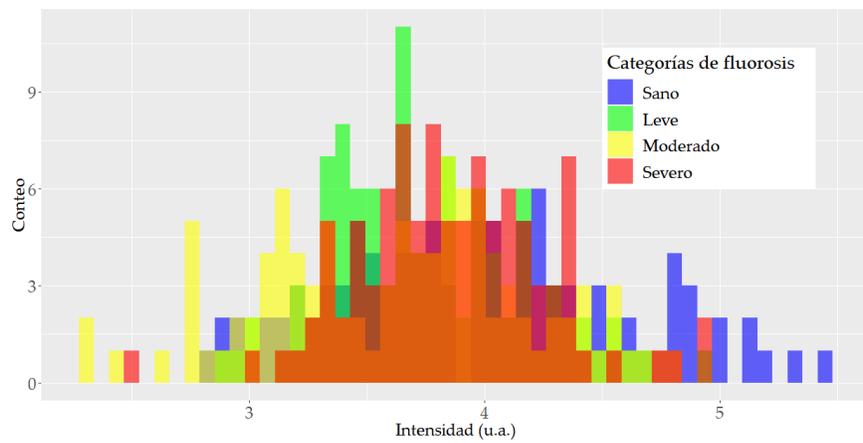


(b) Histogramas para las alturas de la banda, según estado de fluorosis

Figura 5.8: Variación y traslape de la altura de la banda 579 cm^{-1} en los espectros Raman, según estado de fluorosis del diente.

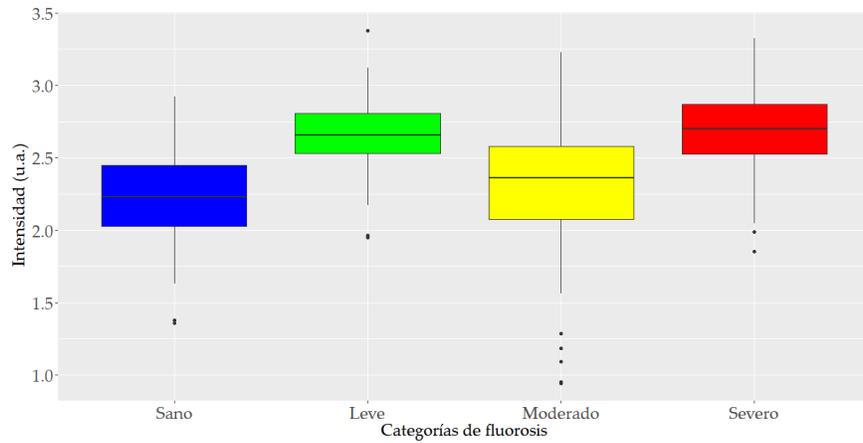


(a) Mediana y distribución en cuartiles de las alturas de la banda, según estado de fluorosis

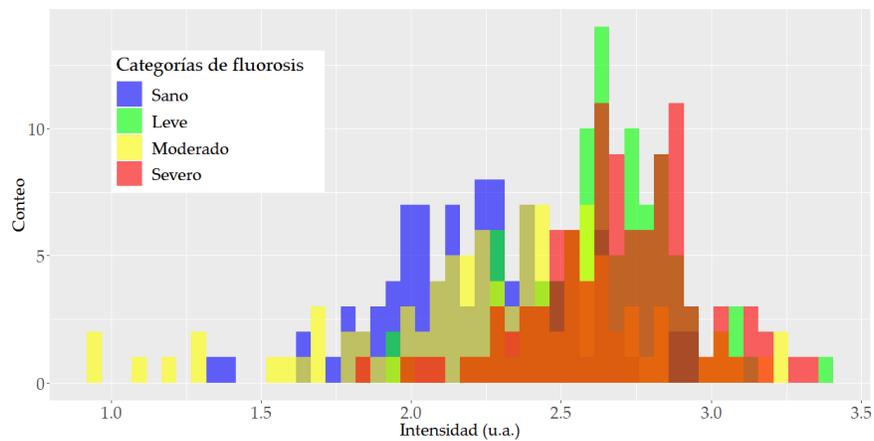


(b) Histogramas para las alturas de la banda, según estado de fluorosis

Figura 5.9: Variación y traslape de la altura de la banda 590 cm^{-1} en los espectros Raman, según estado de fluorosis del diente.

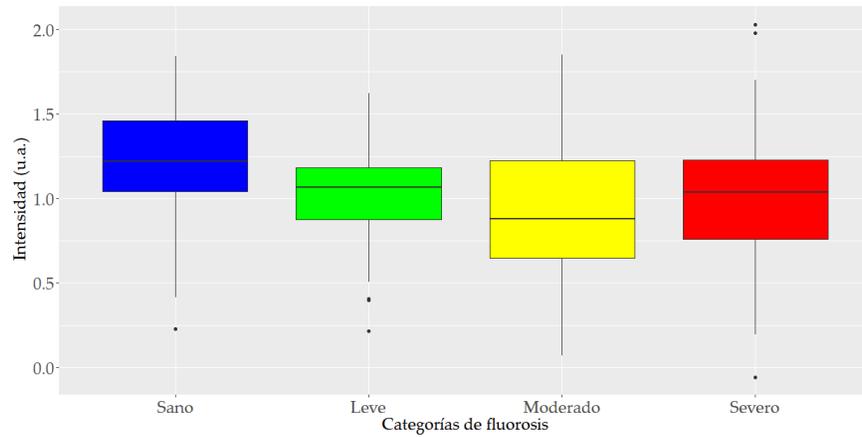


(a) Mediana y distribución en cuartiles de las alturas de la banda, según estado de fluorosis

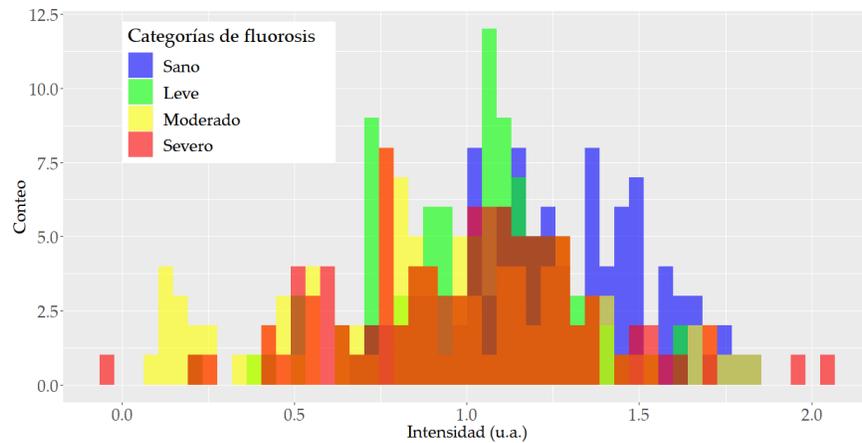


(b) Histogramas para las alturas de la banda, según estado de fluorosis

Figura 5.10: Variación y traslape de la altura de la banda 615 cm^{-1} en los espectros Raman, según estado de fluorosis del diente.



(a) Mediana y distribución en cuartiles de las alturas de la banda, según estado de fluorosis



(b) Histogramas para las alturas de la banda, según estado de fluorosis

Figura 5.11: Variación y traslape de la altura de la banda 1071 cm^{-1} en los espectros Raman, según estado de fluorosis del diente.

3. Analisis de Componentes Principales (PCA) de los espectros Raman

En este estudio, el rango espectral considerado fue de 250 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} , con intensidades registradas cada cm^{-1} . Con base en esto, para la realización del Análisis de Componentes Principales (PCA), cada espectro quedó representado como un punto en el espacio vectorial \mathbb{R}^{951} , conformándose así una nube de 400 puntos.

El PCA llevado a cabo sobre esta nube multidimensional de puntos construyó 400 vectores propios, con sus respectivos valores propios. La varianza explicada por los tres primeros componentes principales fue de 77.49%.

En la Figura 5.12, haciendo uso de los valores (scores) generados por el PCA, se muestra la dispersión de los puntos en el espacio 3D-PCA construido. Puede observarse que los puntos correspondientes a espectros de un mismo grupo de fluorosis tienden a agruparse en cúmulos definidos, manteniendo regiones de contacto entre ellos. Los puntos correspondientes a espectros Raman provenientes de dientes sanos están ubicados en la región más negativa determinada por el primer componente principal (PC1). El grupo de puntos correspondiente a espectros Raman provenientes de dientes con fluorosis leve están ubicados, una parte de ellos, en la región negativa del PC1, pero sin tomar valores tan extremos como en el caso de los dientes sanos, y otra parte logra tomar valores positivos en esta dirección del espacio. Los puntos correspondientes a espectros Raman provenientes de dientes con fluorosis moderada y severa quedan ubicados en la región positiva determinada por el PC1.

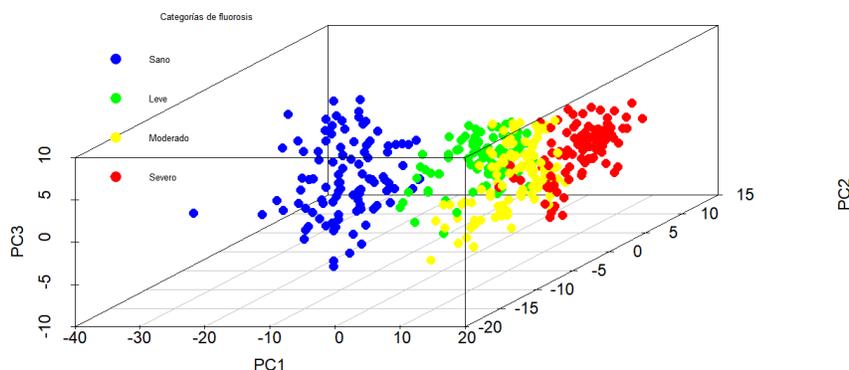


Figura 5.12: Dispersión de puntos en el espacio 3D-PCA, según categoría de fluorosis, formado por los primeros tres componentes principales, PC1, PC2 y PC3, respectivamente (400 puntos, 100 en cada categoría de fluorosis).

En Figura 5.13 se muestra la proyección de los puntos en los planos formados por los componentes principales considerados. En esta figura puede observarse que la contribución para

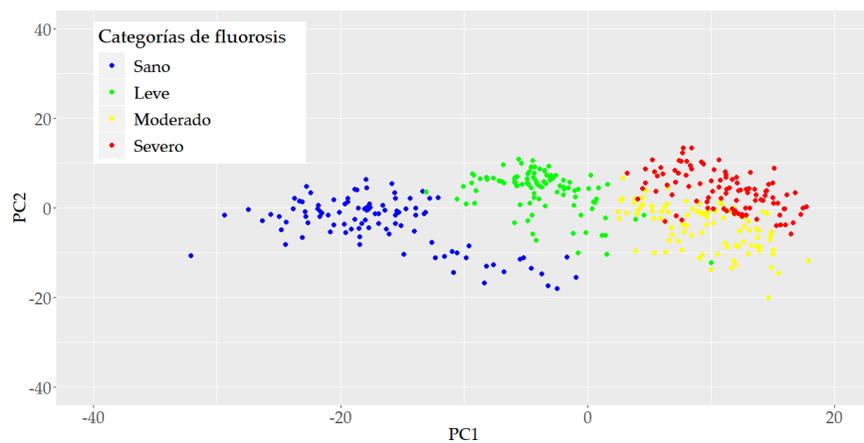
la separación de los puntos en el espacio 3D-PCA del segundo y tercer componente principal, PC2 y PC3, respectivamente, es menor que la participación del primer componente principal PC1. Sin embargo, es interesante notar que considerados en pares, el componente PC2, con apoyo de PC1, ayuda a diferenciar una parte del grupo de dientes con fluorosis leve que pudieran confundirse con dientes sanos, o viceversa, lo cual no se logra si sólo se considerara la dimensión PC1. Adicionalmente, y no menos importante, PC2, también con apoyo de PC1, ayuda a diferenciar dientes del grupo con fluorosis severa de dientes pertenecientes al grupo de fluorosis moderada, o viceversa, lo cual tampoco se lograría si únicamente se considerara la dimensión PC1. Por su parte, PC3, con apoyo de PC2 ayuda a diferenciar un porcentaje de dientes pertenecientes al grupo de fluorosis severa que pudieran confundirse con dientes del grupo de fluorosis leve.

En la Figura 5.14 se muestran las cargas correspondientes a los tres componentes principales seleccionados. Puede observarse en esta figura una clara participación de las bandas correspondientes a los modos vibracionales de los iones $(PO_4)^{3-}$ y $(CO_3)^{2-}$, previamente estudiadas.

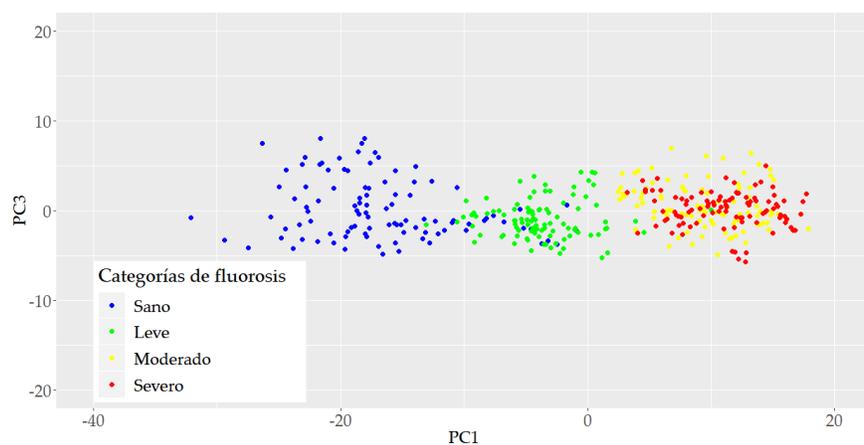
En esta gráfica puede observarse que la banda de 960 cm^{-1} asignada al modo vibracional de elongación simétrico $\nu_1(PO_4)^{3-}$ define de manera preponderante el componente principal PC1; adicionalmente, se observa también que la participación de este modo vibracional en la definición de las otras dos dimensiones es mínima.

En el componente principal PC2 la banda que tiene mayor participación es la ubicada en 579 cm^{-1} , asignada al modo vibracional de deformación $\nu_4(PO_4)^{3-}$; también participa de manera importante la banda ubicada en 446 cm^{-1} , y en menor grado la banda 431 cm^{-1} , ambas asignadas al modo vibracional de deformación $\nu_2(PO_4)^{3-}$; también en menor grado participan las bandas ubicadas en 1025 cm^{-1} y 1053 cm^{-1} , asignadas ambas al modo vibracional de elongación antisimétrico $\nu_3(PO_4)^{3-}$.

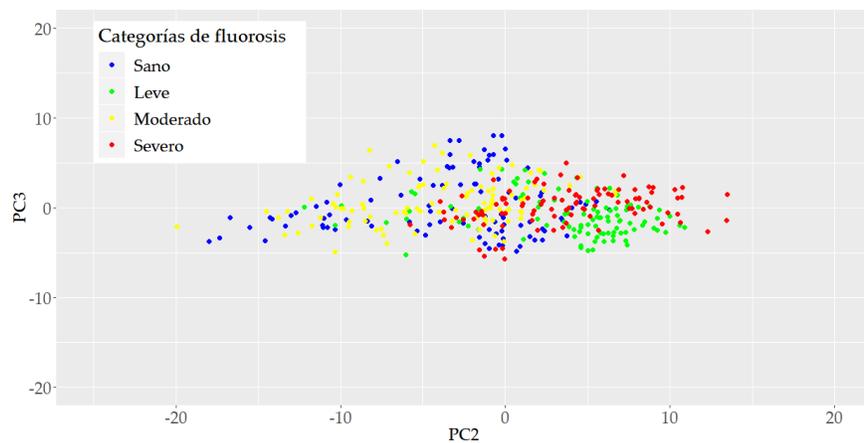
Finalmente, en la definición del componente principal PC3 tiene la mayor participación una de las bandas asignadas al modo de vibración de deformación $\nu_2(PO_4)^{3-}$, la ubicada en 431 cm^{-1} . Dos de las bandas asignadas al modo de vibración de deformación $\nu_4(PO_4)^{3-}$ también están presentes; a saber, las bandas ubicadas en 579 cm^{-1} y 590 cm^{-1} . Obsérvese que la participación de la banda 579 cm^{-1} en este componente principal es en sentido contrario al que tiene en el componente principal PC2, pues presenta distinto signo. Por último, es importante notar que la banda ubicada en 1071 cm^{-1} , asignada al modo vibracional $\nu_1(CO_3)^{2-}$, aunque en menor grado, también participa en la construcción de esta dimensión del espacio PCA.



(a) 400 puntos, 100 en cada categoría de fluorosis

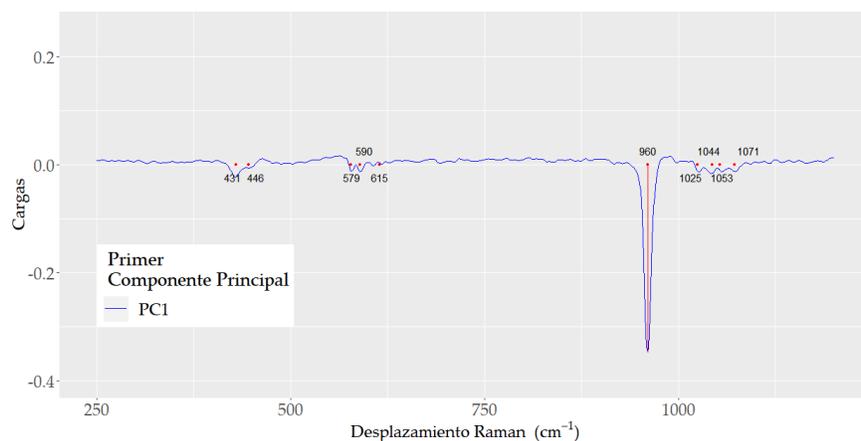


(b) 400 puntos, 100 en cada categoría de fluorosis

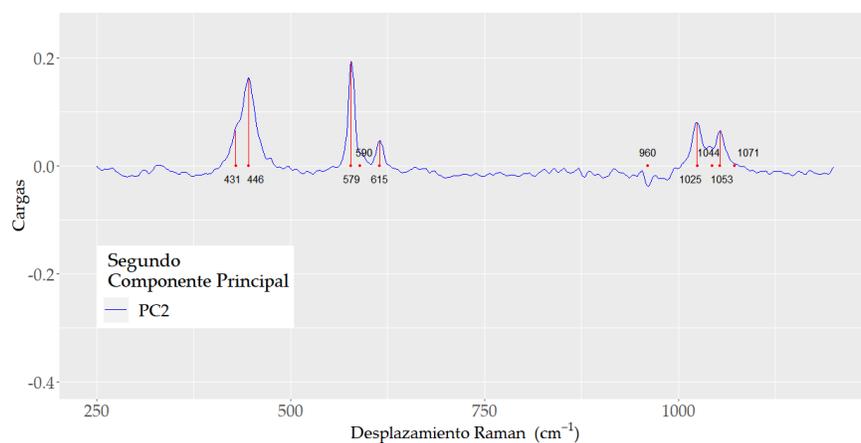


(c) 400 puntos, 100 en cada categoría de fluorosis

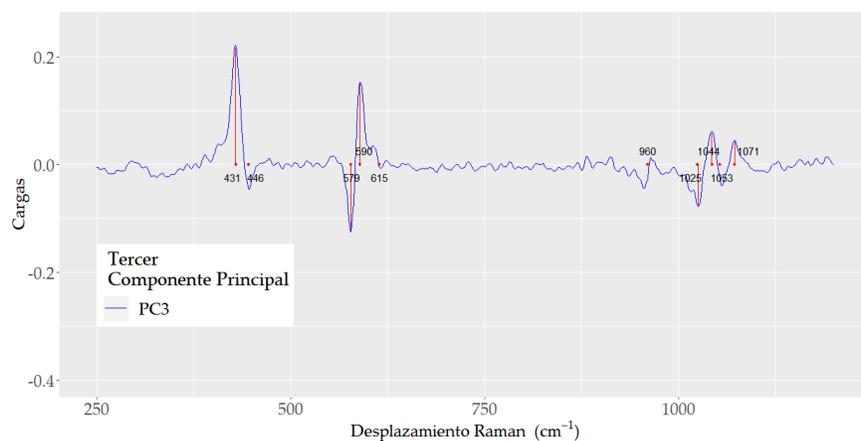
Figura 5.13: Dispersión de puntos en los planos, según categoría de fluorosis, definidos por los primeros tres componentes principales, PC1, PC2 y PC3, respectivamente.



(a) Cargas del primer componente principal (PC1)



(b) Cargas del segundo componente principal (PC2)



(c) Cargas del tercer componente principal (PC3)

Figura 5.14: Cargas correspondientes a los tres componentes principales con más participación en la explicación de la varianza de los datos, obtenidos mediante Análisis de Componentes Principales.

4. Construcción del modelo de clasificación de aprendizaje supervisado para fluorosis dental a partir de Análisis Discriminante Lineal (LDA) en el espacio 3D-PCA

La construcción del modelo de clasificación de aprendizaje supervisado involucró la separación de la información en dos conjuntos de datos ajenos. El primer conjunto fue utilizado como conjunto de entrenamiento (training set) y el segundo como conjunto de prueba (test set). El conjunto de entrenamiento quedó conformado por el 70 % de los espectros Raman y el conjunto de prueba por el 30 %.

Con el fin de fortalecer el proceso de validación del modelo, se llevó a cabo un muestreo aleatorio estratificado sobre el conjunto de dientes, tomando a cada categoría de fluorosis como un estrato. Mediante este procedimiento se aseguró que los espectros Raman correspondientes a un mismo diente quedaran asignados todos sólo a uno de los dos conjuntos formados, ya fuera al conjunto de entrenamiento o al conjunto de prueba. A nivel de cada estrato, la cuota de muestreo para el conjunto de entrenamiento fue de 70 % y para el conjunto de prueba de 30 %. El conjunto de entrenamiento resultante quedó conformado por 280 espectros Raman, en tanto que el conjunto de prueba quedó conformado por 120 espectros Raman.

A partir de los datos (scores) en el espacio 3D-PCA asociados a los 280 espectros Raman seleccionados para el conjunto de entrenamiento, se llevó a cabo la construcción del modelo de clasificación de aprendizaje supervisado, mediante Análisis Discriminante Lineal. Conforme con el diseño de muestra que se llevó a cabo para la formación de los dos conjuntos, el de entrenamiento y el de prueba, la probabilidad previa de pertenecer a alguna de las cuatro categorías de fluorosis y el número de espectros Raman considerados en cada categoría entregado por LDA fue igual para todas las categorías ($p = .25$, Tabla 5.4).

Tabla 5.4: Distribución de los espectros Raman en el conjunto de entrenamiento del modelo

	Grupo sano	Grupo con fluorosis leve	Grupo con fluorosis moderada	Grupo con fluorosis severa	Total
Número de observaciones	70	70	70	70	280
Probabilidad previa*	0.25	0.25	0.25	0.25	
* Calculada sobre valores observados					

En la Tabla 5.5 se muestran los valores promedio en el espacio 3D-PCA obtenidos en el conjunto de entrenamiento, para cada grupo de fluorosis considerado. Puede observarse que en la dirección del primer componente principal (PC1), los promedios de los scores guardan

un orden estricto en relación con la gravedad del estado de fluorosis que presenta el diente; esta situación no se presenta para los otros dos componentes principales.

Tabla 5.5: Valores promedio en el espacio 3D-PCA correspondientes al conjunto de entrenamiento*, según estado de fluorosis

Gupo de fluorosis	PC1 \bar{x}	PC2 \bar{x}	PC3 \bar{x}
Sano	-17.37	-2.78	-0.81
Leve	-2.67	3.14	-0.80
Moderada	9.97	-3.97	0.89
Severa	11.44	3.19	0.20
* Valores observados			

En la Tabla 5.6 se muestran los valores de los coeficientes de las funciones discriminantes lineales que arrojó el procedimiento LDA al ser aplicado sobre el conjunto de entrenamiento. Puede observarse, para el caso de la primera función discriminante, una participación mayor del primer componente principal, esto no sucede en las otras dos funciones discriminantes.

Tabla 5.6: Coeficientes de los discriminantes lineales (Análisis Discriminante Lineal, LDA)

Componentes Principales	LD1	LD2	LD3
PC1	0.2883	0.0091	-0.0222
PC2	0.1326	-0.1887	0.0484
PC3	0.0392	0.1563	0.3824
* LD: Discriminante lineal			

El porcentaje de la varianza entre-clase explicada, considerando únicamente la primera función discriminante, fue de 96.50%. En la Tabla 11 5.7 se muestra la proporción de la varianza explicada por cada uno de los discriminantes.

Tabla 5.7: Proporción de la varianza entre-clase explicada por los discriminantes lineales (Análisis Discriminante Lineal, LDA)

	LD1	LD2	LD3
Proporción de la varianza explicada	.9650	0.0350	0.0001
* LD: Discriminante lineal			

El desempleo del modelo LDA en el conjunto de entrenamiento logró una clasificación acertada en el 93.57% de los casos; el error interno fue 0.0643. En la Tabla 5.8 se muestran los datos provenientes de la Tabla de Confusión correspondiente al LDA, así como las probabilidades de clasificación correcta que el modelo realizó, en el conjunto de entrenamiento, para cada una de las categorías de fluorosis consideradas en este conjunto. Puede observarse que el mejor desempeño del modelo con el conjunto de entrenamiento se logró con los espectros Raman correspondientes al grupo de dientes sanos, mientras que el desempeño menos efectivo en la clasificación de los espectros lo fue con los dientes del grupo de fluorosis moderada ($p = 0.8429$).

Tabla 5.8: Tabla de Confusión en el conjunto de entrenamiento (Análisis Discriminante Lineal, LDA)

Clasificación real	Sano*	Leve*	Moderada*	Severa*	Total	p^{**}
Sano	70	0	0	0	70	1
Leve	0	69	1	0	70	0.9857
Moderada	0	2	59	9	70	0.8429
Severa	0	0	6	64	70	0.9143
Total	70	71	66	73	280	0.9357
* Clasificación predicha en el conjunto de entrenamiento.						
** Probabilidad de clasificación correcta.						

Al trabajar con el conjunto de prueba, con fines de validación del modelo LDA construido, el desempleo del modelo logró una clasificación acertada en el 91.67% de los casos; con un error de prueba de 0.0833 (Tabla 5.9).

En la Tabla 5.9 se muestran las probabilidades de clasificación correcta que el modelo alcanzó, en el conjunto de prueba, para cada una de las categorías de fluorosis consideradas.

Tabla 5.9: Tabla de Confusión en el conjunto de prueba (Análisis Discriminante Lineal, LDA)

Clasificación real	Sano*	Leve*	Moderada*	Severa*	Total	Probabilidad Clasificación Correcta**
Sano	29	1	0	0	30	0.9667
Leve	1	29	0	0	30	0.9667
Moderada	0	1	24	5	30	0.8000
Severa	0	1	1	28	30	0.9333
Total	30	32	25	33	120	0.9167
* Clasificación predicha en el conjunto de prueba.						
** Equivale a la sensibilidad de la prueba ante cada categoría de fluorosis.						

El mejor desempeño del modelo se logró con los espectros Raman correspondientes los grupos de dientes sanos y con fluorosis leve ($p = 0.9667$), mientras que el desempeño menos efectivo en la clasificación de los espectros lo fue con los dientes del grupo de fluorosis moderada ($p = 0.8000$).

En la Tabla 5.10 se muestran los valores correspondientes a la sensibilidad, especificidad y precisión logrados por el modelo LDA al comparar estados de fluorosis específicos, de interés clínico. Puede observarse que la mayor sensibilidad alcanzada por el modelo, 98.9%, es cuando se consideran conjuntamente las categorías de fluorosis severa, moderada y leve, y se les compara con diente sano. Es interesante notar que el modelo logra 100 % de especificidad cuando se consideran en forma agregada las categorías de fluorosis severa y moderada.

Tabla 5.10: Sensibilidad, especificidad y precisión del modelo Análisis Discriminante Lineal (LDA), con base en grupos de categorías de fluorosis

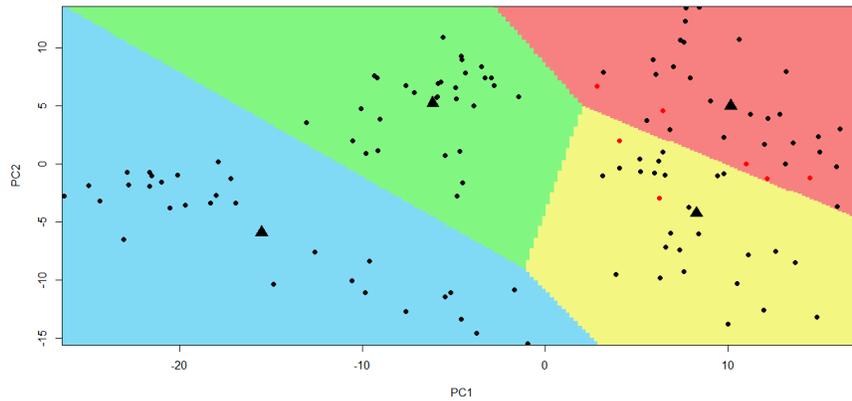
Categorías de fluorosis*	Sensibilidad %	Especificidad %	Precisión %
Severa	93.3	94.4	94.3
Severa + moderada	96.7	100	98.3
Severa + moderada + leve	98.9	96.7	98.3
* Cada conjunto de categorías señalado es comparado contra el complemento de categorías de fluorosis			

En la Figura 5.15 se muestra la gráfica de partición del espacio 3D-PCA, proyectada sobre los planos definidos por los componentes principales. Cada región definida por el modelo LDA, para llevar a cabo la clasificación de los espectros Raman, se presenta en un color diferente. Así, cada región coloreada corresponde al tipo de membresía que será predicha por el modelo LDA. Si el punto correspondiente al espectro Raman considerado cae en la región azul del espacio 3D-PCA, entonces el diente correspondiente es clasificado como diente sano. Lo mismo se hace con los otros casos; esto es, la región verde indica que si el punto cae en esta región entonces el diente será considerado en estado de fluorosis leve; la región en amarillo corresponde a fluorosis moderada y la región en rojo a la fluorosis severa.

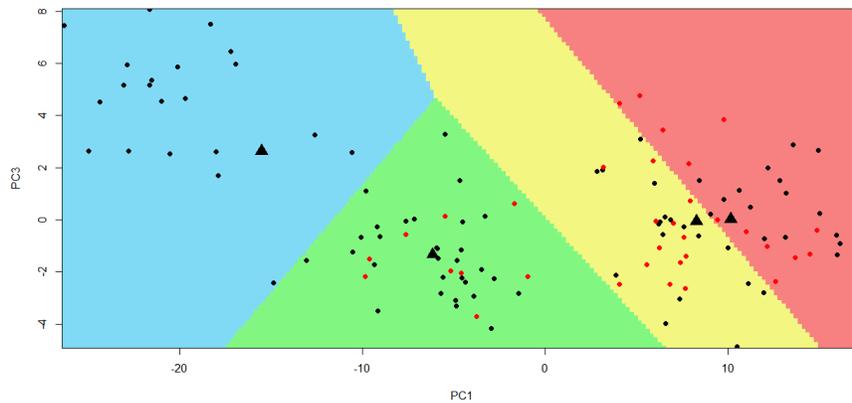
Los puntos negros indican que el espectro Raman fue clasificado por el modelo LDA de manera coincidente con su clasificación original. Los puntos marcados en rojo indican que el espectro Raman fue clasificado de manera diferente a la que originalmente le fue asignada. Las marcas triangulares representan el valor promedio de cada categoría de fluorosis. A pesar de estar observando únicamente la proyección de las regiones de clasificación, puede observarse un mejor desempeño del modelo en la región correspondiente a la membresía de diente sano.

Adicionalmente, en particular, en relación a la banda ubicada 1071 cm^{-1} , asignada al modo vibracional del ion $\nu_1(\text{CO}_3)^{2-}$, se llevó a cabo la comparación del área bajo esta banda

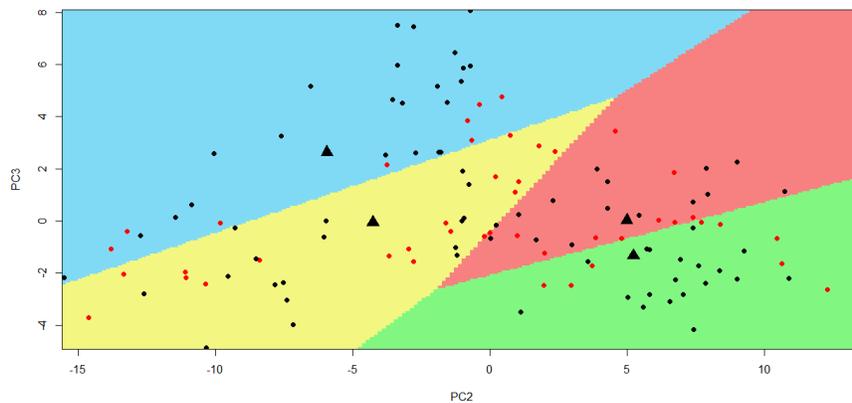
respecto a la comprendida bajo la banda 960 cm^{-1} , asignada al modo vibracional $\nu_1(\text{PO}_4)^{3-}$. La diferencia en la razón de áreas de estas dos bandas resultó ser estadísticamente significativa entre los grupos de fluorosis ($p \leq 0.001$). Esta razón fue mayor conforme se incrementó el nivel de fluorosis que presentó del diente.



(a) Proyección de los puntos en el plano PC1-PC2



(b) Proyección de los puntos en el plano PC1-PC3



(c) Proyección de los puntos en el plano PC2-PC3

Figura 5.15: Gráfica de partición del espacio 3D-PCA indicando las regiones para predecir la membresía de los espectros Raman: región azul indica diente sano, región verde indica diente con fluorosis leve, región amarilla indica diente con fluorosis moderada, región roja indica diente con fluorosis severa. Las marcas triangulares indican los centroides de cada categoría de fluorosis.

5. Resultados del Análisis de Difracción de Rayos X (XRD) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) del esmalte dental

Se obtuvieron los difractogramas de tres dientes, uno en estado sano y dos en los estados de fluorosis moderada y fluorosis severa, respectivamente. En los tres casos el rango del ángulo de difracción 2θ fue de 20° a 70° .

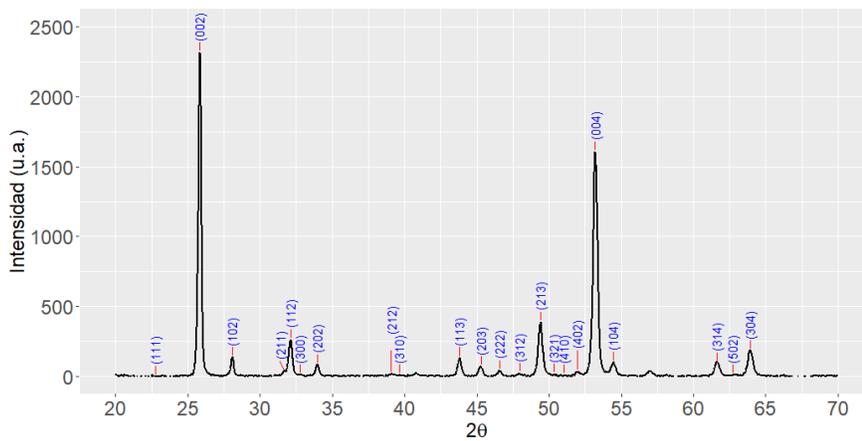
En la Figura 5.16 se muestran los difractogramas de las muestras seleccionadas. Puede observarse que el patrón de intensidades de cada uno de los difractogramas obtenidos es diferente; sin embargo, la distribución de los ángulos de difracción 2θ correspondientes a los picos de difractograma es esencialmente la misma.

Por fines, prácticos para llevar a cabo la comparación de los difractogramas obtenidos con el correspondiente a la hidroxiapatita, según la carta cristalográfica JCPDS: 9-432 (International Centre for Diffraction Data) mostrado en el Capítulo 4, volvemos a incorporarlo en este capítulo como Figura 5.17.

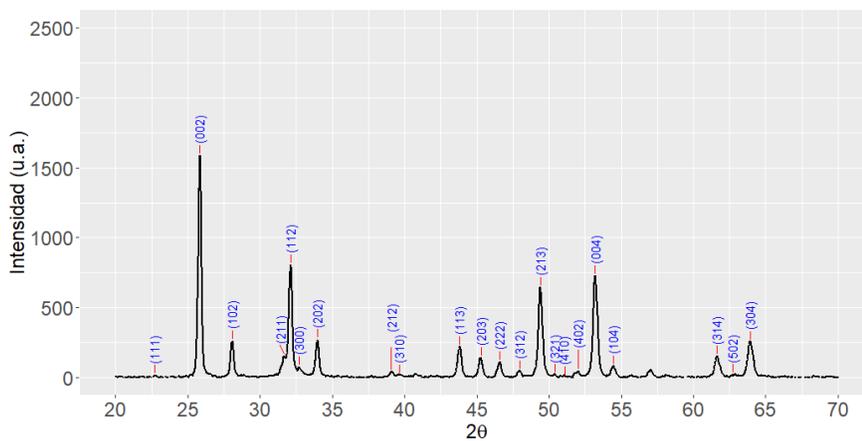
Al llevar a cabo esta comparación, puede observarse la coincidencia existente, en lo relativo a la distribución de la posición los picos, entre lo establecido por dicha carta y lo obtenido en los difractogramas de los dientes.

En relación a las intensidades, la diferencia que se observa entre el difractograma de la hidroxiapatita y los correspondientes al esmalte se debe a que la carta cristalográfica corresponde a polvo de hidroxiapatita; en tanto que para el caso de los dientes, los difractogramas fueron obtenidos a partir de esmalte dental en bulto. Esta diferencia notoria entre el patrón de intensidades obtenido para esmalte en bulto y el obtenido para hidroxiapatita en polvo, o incluso para esmalte en polvo ya ha sido previamente documentada [51, 81].

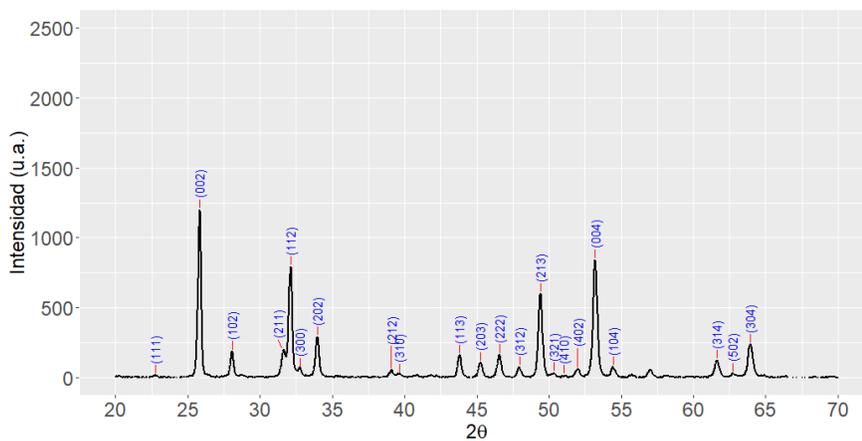
En la Figura 5.16 se ha incorporado la indización de los picos de los difractogramas obtenidos conforme a la carta cristalográfica JCPDS:9-432 [76, 77, 78].



(a) Diente sano



(b) Diente con fluorosis moderada



(c) Diente con fluorosis severa

Figura 5.16: Difractogramas de rayos X de diente sano, con fluorosis moderada y con fluorosis severa. Se muestran los índices de Miller de los planos cristalográficos correspondientes a los picos del difractograma.

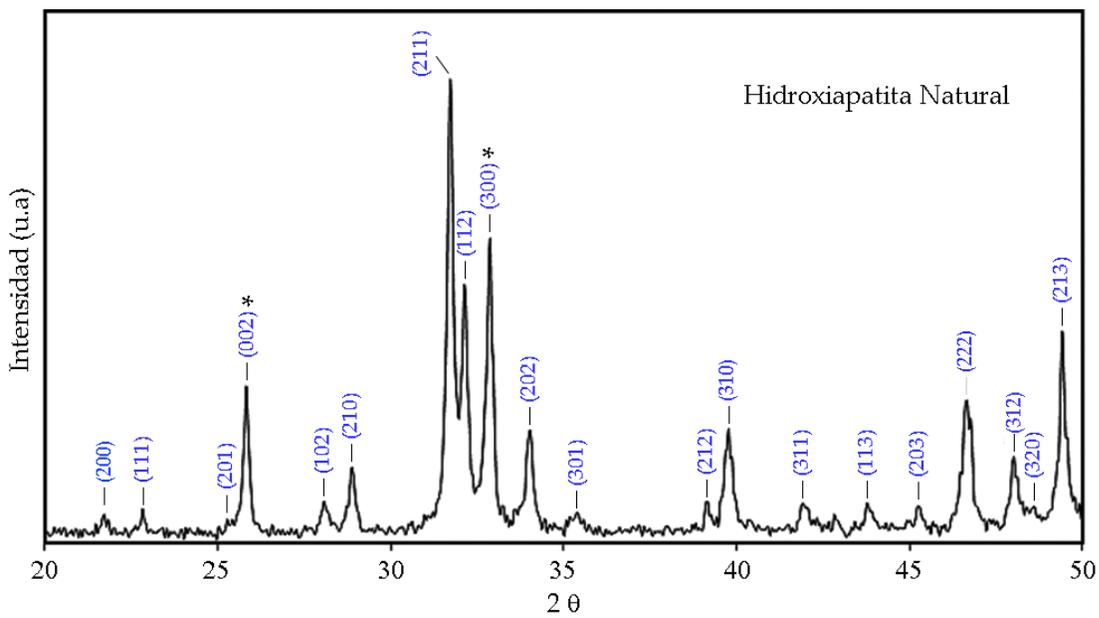


Figura 5.17: Difractograma de rayos X de polvo de hidroxiapatita natural, según carta cristalográfica JCPDS:9-432. Se muestran los índices de Miller de los planos cristalográficos correspondientes a los picos del difractograma (modificado de Pourmollaabbassi *et al.* [78]).

Una primera diferencia que se observa en los difractogramas de los dientes respecto al difractograma de la hidroxiapatita en polvo es que existe una respuesta preferencial de la intensidad de los picos (002), (112), (213) (004). De estos 4 picos, el (002) y el (004) son paralelos entre sí y ortogonales al eje z de la celda unitaria. El patrón de intensidades del grupo de picos ubicados entre los ángulos de difracción (2θ) 30° y 35° también cambia notablemente; particularmente, la intensidad relativa del pico (211) respecto (112), (300) y (202) invierte su relación.

El cálculo de los parámetros de la celda unitaria se realizó mediante la ecuación correspondiente al sistema hexagonal abajo escrita, la cual establece la relación que cumplen los parámetros de celda unitaria, la distancia entre planos adyacentes de una misma familia de planos paralelos y los índices de Miller.

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad (5.1)$$

El cálculo consideró la distancia entre planos adyacentes de la familia (002) y la distancia entre los de la familia (300).

Tabla 5.11: Longitud del eje c de la celda unitaria de hidroxiapatita de esmalte dental, según estado de fluorosis (Análisis de Difracción de Rayos, XRD. Modelo Gaussiano)

Modelo Gaussiano	Plano cristalográfico (Índices de Miller)	Ángulo de difracción 2θ $x_c(^{\circ})$	Error estándar (Å)	Distancia Interplanar $d_{002}(\text{Å})$	Celda unitaria $c(\text{Å})$
Sano	(002)	25.84	6.30E-04	3.45	6.89
Moderado	(002)	25.84	6.19E-04	3.45	6.89
Severo	(002)	25.82	7.58E-04	3.45	6.9

Tabla 5.12: Longitud del eje c de la celda unitaria de hidroxiapatita de esmalte dental, según estado de fluorosis (Análisis de Difracción de Rayos, XRD. Modelo Lorentziano)

Modelo Lorentziano	Plano cristalográfico (Índices de Miller)	Ángulo de difracción 2θ $x_c(^{\circ})$	Error estándar (Å)	Distancia Interplanar $d_{002}(\text{Å})$	Celda unitaria $c(\text{Å})$
Sano	(002)	25.84	0.0012	3.45	6.89
Moderado	(002)	25.84	0.0012	3.45	6.89
Severo	(002)	25.82	0.0012	3.45	6.90

En las Tablas 5.11, 5.12 y 5.13 se muestra el valor de eje c de la celda unitaria de hidroxiapatita de esmalte de diente sano y dientes con fluorosis moderada y severa, obtenido mediante la técnica dispersión de rayos X (XRD). La Tabla 5.11 corresponde al análisis que se realizó ajustando los datos a un modelo Gaussiano; la Tabla 5.12 corresponde al modelo Lorentziano y la Tabla 5.13 corresponde al modelo de ajuste Voigt.

En la Tabla 5.14 se muestra el valor de eje a de la celda unitaria de hidroxiapatita de esmalte de diente sano y dientes con fluorosis moderada y severa, obtenido mediante el mismo procedimiento, usando el plano de difracción (300). Los valores mostrados corresponden al análisis que se realizó ajustando los datos al modelo Gaussiano.

Obsérvese que la diferencia obtenida en el valor de c según se haya realizado el cálculo con el modelo Gaussiano, el Lorentziano o el de Voigt, no va más allá de milésimas de ángstrom.

En la Tabla 5.15 se muestran los valores obtenidos para el volumen de la celda unitaria (prisma hexagonal) de la hidroxiapatita del esmalte, según los valores del eje c calculados a partir de los modelos Gaussiano, Lorentziano y Voigt.

El cálculo para el tamaño del cristalito se llevó a cabo mediante el método de Williamson-Hall descrito en la sección de Método. La ecuación

Tabla 5.13: Longitud del eje c de la celda unitaria de hidroxiapatita de esmalte dental, según estado de fluorosis (Análisis de Difracción de Rayos, XRD. Modelo Voigt)

Modelo Voigt	Plano cristalográfico (Índices de Miller)	Ángulo de difracción 2θ $x_c(^{\circ})$	Error estándar (Å)	Distancia Interplanar $d_{002}(\text{Å})$	Celda unitaria $c(\text{Å})$
Sano	(002)	25.84	4.44E-04	3.45	6.89
Moderado	(002)	25.84	3.77E-04	3.45	6.89
Severo	(002)	25.82	7.01E-04	3.45	6.90

Tabla 5.14: Longitud del eje a de la celda unitaria de hidroxiapatita de esmalte dental, según estado de fluorosis (Análisis de Difracción de Rayos, XRD. Modelo Gaussiano)

Modelo Gaussiano	Plano cristalográfico (Índices de Miller)	Ángulo de difracción 2θ $x_c(^{\circ})$	Error estándar (Å)	Distancia Interplanar $d_{300}(\text{Å})$	Celda unitaria $a(\text{Å})$
Sano	(300)	25.66	7.62E-04	2.74	9.49
Moderado	(300)	25.69	8.84E-04	2.74	9.48
Severo	(300)	25.71	6.06E-04	2.74	9.48

$$\beta_t \cos(\theta) = C \sin(\theta) + \frac{k\lambda}{L} \quad (5.2)$$

fue evaluada en los planos (002) y (004); el tamaño de cristal calculado corresponde, por tanto, al tamaño del cristal en la dirección del eje z de la celda unitaria.

En la Tabla 5.16 se presenta el tamaño del cristalito de la hidroxiapatita del esmalte obtenido mediante la estimación de la ordenada al origen de la recta generada por la ecuación anterior. Los ángulos de difracción de Bragg 2θ considerados corresponden a los ángulos

Tabla 5.15: Volumen de la celda unitaria* de hidroxiapatita de esmalte dental, según estado de fluorosis (Análisis de Difracción de Rayos, XRD)

Diente	Modelo Gaussiano (Å ³)	Modelo Lorentziano (Å ³)	Modelo Voigt (Å ³)
Sano	1612.24	1612.18	1612.29
Moderado	1609.59	1609.54	1609.62
Severo	1609.21	1609.13	1609.29
* Prisma hexagonal			

Tabla 5.16: Tamaño del cristalito de hidroxiapatita de esmalte dental, según estado de fluorosis (Análisis de Difracción de Rayos, XRD)

Diente	Plano cristalográfico (002)		Plano cristalográfico (004)		Tamaño del cristalito
	Ángulo de difracción 2θ $x_c(EE)$ (°)	Ancho de banda a media altura $FWHM(EE)$ (Å)	Ángulo de difracción 2θ $x_c(EE)$ (°)	Ancho de banda a media altura $FWHM(EE)$ (Å)	Tamaño del cristalito L (nm)
Sano	25.84(6.30E-4)	0.25	53.21(9.79E-4)	0.35	45.76
Moderado	25.84(6.19E-4)	0.26	53.21(0.0011)	0.35	40.12
Severo	25.82(7.58E-4)	0.25	53.20(1.02E-3)	0.33	39.34
* $x_c(EE)$: centro del pico(error estándar)					
** $FWHM(EE)$: Full Width at Half Maximun(error estándar)					

determinados por el modelo Gaussiano, para los dos planos y para los tres difractogramas.

Se observa una tendencia decreciente en el tamaño del cristalito conforme se pasa de diente sano a diente con fluorosis; esta situación no fue observada en el comportamiento de los parámetros de la celda unitaria a y c . En este caso la diferencia en el tamaño del cristal entre diente sano y diente con fluorosis severa llega a ser ligeramente mayor a 6 nm.

En relación al estudio de la morfología del esmalte de un diente con fluorosis, en la Figura 5.18 se muestran tres microradiografías que fueron obtenidas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), correspondientes al diente con fluorosis severa.

En la microradiografía de la Figura 5.18a puede observarse un grupo de prismas de hidroxiapatita fracturados, con pérdida del esmalte de la capa superficial. Se observa un arreglo columnar disminuido y presencia de espacios interprismáticos incrementada, junto con la presencia de microporos o fositas (pits) de diverso tamaño.

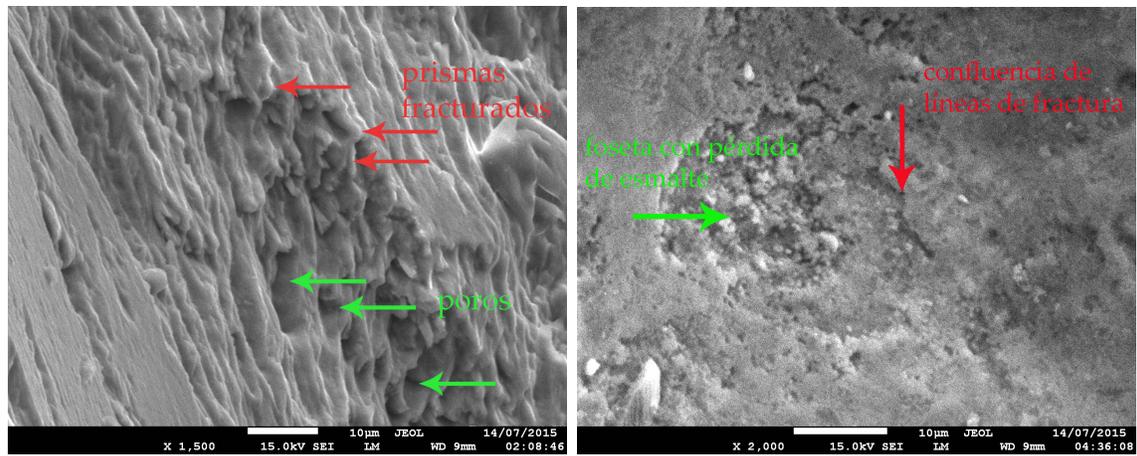
En la micrografía de la Figura 5.18b se observa la foseta creada por la pérdida de esmalte; se observa también la confluencia de las líneas de fractura junto con las lagunas de pérdida de esmalte.

En la micrografía de la Figura 5.18c se observa una fractura del esmalte. La capa superficial del esmalte se ha perdido y las capas sub-superficiales presentan poros. En esta micrografía se observa la pérdida de material mineralizado en la estructura de soporte de la capa superficial del esmalte.

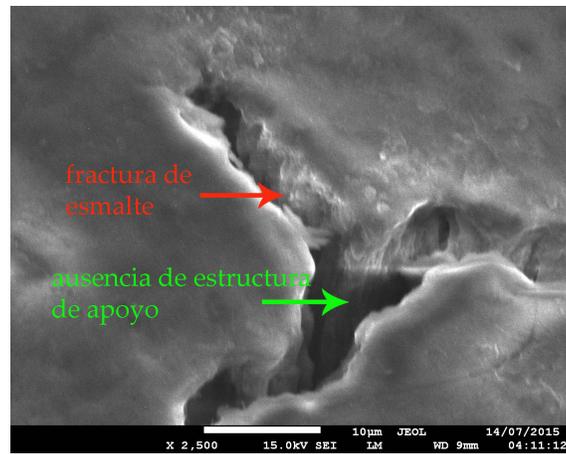
En la Tabla 5.17 se muestran los resultados sobre la composición química obtenidos a partir del estudio mediante SEM/EDS. Los valores que aparecen en la tabla corresponden al

valor promedio obtenido a partir de 5 mediciones. Adicional a los átomos de calcio, fósforo y oxígeno presentes en la estructura atómica del esmalte, se registró la presencia de átomos de carbono, flúor, sodio, magnesio, aluminio, sílicio, cloro, potasio y níquel. El valor estimado para la razón Ca/P (en %Atom) fue de 1.28.

Adicionalmente, cabe señalar, en relación a los valores de la concentración de flúor, que los valores obtenidos tienen la limitación de que presentaron un coeficiente de variación (CV) demasiado grande en cada una de las mediciones realizadas.



(a) Prismas fracturados y presencia de microporos (b) Confluencia de líneas de fractura y foseta con pérdida de esmalte



(c) Fractura de esmalte dental

Figura 5.18: Análisis mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Micrografías de esmalte dental con fluorosis severa.

Tabla 5.17: Composición química de esmalte dental con fluorosis (Microscopía Electrónica de Barrido, SEM/EDS)

Átomo	P %	%Atom
C	13.69	21.54
O	49.58	58.58
F	0.27	0.27
Na	0.84	0.69
Mg	0.21	0.17
Al	1.69	1.18
Si	0.04	0.03
P	12.34	7.54
Cl	0.34	0.18
K	0.04	0.02
Ca	20.53	9.69
Ni	0.45	0.15
Ca/P*	1.66	1.28
* Valor promedio Ca/P.		

Capítulo 6

Discusión

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar la fluorosis del esmalte dental mediante espectroscopía Raman y técnicas complementarias. El estudio consistió en obtener espectros Raman adquiridos a partir de dientes que presentaran fluorosis en distintos niveles de gravedad y llevar a cabo el análisis comparativo correspondiente. En este proceso, se recurrió al uso de dos técnicas adicionales, Difracción de Rayos X (RDX) y Espectroscopía Electrónica de Barrido (SEM/EDS).

La muestra utilizada en esta tesis quedó constituida por 40 dientes, pertenecientes a diversas categorías de fluorosis dental, cuatro en total, incluida la categoría de dientes sanos, según fueron clasificados mediante criterio clínico como está especificado en el Capítulo de Método de este trabajo; en cada categoría fueron incluidos 10 dientes.

A fin de trabajar con los 400 espectros Raman adquiridos y proceder a un análisis comparativo de los mismos, todos los espectros fueron previamente pre-procesados, eliminando elementos de ruido, diferencias causadas por la señal de fondo y diferencias de escala, como quedó establecido en el Capítulo 4.

Una vez conformado el conjunto de espectros estandarizados se observó, como primera característica, que en todos ellos el pico ubicado en la banda 960 cm^{-1} de desplazamiento Raman, característico de la hidroxiapatita y asignado al modo vibracional de elongación simétrico $\nu_1(PO_4)^{3-}$, fue el que presentó mayor intensidad alta.

Una segunda característica observada en todos los espectros fue la presencia, en mayor o menor intensidad, de las bandas Raman correspondientes a los modos vibracionales de la hidroxiapatita asignados a $\nu_2(PO_4)^{3-}$, $\nu_3(PO_4)^{3-}$ y $\nu_4(PO_4)^{3-}$.

A fin de llevar a cabo el análisis de los espectros correspondientes a las distintas categorías de fluorosis, se procedió a realizar pruebas estadísticas sobre las intensidades de los espectros Raman en bandas específicas. Para ello, se obtuvo el espectro promedio de cada uno de los grupos de fluorosis considerados. En los espectros promedio fue posible observar no sólo que la mayor intensidad alta se presentó en la banda 960 cm^{-1} ; se observó también que esta intensidad alta tiene un comportamiento inversamente proporcional con la gravedad de la

fluorosis del diente; a mayor daño por fluorosis menor la intensidad altura de la banda 960 cm^{-1} de desplazamiento Raman. Mediante la prueba estadística ANOVA pudo constatar que la diferencia entre los valores promedio que toma la altura de esta banda según el grupo de fluorosis al que se pertenezca es estadísticamente significativa

Este hecho concuerda con lo encontrado en el estudio realizado por Gonzalez-Solís *et al.* [62]. Los investigadores realizaron la adquisición de los espectros Raman con un espectrómetro Jobin-Yvon LabRAM HR800, con una línea laser de excitación de 830 nm de longitud de onda, a 17 mW de potencia; el tiempo de exposición de los dientes al haz para la obtención de los espectros se ubicó en el rango de 20 a 40 segundos. La muestra de dientes que estos investigadores utilizaron en su estudio quedó integrada por 9 dientes pertenecientes al grupo de fluorosis leve, 10 pertenecientes al grupo de fluorosis moderada, 11 en la categoría de fluorosis severa y un grupo de referencia de 9 dientes sanos. Con base en la relación inversa encontrada entre altura de la banda 960 cm^{-1} y gravedad de la fluorosis, Gonzalez-Solís *et al.* sugieren que esta banda puede tener un valor metodológico importante en la caracterización cuantitativa de la fluorosis dental.

Los resultados del presente estudio muestran que la banda 960 cm^{-1} puede discriminar dientes sanos o con fluorosis leve de dientes con fluorosis moderada o severa. Sin embargo, debido al fuerte traslape que se observa en las alturas de esta banda entre los grupos de fluorosis moderada y fluorosis severa, el uso exclusivo de esta banda como criterio de clasificación es insuficiente; en las dos categorías de fluorosis más alta esta banda no logra una buena discriminación.

Buchwald *et al.* [82] señalan que es importante considerar que la intensidad de las bandas Raman no sólo es producto de la composición química y estructura de los cristales en el esmalte, sino que también interviene la orientación específica de los cristales de hidroxiapatita respecto al haz de excitación incidente, el ángulo en el que es observada la luz dispersada, e incluso la polarización de estos haces. Con base en lo anterior, los autores señalan que la clasificación de fluorosis basada únicamente en la información de la banda 960 cm^{-1} puede producir resultados ambiguos.

El presente estudio se observó que la razón de intensidades área $1071/960\text{ cm}^{-1}$ (razón carbonato/fosfato) se incrementa significativamente conforme la gravedad de fluorosis aumenta, indicando con ello que la sustitución tipo-B carbonato se presenta con mayor frecuencia en las categorías más elevadas de fluorosis. Este hecho concuerda con lo reportado por Fraser SJ *et al.* [83] respecto a la relación que guarda esta razón de intensidades área con zonas del esmalte sano y zonas de esmalte que presentan hipomineralización. Fraser SJ *et al.* obtuvieron espectros Raman a partir de dientes que presentaban hipomineralización; para ello utilizaron un microscopio Raman (Bruker Optics), equipado con láseres de 532 nm y 785 nm en longitud de onda; la potencia de láser utilizada para la adquisición de los espectros Raman fue de 50 mW . Las bandas integral utilizadas por los investigadores abarcaron el rango espectral de $930-985\text{ cm}^{-1}$ para la banda 960 cm^{-1} , representativa del ion $(PO_4)^{3-}$, y el rango $1057-1087\text{ cm}^{-1}$ para la banda correspondiente al ion $\nu_1(CO_3)^{2-}$. Fraser SJ *et al.* encontraron que en las regiones del esmalte con hipomineralización la razón intensidades

integral 1070/960 cm^{-1} es mayor que la que se presenta en las regiones de esmalte sano.

En un estudio previo, haciendo uso de espectroscopía Raman, Xu C *et al.* [84] encontraron una asociación significativa entre el contenido de carbonatos, la cristalinidad y las propiedades mecánicas de la apatita, tales como el módulo Young y dureza. Para la adquisición de los espectros Raman los investigadores utilizaron un espectrómetro LabRaman HR 800 (Horiba Jobin Yvon) equipado con un láser He-Ne de 632.8 nm de longitud de onda; la potencia de la línea de excitación utilizada fue de 20 mW. El tiempo de integración para la adquisición de los espectros fue de 60 s. En el experimento fueron muestreados puntos del esmalte dental ubicados a diversa profundidad de la superficie. En este estudio se encontró asociación entre los niveles de carbonato y las propiedades mecánicas del esmalte. El contenido de carbonato fue estimado a partir del cociente de intensidad (altura) de las bandas 1070/960 cm^{-1} . Conforme el contenido de carbonato aumentó el módulo de Young disminuyó, así como la dureza. Adicionalmente, con base en el cambio en el ancho de banda a media altura (FWHM) del pico en 960 cm^{-1} , los autores demostraron que, en las zonas de alto contenido de carbonato, el ancho de banda crece, indicando que el grado de cristalinidad del esmalte decrece.

En esta dirección, a través de un modelo murino, Gong B *et al.* [85] encontraron que las propiedades biomecánicas de hueso irradiado son diferentes a las de hueso sano; el hueso irradiado es más frágil y tiene mayor riesgo de fractura que el hueso sano. Mediante el uso de espectroscopía Raman, los autores encontraron que la razón carbonato/fosfato se incrementa en el hueso irradiado cuando se le compara con hueso no irradiado; en tanto que la cristalinidad disminuye. Se sabe que en el caso del diente las propiedades biomecánicas tienen fuerte implicación en las opciones de materiales y tratamientos a ser utilizados para la restauración de una pieza dental, la efectividad y longevidad de éstas dependerá de lo acertado de la opción seleccionada respecto a las propiedades biomecánicas que presenta el diente.

Para avanzar en la caracterización del nivel de fluorosis presente en las piezas dentales de la muestra, fue elaborado un modelo de clasificación supervisado basado en los espectros Raman que fueron adquiridos. Para ello, se procedió primero a obtener un espacio de trabajo definido mediante un Análisis de Componentes Principales.

La construcción del modelo, en el espacio así definido, se llevó a cabo bajo la perspectiva de los enfoques del Aprendizaje Automático (Machine Learning) de Inteligencia Artificial. El modelo construido, con base en un Análisis Discriminante Lineal, es un modelo de clasificación supervisado que permite predecir la membresía de dientes con fluorosis dental, diferentes de los que fueron considerados para la construcción del mismo; esto es, el modelo predice la categoría de fluorosis a la que pertenecen nuevos dientes que no han sido vistos previamente por el modelo en ninguna de sus etapas de construcción.

Para lograr lo anterior, después de haber realizado el análisis de todos los espectros y haber estudiado el comportamiento de las bandas de frecuencia Raman correspondientes a modos vibracionales característicos de la hidroxiapatita del esmalte, y contando con los puntajes (scores) de los componentes principales, el conjunto de datos original fue dividido en dos subconjuntos ajenos, mediante muestreo aleatorio estratificado de los dientes. El primer

subconjunto de espectros fue utilizado como conjunto para construir el modelo; esto es, sirvió como conjunto de entrenamiento del modelo. El segundo conjunto de espectros fue utilizado para llevar a cabo la validación del modelo; esto es, sirvió como conjunto prueba.

El procedimiento fue el siguiente. Cada espectro Raman fue representado como un punto en un espacio multidimensional, \mathbb{R}^{951} , cuya dimensión quedó definida por el número de bandas consideradas en el rango espectral de estudio. Sobre esta base, la construcción del modelo de clasificación se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se hizo uso de la técnica multivariada de Análisis de Componentes Principales (PCA); este análisis permitió conformar el espacio PCA de scores, a partir del cual fue retenido un subespacio de dimensión 3 (3D-PCA).

Este estudio mostró que, en el espacio tridimensional 3D-PCA formado por los componentes principales, los puntos mediante los cuales se representan a los espectros, formaron cúmulos de acuerdo al grupo de fluorosis al que pertenecen. La cercanía de los puntos en el espacio 3D-PCA es un indicador de la semejanza de los espectros que representan; así, puntos cercanos en el espacio sugieren que las muestras de las cuales provienen los espectros tienen similar estructura y composición química [83]

Globalmente, por tanto, la dispersión de la nube de puntos en el espacio 3D-PCA resulta ser un buen indicador sobre las semejanzas o diferencias que presentan los dientes pertenecientes a distintas categorías de fluorosis; semejanzas o diferencias, ya sea en estructura o en composición química, que son detectadas por los espectros Raman.

En nuestro caso la varianza total explicada por los primeros tres componentes principales fue de 77.49 %. En el trabajo citado de Fraser SJ *et al.* [83], la varianza explicada por los tres primeros componentes principales fue 93 %. La comparación de estas varianzas explicadas por los componentes principales no es inmediata, pues en el trabajo de Fraser SJ *et al.*, aunque construyen un espacio PCA basado en los espectros Raman, lo hacen sobre muestras dentales que presentan lesiones hipomineralizadas, no con dientes con fluorosis. Adicionalmente, es necesario considerar que en nuestro caso el espacio multidimensional en que se encuentran originalmente los puntos que representan a los espectros Raman es \mathbb{R}^{951} , debido a que trabajamos en el rango espectral de 250 a 1200 cm^{-1} , con información del espectro Raman cm^{-1} a cm^{-1} . En el caso del trabajo de Fraser SJ *et al.* los investigadores trabajaron en el rango espectral de 300 a 1800 cm^{-1} . En relación al trabajo de Gonzalez-Solís *et al.* [62], ellos trabajaron con piezas dentales con fluorosis, en el rango espectral de 200 a 1800 cm^{-1} y no reportan la varianza explicada por los componentes principales. En el trabajo de Zavala-Alonso *et al.* [86]. los investigadores aplicaron la espectroscopía Raman para estudiar dientes con fluorosis, pero no desarrollan PCA.

En este trabajo, el PC1 obtenido permitió distribuir los cúmulos en el espacio 3D-PCA. Los dientes sanos fueron ubicados hacia la región negativa en esta dimensión del espacio, en tanto que los dientes pertenecientes a la categoría de fluorosis severa fueron ubicados en el extremo contrario. Los dientes con fluorosis leve se ubicaron a medio camino entre los extremos establecidos por los dientes sanos y los dientes con fluorosis severa. Esta distribución de

los puntos indica que la estructura o la composición química del esmalte con fluorosis leve no es igual a la de un diente sano, y tampoco es igual a la de un diente con fluorosis moderada o severa.

En nuestro análisis, el PC1 juega un papel fundamental en la distribución de los puntos en el espacio, lo cual ayuda a la discriminación de los mismos. Sin embargo, el PC1 por sí sólo no logró diferenciar la fluorosis moderada de la fluorosis severa. Adicionalmente, una fracción de dientes sanos no puede ser diferenciada de los dientes con fluorosis leve si sólo se considera el PC1.

En relación a las cargas de los componentes principales obtenidas en este trabajo, es notorio el patrón de cargas de los tres componentes principales. El modo vibracional $\nu_1(PO_4)^{3-}$ tuvo una participación preponderante en la definición del primer componente principal; adicionalmente, la participación de este modo vibracional en los otros dos componentes principales es prácticamente nula. El patrón de cargas obtenido para PC1 en este trabajo no es observado en el patrón de cargas reportado por Gonzalez-Solís *et al.* [62].

La participación adicional del PC2 contribuye a que el PC1 y PC2, tomados conjuntamente, logren discriminar la fracción de dientes sanos del grupo de dientes con fluorosis leve, discriminación que PC1 por sí sólo no pudo lograr.

Es importante señalar, en relación a las cargas que definen a PC2, la participación destacada que tienen una de las bandas correspondiente al modo vibracional $\nu_4(PO_4)^{3-}$ y las dos bandas correspondientes al modo vibracional $\nu_2(PO_4)^{3-}$. Esto significa que estos dos modos vibracionales logran captar información adicional sobre características, ya sea de estructura o ya sea de composición química, que no logra captar $\nu_1(PO_4)^{3-}$; mismas que permiten que PC1 y PC2 conjuntamente logren diferenciar a esa fracción de dientes sanos de los dientes con fluorosis leve.

En resumen, los resultados obtenidos a partir del PCA, muestran la posibilidad de considerar la distribución de los puntos espectro en \mathbb{R}^{951} como una nube de puntos distribuida en un espacio de dimensión 3, reteniendo información que permite diferenciar, en varios casos, a los espectros Raman provenientes de distintas categorías de fluorosis.

En la segunda etapa de construcción del modelo, se utilizó la técnica multivariada de Análisis Discriminante Lineal, el cual definió, con base en la construcción de tres funciones discriminantes, las regiones de clasificación en el espacio 3D-PCA a ser utilizadas para llevar a cabo la predicción de membresía de las muestras.

El entrenamiento del modelo se llevó a cabo con base en los espectros Raman correspondientes a los dientes que fueron seleccionados aleatoriamente para formar parte del conjunto de entrenamiento.

Las funciones discriminantes fueron construidas a partir de los scores obtenidos por en Análisis de Componentes Principales. Los resultados mostraron que la primera función (LD1)

logró explicar aproximadamente el 95.50 % de la varianza entre-clase de los espectros del conjunto de entrenamiento representados en el espacio 3D-PCA; mientras que la segunda función discriminante sólo contribuye con aproximadamente el 3.5 % y la tercera función discriminante sólo 0.01 % de la varianza entre-clase.

El desempeño del modelo en el conjunto de entrenamiento tuvo un desempeño perfecto en la categoría de dientes sanos (100 % de clasificación acertada); su peor desempeño lo tuvo en la categoría de los dientes con fluorosis moderada (84.29 % de clasificación acertada). El desempeño global del modelo en el conjunto de entrenamiento fue de 93.57 % de clasificación acertada.

En términos generales, valores bajos de desempeño de un modelo en el conjunto de entrenamiento son un indicador de que el desempeño del modelo en el conjunto prueba dejará mucho que desear. Desafortunadamente, valores altos de desempeño del modelo en el conjunto de entrenamiento no son ninguna garantía de que el desempeño del modelo será bueno; éste puede fallar. De ahí la importancia de siempre llevar a cabo un procedimiento de validación.

En este estudio, al ser probado el modelo en el conjunto de espectros correspondientes al conjunto prueba, el modelo construido tuvo el mejor desempeño en la categoría de dientes sanos y en la categoría de dientes con fluorosis leve, con un valor de 96.67 % de predicción acertada en ambos grupos. El desempeño menos eficiente lo tuvo el modelo en la categoría de fluorosis moderada.

Gonzalez-Solís *et al.* [62] señalan que, apoyándose en el Análisis Discriminante Lineal llevado a cabo sobre los scores producidos por el Análisis de Componentes Principales, pudieron separar las categorías de fluorosis moderada y severa, pero no lograron separar las categorías de diente sano y fluorosis leve. En nuestro caso, las categorías de diente sano y diente con fluorosis leve fueron adecuadamente distribuidas en el espacio 3D-PCA. El modelo PCA-LDA construido en este trabajo, como ya fue arriba indicado, tuvo un buen desempeño en la clasificación de dientes pertenecientes a estas categorías.

El desempeño general en el conjunto prueba, medido por la precisión del mismo, fue de 91.67 %. Esto es, el error general (test error) que comete el modelo al clasificar dientes en relación con la fluorosis asciende al 8.33 %.

Factores que pueden contribuir a este fallo del modelo pueden deberse a sustituciones químicas y a variaciones estructurales en los cristales de hidroxiapatita del esmalte dental. Durante la formación del esmalte, la fluorosis produce cambios en la interacción proteínas/minerales, implicando la retención de amelogeninas. Esta retención provoca que se generen áreas hipomineralizadas de esmalte. Por otro lado, los fluoruros incrementan el proceso de precipitación durante la formación del diente, de tal forma que altas concentraciones de fluoruros producen bandas hipermineralizadas de esmalte, que son seguidas por bandas hipomineralizadas [18].

Martínez-Mier *et al.* [87] en su estudio en dientes con fluorosis, mediante el uso de un electrodo de ion específico para fluoruros y pH, lograron cuantificar la concentración de fluoruros en el esmalte. Los autores reportaron que, debido a la gran dispersión de los valores encontrados sobre la concentración de fluoruros, éstos pueden traslaparse entre dientes que pertenecen a categorías diferentes de fluorosis.

Estudios en modelos animales han demostrado la presencia de fluctuaciones en la concentración de calcio en la mineralización del ambiente del diente, debidas a la presencia de fluoruros. Los fluoruros causan respuestas traumáticas en dos direcciones: primero se produce hipermineralización como resultado del crecimiento rápido temporal en la precipitación del calcio; conforme los niveles del calcio decrecen, ocurre la hipomineralización con un subsecuente incremento en la porosidad del esmalte [63, 64, 88] Así, la heterogeneidad observada en el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita en los dientes con fluorosis puede estar contribuyendo a que el modelo PCA-LDA construido asigne en algunos casos una clasificación errónea.

A fin de obtener una valoración más detallada sobre el desempeño del modelo, fueron calculadas la sensibilidad, especificidad y precisión alcanzadas por el modelo en el conjunto prueba, tomando como referente la comparación de grupos de categorías de fluorosis de utilidad clínica.

La mayor sensibilidad se alcanzó al comparar el grupo integrado por las categorías de fluorosis leve, moderada y severa contra dientes sanos; el valor alcanzado fue de 98.9 %. Esto es, el error que se comete por no diagnosticar adecuadamente un diente que tiene fluorosis es 1.1 %. Esto indica que el modelo es un instrumento adecuado para detectar fluorosis dental.

La sensibilidad menor fue alcanzada cuando se compara el grupo de fluorosis severa contra todos los demás; el valor alcanzado fue de 93.3 %. Esto es, el error que se comete al no diagnosticar adecuadamente en la categoría severa a un diente que tiene fluorosis severa es 6.7 %. Este es el error que el modelo estaría cometiendo con dientes en la categoría extrema de fluorosis para ser clasificados como fluorosis severa.

El valor máximo de especificidad se alcanzó cuando se compara el grupo integrado de fluorosis severa y moderada contra el grupo integrado de dientes sanos y fluorosis leve; el valor alcanzado fue de 100 %. Esto es, el modelo no comete error con el grupo integrado por dientes sanos y dientes con fluorosis leve.

El valor mínimo de especificidad se alcanzó cuando se compara el grupo de fluorosis severa contra el grupo integrado complemento; el valor alcanzado fue de 94.4 %. Esto es, el modelo comete un error 5.6 % con el grupo integrado por los dientes sanos y dientes con fluorosis leve y moderada.

En este estudio, adicionalmente, mediante un análisis discriminante cuadrático (QDA), se construyó un modelo cuadrático (PCA-QDA). La precisión del modelo fue de 90 %, lo cual produjo valores inferiores a los producidos por el modelo PCA-LDA. En consecuencia, los

resultados muestran que los datos pueden ser modelados mediante un modelo lineal (PCA-LDA), sin pérdida de capacidad discriminante al compararse con un modelo cuadrático. Los modelos más simples tienen la ventaja de que, por lo general, son más fáciles de interpretar y más susceptibles de aplicarse a otras muestras.

Entre las fortalezas de este estudio está que el muestreo de los sitios de la superficie del diente para la adquisición de los espectros se llevó a cabo de manera sistemática. Todos los espectros fueron adquiridos bajo la misma configuración del espectrómetro y todos los espectros fueron pre-procesados con la misma técnica a fin de contar con espectros estandarizados. Se procedió a eliminar las diferencias producidas por la línea de fondo, línea base, utilizando la corrección de concavidad (concave rubber band) después haber llevado a cabo el proceso de suavizado (smoothing). La estandarización se realizó haciendo uso del área bajo la curva en todo el rango espectral estudiado.

Se adquirieron un total de 400 espectros. Esta cantidad de observaciones permitió el uso apropiado de herramienta estadística para modelar los datos.

En el contexto de la perspectiva teórica del aprendizaje automatizado (machine learning), que cuenta con algoritmos adecuados para el análisis de datos espacios de alta dimensión y formular modelos de clasificación que logren predecir la membresía de nuevos objetos, fue posible construir un algoritmo para clasificar dientes con fluorosis dental y probar su precisión mediante una técnica de validación [89].

El modelo desarrollado, modelo PCA-LDA, podría ser aplicado a otras muestras, lo cual permitiría evaluar la posibilidad de generalización de los resultados obtenidos.

En relación al estudio de los dientes mediante el análisis de difracción de rayos X (XRD), es importante señalar la gran diferencia que se obtiene, en el patrón de intensidades de los picos en los difractogramas, al trabajar con material en bulto, como es el caso de un diente, respecto del que se obtiene según la carta cristalográfica de la hidroxiapatita (JCPPDS: 9-432), correspondiente a material en polvo. En los difractogramas obtenidos, los picos correspondientes a los planos de difracción (002) y (004) muestran intensidades que no se presentan en la hidroxiapatita en polvo ni en el esmalte cuando es analizado mediante una muestra en polvo. Este patrón anisotrópico de las intensidades es el resultado del efecto que tiene la textura cristalina sobre las intensidades de estas bandas, que son reflejo de la estructura regular que mantiene los cristales de hidroxiapatita en el esmalte [81].

El estudio realizado mediante análisis de difracción de rayos X (RDX) permitió observar algunas de las características, a nivel atómico y a nivel de estructura, del esmalte con fluorosis dental. La diferencia obtenida en este estudio para los parámetros de celda unitaria (eje a y eje c) de los cristales de hidroxiapatita de esmalte sano y diente con fluorosis, estimados mediante Modelos Gaussiano, Lorentziano y Voigt fue del orden de milésimas de ángstrom. En el estudio realizado por Gamal *et al.* [90] con hidroxiapatita dopada con Fe e hidroxiapatita no dopada, los investigadores estimaron, mediante análisis de difracción de rayos X, un tamaño de celda unitaria para la hidroxiapatita no dopada de $a = 9.416\text{\AA}$, $c = 6.887\text{\AA}$;

la estimación la realizaron utilizando los planos cristalográficos (002) y (300). Por su parte, Berhoozibakhsh *et al.* [51] trabajando con esmalte en polvo y esmalte en bulto, mediante análisis difracción de rayos X, estimaron también los valores para la celda unitaria. Para esmalte en polvo encontraron que $a = 9.440 \pm 0.052\text{Å}$ y $b = 6.873 \pm 0.031\text{Å}$; para esmalte en bulto encontraron que $a = 9.444 \pm 0.054\text{Å}$ y $b = 6.871 \pm 0.011\text{Å}$. En nuestro caso, si consideramos la desviación estándar de nuestras estimaciones, se tiene que los valores encontrados para a y b caen en estos rangos señalados. Por tanto, no podemos asegurar que la fluorosis altere el tamaño de celda unitaria de la hidroxiapatita del esmalte.

En este estudio obtuvimos una ligera relación inversa entre el tamaño del cristalito y el nivel de fluorosis. El tamaño del cristalito, utilizando el Método de Williamson-Hall, fue de 39.3391 nm para el diente con fluorosis severa y de 45.7644 nm para el diente sano. Valores similares ya han sido reportados. Particularmente, utilizando también el Método de Williamson-Hall, Berhoozibakhsh *et al.* [51] estimaron que el tamaño del cristalito para esmalte sano en bulto es igual 47.29 nm.

El estudio mediante las técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido y Espectroscopía de Energía Dispersiva de Rayos X (SEM/EDS) permitió obtener información sobre aspectos morfológicos y composición química del esmalte con fluorosis. En las micrografías del esmalte con fluorosis severa obtenidas mediante SEM se identificó la presencia de fositas en el esmalte y la confluencia de líneas de fractura con pérdida de esmalte. Se logró identificar también pérdida de material mineralizado que sirve de soporte para la capa superficial del esmalte. Adicionalmente se detectó el ensanchamiento en los espacios interprismáticos y fractura de los mismos.

Shinoda y Ogura [91] llevaron a cabo un estudio experimental, con modelo animal (ratas), para estudiar el efecto del flúor en el desarrollo del esmalte. Los autores conformaron dos grupos, el experimental y el de control. El primero fue sometido a tomar agua con 100 ppm, en tanto que el segundo tomó agua potable libre de flúor. Por medio de SEM, estudiaron las características del esmalte de los dientes que desarrollaron ambos grupos. En el grupo experimental, encontraron que el centro de los prismas los cristalitos estaban menos densamente empacados; adicionalmente, también encontraron que los espacios interprismático eran más ásperos y anchos que los del esmalte de los dientes del grupo control.

En un estudio más reciente, Jie *et al.* [92] investigaron sobre las características del esmalte de dientes humanos con fluorosis; utilizaron una muestra de 10 dientes sanos, 10 con fluorosis leve y 10 con fluorosis severa. Mediante la técnica SEM identificaron la presencia de microporos en los columnas prismáticas del esmalte, así como el ensanchamiento de los espacios interprismáticos y debilitamiento del arreglo columnar de los prismas. A partir de su estudio, los autores concluyeron que el comportamiento nano-macánico del esmalte de los dientes con fluorosis difiere significativamente del que tiene el esmalte proveniente de dientes sanos.

Una limitación del presente estudio es que no fueron consideradas todas las superficies dentales; únicamente fue considerada la superficie vestibular. Es posible que al incluir otras

superficies en el estudio aparezca nueva información acerca de las diferencias en la orientación de los cristales entre las superficies dentales; asimismo, la erosión y la atrición dental pudieran tener alguna influencia en los resultados. Sin embargo, es importante considerar que la selección de la superficie vestibular no sólo fue seleccionada para el estudio por el impacto estético que tiene la fluorosis dental en ella y la visibilidad de la misma, sino también por su accesibilidad en el proceso del examen de salud oral del individuo, y las futuras aplicaciones que podrá tener la espectroscopía Raman en los espacios clínicos dentales.

Se requiere de la realización de más estudios que apliquen la espectroscopía micro-Raman para el diagnóstico de la fluorosis dental. Por ejemplo, la realización de un mapeo más refinado de las áreas del esmalte que son observadas pudiera contribuir a reducir la clasificación errónea de las muestras dentales. El uso de técnicas micro-Raman polarizadas podría ayudar a mejorar la precisión del modelo de predicción, en tanto que podría, en principio, quedar incorporado en el análisis la orientación de los cristales; estas técnicas ya se han utilizado en especímenes *ex-vivo* [93].

Un reto que tienen frente a sí los profesionales de la salud es la preparación de examinadores para el diagnóstico de la fluorosis dental; la complejidad del proceso de estandarización para el establecimiento de diagnósticos correctos, en este campo de la estomatología, incrementa el riesgo de que se presenten sesgos en la evaluación de la salud oral de los individuos. Puede ser de gran utilidad para llevar a cabo el proceso de estandarización entre los examinadores contar con guías visuales que muestren los diversos niveles de la gravedad de la fluorosis en dientes previamente clasificados por expertos en fluorosis y por medio de modelos PCA-LDA basados en espectroscopía Raman. Esto sería de gran apoyo en los cursos de entrenamiento de examinadores, tanto en los espacios clínicos como en los campos de la epidemiología e investigación en salud oral de las poblaciones.

Los fluoruros han jugado un papel fundamental en la prevención y control de la caries dental en todo el mundo. El riesgo de fluorosis dental ha sido una preocupación presente en los programas basados en la fluoruración de agua potable, sal, leche y otros productos. Esto refuerza la necesidad de contar con técnicas diagnósticas para fluorosis dental precisas; lo cual fortalecería la vigilancia epidemiológica de estas alteraciones del desarrollo. Así, lo anterior podría contribuir a la implementación de estrategias de intervención y a la regulación de políticas públicas de salud, como los son los programas de fluoruración del agua y el de la sal.

La fluorosis dental es un problema de salud pública en crecimiento; existen regiones del mundo que tienen aguas subterráneas con altas concentraciones de fluoruros [94]. La detección temprana de fluorosis dental podría ser utilizada como un marcador de presencia de fuentes de agua con alto contenido en fluoruros, lo cual podría ser usado para establecer avisos de alerta a las autoridades de salud.

A la fecha, se ha logrado establecer asociación entre algunas enfermedades y la exposición elevada crónica a fluoruros [95]. La disponibilidad de métodos de diagnóstico de fluorosis dental precisos, no-invasivos y no-destructivos es un paso adecuado en la prevención y control de las formas graves de este padecimiento y sus consecuencias.

Capítulo 7

Conclusiones

Los resultados del presente estudio mostraron que la técnica de espectroscopía Raman puede ser utilizada para el reconocimiento de los estados de gravedad de fluorosis dental.

Los espectros Raman de los dientes presentan un patrón de intensidades dominado, fundamentalmente, por los modos vibracionales internos del ion fosfato $\nu_1(PO_4)^{3-}$. Particularmente, la banda asociada al modo de vibración de elongación simétrico del fosfato, ubicada en 960 cm^{-1} de desplazamiento Raman, presenta la mayor intensidad (altura). Esta intensidad disminuye en los espectros Raman correspondientes a dientes ubicados en las categorías más altas de fluorosis; esto es, guarda una relación inversa con la severidad de fluorosis.

Sin embargo, debido a la variabilidad del fenómeno estudiado, la información que aporta el espectro Raman en esta banda no es suficiente para caracterizar el estado de fluorosis del diente; espectros correspondientes a dientes ubicados en distintas categorías de fluorosis presentan tralape en la intensidad de esta banda.

Los resultados del presente estudio muestran que la información de la banda 960 cm^{-1} puede discriminar dientes sanos o con fluorosis leve de dientes con fluorosis moderada o severa. Sin embargo, por ejemplo, con el uso exclusivo de esta banda, no se logra discriminar entre los grupos de fluorosis moderada y severa.

Esta situación se vuelve más compleja con las bandas correspondientes a los demás modos vibracionales observados en el espectro Raman; en el espectro no aparece de manera clara alguna característica del mismo que pudiera ser utilizada para la tipificación de los dientes según su estado de fluorosis.

Una alternativa ante esta situación es rescatar la información que contiene el espectro Raman mediante el uso de técnicas multivariadas. Para ello, conviene representar el espectro Raman como un vector en un espacio multidimensional, de tal forma que analizar el conjunto de espectros sea equivalente a analizar una nube de puntos en dicho espacio. En nuestro caso, procedimos a utilizar el Análisis de Componentes Principales (PCA), a fin de representar estos datos en un espacio de dimensión menor.

En nuestro caso, el nuevo espacio para trabajar con la nube de puntos fue construido con los primeros tres componentes principales *PC1*, *PC2* y *PC3*. Una característica interesante que resultó de esta construcción es que la banda asociada al modo de vibración simétrico $\nu_1(\text{PO}_4)^{3-}$ tiene una participación preponderante en la definición del primer componente principal *PC1* y no contribuye en la definición del segundo y tercer componentes principales *PC2* y *PC3*; en tanto que los modos de vibración ν_2 , ν_3 y ν_4 si tienen participación en ellos. De aquí, puede afirmarse entonces, que las diferencias observadas en la distribución de los puntos en las direcciones de *PC2* y *PC3* corresponden más a los modos vibracionales ν_2 , ν_3 y $\nu_4(\text{PO}_4)^{3-}$ que al modo vibracional $\nu_1(\text{PO}_4)^{3-}$.

A partir de los puntajes (scores) obtenidos mediante el Análisis de Componentes, y haciendo uso de planteamientos de Aprendizaje Automático (Machine Learning), fue posible construir un modelo de clasificación supervisado basado en la técnica de Análisis Discriminante Lineal. Este modelo permite asignar a los dientes a la categoría de fluorosis que les corresponde, con base únicamente en la información de su espectro Raman. El modelo PCA-LDA construido mostró alta precisión, sensibilidad y especificidad en la identificación de las categorías de fluorosis dental.

Adicionalmente, el análisis de los espectros Raman mostró que el incremento en la sustitución tipo-B del ion carbonato en los sitios del fosfato de la hidroxiapatita se incrementa con la gravedad de la fluorosis.

A partir del Análisis de Difracción de Rayos X (RDX) no se encontró diferencia en los parámetros de celda unitaria al comparar diente sano con diente con fluorosis. Sin embargo, se observó una ligera relación inversa entre el tamaño del cristalito y el nivel de fluorosis.

Finalmente, el estudio mediante las técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido y Espectroscopía de Energía Dispersiva de Rayos X (SEM/EDS) permitió obtener información sobre aspectos morfológicos y composición química del esmalte con fluorosis. En las micrografías del esmalte con fluorosis severa se identificó la presencia de fositas y pérdida de material mineralizado que sirve de soporte para la capa superficial del esmalte; asimismo, se observó ensanchamiento en los espacios interprismáticos y fractura de los mismos.

En resumen, la espectroscopía Raman en conjunto con los modelos PCA-LDA constituyen una herramienta a ser utilizada para el diagnóstico de fluorosis dental, tanto en ámbitos de actividad clínica como epidemiológica.

En conclusión, teniendo presente que la fluorosis dental es un problema de salud pública en diversas partes del mundo y que contar con métodos de diagnóstico precisos, no-invasivos y no-destructivos es una cuestión de primer orden, podemos asegurar que la espectroscopía Raman, a este respecto, ofrece una posibilidad.

Apéndice A

Cristalografía, Redes de Bravais y simetrías

En física de estado sólido un arreglo de átomos se considera que constituye un cristal ideal si dicho arreglo está construido mediante la repetición ordenada infinita de un conjunto de átomos dado; este conjunto de átomos cuya repetición genera el arreglo se denomina base del cristal. La base de un cristal puede ser un conjunto que esté conformado por sólo un átomo o puede ser que este conjunto contenga varios átomos.

Todo arreglo de átomos que sea considerado como cristal tendrá asociado un conjunto infinito de puntos distribuidos en el espacio, bidimensional o tridimensional, denominado red cristalina. Esta red cristalina está completamente determinada por dos vectores linealmente independientes en \mathbb{R}^2 para el caso bidimensional, denotados por \mathbf{a} , \mathbf{b} o tres vectores linealmente independientes en \mathbb{R}^3 , denotados por \mathbf{a} , \mathbf{b} , \mathbf{c} , para el caso tridimensional; el origen del espacio puede fijarse en cualquier punto de la red. Se asumirá que cualesquiera dos puntos del espacio, digamos \mathbf{r}_1 , \mathbf{r}_2 , que formen parte de la red cristalina, desde los cuales el arreglo cristalino se vea igual, estarán conectados mediante la siguiente transformación, para el caso bidimensional

$$\mathbf{r}_2 = \mathbf{r}_1 + u_1\mathbf{a} + u_2\mathbf{b} \tag{A.1}$$

con $\mathbf{a}, \mathbf{b} \in \mathbb{R}^2$ y $u_1, u_2 \in \mathbb{Z}$

y para el caso tridimensional por

$$\mathbf{r}_2 = \mathbf{r}_1 + u_1\mathbf{a} + u_2\mathbf{b} + u_3\mathbf{c} \tag{A.2}$$

con $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c} \in \mathbb{R}^3$ y $u_1, u_2, u_3 \in \mathbb{Z}$.

Los vectores que cumplan con las condiciones mencionadas serán denominados vectores primitivos de traslación; el paralelogramo o el paralelepípedo definido por los vectores \mathbf{a} , $\mathbf{b} \in \mathbb{R}^2$, o por los vectores \mathbf{a} , \mathbf{b} , $\mathbf{c} \in \mathbb{R}^3$, según sea el caso, será denominado celda primitiva de la red cristalina. Las rectas definidas por estos vectores primitivos de traslación serán considerados como los ejes del cristal. Es importante tomar en cuenta que aprovechando las simetrías de

los cristales pueden definirse ejes cristalinicos adicionales. Dada una base conformada por k átomos, la denominaremos base primitiva si podemos asegurar que la posición del átomo j -ésimo puede ser expresada en términos de los vectores primitivos de traslación mediante la siguiente forma, para el caso bidimensional [50, 96, 97]

$$\mathbf{x}_j = x_j \mathbf{a} + y_j \mathbf{b} \quad (\text{A.3})$$

con $\mathbf{a}, \mathbf{b} \in \mathbb{R}^2$ y $0 \leq x_j, y_j \leq 1$
y para el caso tridimensional por

$$\mathbf{x}_j = x_j \mathbf{a} + y_j \mathbf{b} + z_j \mathbf{c} \quad (\text{A.4})$$

con $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c} \in \mathbb{R}^3$ y $0 \leq x_j, y_j, z_j \leq 1$.

Con base en la geometría que presentan los cristales que se encuentran en la naturaleza, y considerando la geometría de las celdas primitivas asociadas a ellos, para el caso de cristales tridimensionales, se han definido siete sistemas cristalinicos; a saber: triclinico, monoclinico, ortorrómbico, tetragonal, cúbico, romboédrico o trigonal, y hexagonal. La tipificación de estos sistemas cristalinicos se hace con base en la relación que guardan entre sí las magnitudes de los vectores primitivos $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}$, así como el ángulo que forman entre sí. En la Tabla A.1 se presentan las características geométricas de cada uno de estos sistemas cristalinicos. [50, 96]

Adicionalmente a esta clasificación de los cristales en cuanto a la pertenencia a uno de estos sistemas, los cristales también son clasificados en función de la distribución que presentan, respecto a la celda primitiva, los átomos o moléculas que conforman su base primitiva. Así, tomando en cuenta este elemento, dentro de cada uno de los sistemas cristalinicos considerados existen diversas redes cristalinicas que los conforman. Según sea la distribución de los átomos o moléculas de la base, las celdas cristalinicas son denominadas mediante los nombres simple, centrada en el cuerpo, centrada en la base o, como cuarta opción, centrada en las caras.

De esta forma, al considerar simultáneamente el sistema cristalinico en el cual queda clasificado el cristal según sea la geometría de su celda primitiva y el tipo de celda según sea la distribución de los átomos de la base en ella, se conforman catorce redes conocidas como Redes de Bravais, en honor al físico francés Auguste Bravais (1811-1863) por sus trabajos en cristalografía. A fin de estudiar las simetrías de los cristales, tomando en cuenta el tipo de red a la que pertenecen y la distribución de los átomos del cristal en las celdas primitivas, conviene utilizar celdas del cristal que no son celdas primitivas, pero están ínicamente vinculadas a ellas; algunas veces a este tipo de celdas se les denomina celdas unitarias. En la Tabla A.1 se ilustran, para cada uno de los sistemas cristalinicos, las redes de Bravais que los conforman.

Una característica inherente a los cristales, asociada al caracter repetitivo ordenado de los elementos que los conforman, es el conjunto de propiedades de simetría que presentan. Multitud de propiedades físicas de los cristales, ya sea mecánicas, eléctricas, magnéticas o térmicas, están asociadas a sus propiedades de simetría. En los cristales es posible definir varios elementos geométricos que ayudan al estudio de sus propiedades de simetría. Así, no

Tabla A.1: Sistemas cristalinos y Redes de Bravais tridimensionales.

Sistema cristalino	Características (ejes y ángulos)	Red de Bravais
Triclínico	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma$	<ul style="list-style-type: none"> ■ Triclínica Simple
Monoclínico	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$	<ul style="list-style-type: none"> ■ Monoclínica Simple ■ Monoclínica Centrada en la Base
Ortorrómbico	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	<ul style="list-style-type: none"> ■ Ortorrómbica Simple ■ Ortorrómbica Centrada en el Cuerpo ■ Ortorrómbica Centrada en la Base ■ Ortorrómbica Centrada en las Caras
Tetragonal	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	<ul style="list-style-type: none"> ■ Tetragonal Simple ■ Tetragonal Centrada en el Cuerpo
Cúbico	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	<ul style="list-style-type: none"> ■ Cúbica Simple ■ Cúbica Centrada en el Cuerpo ■ Cúbica Centrada en las Caras
Romboédrico (Trigonal)	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma < 120^\circ, \neq 90^\circ$	<ul style="list-style-type: none"> ■ Romboédrica Simple
Hexagonal	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$	<ul style="list-style-type: none"> ■ Hexagonal Simple

sólo es posible definir ejes de traslación bajo los cuales los elementos del cristal pueden trasladarse, asegurando que la configuración resultante sea equivalente a configuración inicial, en el sentido de que es indistinguible, pero diferente; también es posible definir ejes de rotación bajo el cual el cristal presenta simetría; planos especulares que indican que el cristal presenta simetría bajo reflexión sobre dichos planos; puede también definirse ejes helicoidales, los cuales involucran simultáneamente una rotación alrededor de un eje más una traslación; etc. [98, 99] Sin duda alguna, la complejidad y riqueza de las simetrías que presentan los cristales es inagotable.

Pero la importancia de las simetrías no sólo queda aquí, a nivel del cristal como un todo. Particularmente, en el campo de la espectroscopía vibracional, como lo son la espectroscopía infrarroja (IR) y la espectroscopía Raman, es indispensable considerar las propiedades de simetría de las moléculas bajo estudio. En el caso de las moléculas, también es posible definir diversos elementos geométricos, denominados elementos de simetría, los cuales permiten llevar a cabo de manera precisa y sistemática el estudio de las simetrías presentes en ellas. Este estudio y los resultados a los que se llega son de enorme utilidad, de alcance inimaginable, en el campo de las espectroscopías vibracionales.

Una vez dicho lo anterior, abordemos algunos aspectos al respecto. Iniciemos recordando los principales elementos de simetría que por lo general son considerados en el estudio de las propiedades de simetría de las moléculas. Estos elementos geométricos son los siguientes [100]:

- eje de rotación de orden n : un eje de simetría en torno al cual se puede llevar a cabo una rotación de la molécula, con un ángulo de giro de $2\pi/n$; donde n puede tomar los valores enteros. El operador que actúa sobre los elementos de la molécula asociado a esta operación de simetría se denota por C_n (operador rotación de orden n).
- plano de reflexión: un plano de simetría respecto del cual se puede llevar a cabo una reflexión de todos los elementos de la molécula. El operador asociado a esta operación de simetría se denota por σ (operador reflexión).
- punto de inversión (centro de simetría): un punto de simetría respecto del cual se puede llevar a cabo una reflexión de todos los elementos de la molécula. El operador asociado a esta operación de simetría se denota por i (operador inversión).
- eje de rotación impropia de orden n : un eje de simetría respecto del cual se puede llevar a cabo la rotación con ángulo de $2\pi/n$, seguida de una reflexión respecto de un plano perpendicular a dicho eje. El operador asociado a esta operación de simetría se denota por S_n (operador rotación impropia de orden n).

A estos elementos y operaciones de simetría definidos le agregamos la operación de simetría que denominaremos operación identidad, consistente en lo siguiente:

- operación identidad: la operación bajo la cual ningún átomo de la molécula es movido de su lugar. El operador asociado a esta operación de simetría se denota por E (operador identidad).

En resumen, hemos definido cinco operadores de simetría que actúan sobre todos los elementos de la molécula, denominados operador identidad, rotación de orden n , reflexión en torno a un plano, inversión y rotación impropia de orden n , denotados por E, C_n, σ, i y S_n , respectivamente. Cabe mencionar que definidos estos elementos y operadores de simetría, habrá moléculas que tengan algunos de estos elementos de simetría y no tengan otros; esto es, habrá moléculas para las cuales algunas operaciones de simetría son válidas o están definidas, pero otras no. Obviamente, todas las moléculas aceptarán la operación de simetría identidad. También es importante tener en cuenta que, considerada una molécula en particular, con las operaciones de simetría definidas en ella, es posible utilizar los operadores de manera sucesiva; esto es, a manera de ejemplo, si la molécula acepta como operaciones de simetría una rotación de orden 2, C_2 , y una reflexión sobre un plano, σ , podemos aplicar primero el operador rotación y luego aplicar el operador reflexión sin ninguna dificultad teórica al respecto. Vale la pena hacer explícito, sin embargo, que lo anterior no debe ir en detrimento de la importancia de estudiar las implicaciones que pueda tener la inversión del orden en que son aplicados los operadores de simetría; esta cuestión tendrá que ser analizada.

Una vez definido lo anterior, y con el fin de avanzar en este tema, procedamos a hacer uso de conceptos matemáticos firmemente establecidos en el campo del álgebra, como lo es el concepto de grupo y las propiedades asociadas al mismo. Para ello, recordemos que en álgebra, un conjunto de elementos en el cual se ha definido una operación binaria constituye un grupo, o tiene estructura de grupo, si cumple con los requerimientos establecidos en la siguiente definición [101]:

Definición 1 Sea G un conjunto de elementos no vacío. Diremos que G es un grupo si en G está definida una operación binaria, denominada multiplicación o producto, denotada por (\cdot) , la cual satisface las siguientes propiedades.

- 1) $\forall a, b \in G$ se tiene que $a \cdot b \in G$ (Propiedad de Cerradura).
- 2) $\forall a, b, c \in G$ se tiene que $a \cdot (b \cdot c) = (a \cdot b) \cdot c$ (Propiedad Asociativa).
- 3) Existe un único elemento, denotado por e , con $e \in G$, tal que $a \cdot e = e \cdot a = a$, $\forall a \in G$ (Existencia del elemento neutro en G , bajo la operación producto)
- 4) $\forall a \in G$ existe un elemento, denotado por a^{-1} , con $a^{-1} \in G$, tal que $a \cdot a^{-1} = a^{-1} \cdot a = e$ (Existencia del elemento inverso en G , bajo la operación producto).

Un resultado sorprendente que se obtiene cuando son considerados en conjunto los operadores de simetría de una molécula es que dicho conjunto constituye un grupo en los términos algebraicos arriba definidos. Esto es, podemos hacer uso de toda la teoría algebraica al respecto, teoría de grupos, para abordar el análisis de las simetrías que presentan las moléculas.

Estos grupos son denominados grupos puntuales de simetría, pues tienen la característica de que los operadores de simetría que conforman cada grupo, al ser aplicados sobre la molécula correspondiente, siempre dejan al menos un punto fijo en el espacio que comparten; esto es, para cada grupo, siempre existe al menos un punto del espacio que ninguna de las operaciones del grupo mueve.

Avancemos en el tema. Tomemos, por ejemplo, una molécula triatómica no colineal, supongamos de la forma **B-A-B**. Por fines prácticos, asumamos que el plano molecular coincide con el plano YZ ; el átomo **A** se encuentra en el eje Z , siendo éste coincidente con el eje vertical de la molécula y los átomos **B** se encuentran localizados en el eje Y .

Puede observarse que esta molécula, además de la operación de simetría identidad, acepta la operación rotación de orden 2, C_2 , en torno al eje Z , y las operaciones reflexión sobre el plano XZ y sobre el plano YZ denotadas por σ_v y σ'_v , respectivamente.

Recurramos ahora al grupo puntual de simetría C_{2v} , el cual, según la notación de Schönflies, contiene un operador de rotación de orden 2, C_2 y dos operadores de reflexión que tienen como elementos de simetría a dos planos verticales ortogonales (vertical, en este contexto, significa que el plano contiene al eje de rotación); la Tabla A.2 muestra la Tabla de Multiplicación de este grupo [40].

Tabla A.2: Tabla de Multiplicación del grupo puntual de simetría C_{2v}

C_{2v}	E	C_2	σ_v	σ'_v
E	E	C_2	σ_v	σ'_v
C_2	C_2	E	σ'_v	σ_v
σ_v	σ_v	σ'_v	E	C_2
σ'_v	σ'_v	σ_v	C_2	E

El primer renglón y la primera columna indican los operadores que se van a multiplicar. Por convención, sin pérdida de generalidad, podemos tomar como primer operador a ser utilizado alguno que se encuentre en el primer renglón y el segundo cualquiera de los que se encuentran en la primera columna.

Esta tabla tiene un significado directo en términos de las simetrías moleculares. A manera de ejemplo, para ilustrar la situación, tomemos un producto en particular. La tabla indica que si hacemos el producto del operador σ_v por el operador C_2 , denotado por $C_2 \cdot \sigma_v$, obtenemos el operador σ'_v . Esta multiplicación y su resultado puede ser constatado en nuestra molécula triatómica; únicamente hay que proceder a realizar las operaciones de simetría indicadas sobre la molécula. Puede observarse que la configuración espacial que se obtiene al llevar a cabo las dos operaciones de simetría indicadas es la misma que se obtiene si se aplicara únicamente la operación de simetría σ'_v . Adicionalmente a lo anterior, en este caso, al observar la tabla de multiplicación nos percatamos de que se cumple lo siguiente:

$$C_2 \cdot \sigma_v = \sigma'_v \quad (\text{A.5})$$

y

$$\sigma_v \cdot C_2 = \sigma'_v \quad (\text{A.6})$$

Esto es, las dos multiplicaciones (Ec.A.5 y Ec.A.5) producen el mismo resultado, independientemente del orden en que se realicen; es decir, este producto particular conmuta. De manera más general, a partir de esta tabla de multiplicación, se observa que para cualesquiera dos operadores de simetría de este grupo, denotados por a y b , se tiene que

$$a \cdot b = b \cdot a, \forall a, b \in G \quad (\text{A.7})$$

Esto es, la multiplicación de cualesquiera dos operadores de este grupo tiene la propiedad de ser conmutativa; por tanto, estamos frente a un grupo puntual de simetría es un grupo abeliano. El significado para nuestra molécula de que el grupo puntual de simetría asociado sea abeliano es que cualquier conjunto de operaciones de simetría que se lleve a cabo en la molécula produce la misma configuración independientemente del orden en que se apliquen (Ec.A.7).

Como parte final de este apéndice, con la intención de aportar herramientas que nos permitan llevar a cabo el estudio de los modos vibracionales que presentan las moléculas, veamos algo sobre la denominada Tabla de Caracteres de un grupo puntual de simetría.

Empecemos recordando que cada uno de los operadores de simetría que hemos definido es susceptible de ser representado matricialmente. En el caso particular del grupo puntual de simetría C_2 , tenemos la siguiente representación matricial [102]:

- para el operador identidad

$$E = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (\text{A.8})$$

- para el operador rotación de orden 2 alrededor del eje Z

$$C_2 = \begin{pmatrix} \cos\theta & \sen\theta & 0 \\ -\sen\theta & \cos\theta & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(2\pi/2) & \sen(2\pi/2) & 0 \\ -\sen(2\pi/2) & \cos(2\pi/2) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (\text{A.9})$$

- para el operador reflexión sobre el plano vertical YZ

$$\sigma_{v(YZ)} = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (\text{A.10})$$

- y finalmente, para el operador reflexión sobre el plano vertical XZ

$$\sigma_{v(XZ)} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (\text{A.11})$$

Mediante el uso de esta representación matricial de las operaciones de simetría podemos construir una representación reducible de los nueve grados de libertad de la molécula considerada. Para ello, como primer paso, sería necesario construir una matriz de 9x9 para cada operación de simetría, que represente el comportamiento de los vectores de desplazamiento de los tres átomos bajo esa transformación y, posteriormente, obtener su traza. Mediante este procedimiento es posible estudiar los modos vibracionales de la molécula. Así, en este caso particular, el trabajo hay que realizarlo con cuatro matrices de 9x9; sin embargo, cuando estamos frente a una molécula que tiene más de una docena de operaciones de simetría y, digamos, 6 u 8 átomos, el estudio del comportamiento de los vectores de desplazamiento obliga a trabajar con más de 10 matrices de dimensión 18x18 o 24x24, según sea el caso, para tener en cuenta todos los grados de libertad. Por fortuna, tenemos la posibilidad de seguir otro camino más corto, el cual consiste en hacer uso inmediato de la Tabla de Caracteres del grupo puntual de simetría bajo estudio y poner atención en aquellos átomos de la molécula que permanecen invariantes bajo cada una de las operaciones de simetría involucradas. Vayamos por este camino.

Procedamos a ello. En la Tabla A.3 se presenta la Tabla de Caracteres del grupo puntual de simetría C_{2v} [40, 103]. En esta tabla, en el primer renglón está indicado el grupo puntual de simetría al cual corresponde dicha tabla; seguido de los operadores de simetría que constituyen este grupo, en este caso cuatro; los dos últimos encabezados indican las funciones base de las representaciones irreducibles que presenta la tabla, separando las funciones lineales y las rotaciones de las de orden cuadrático. En la primera columna están indicadas las representaciones irreducibles de este grupo, señaladas en este caso con las letras A o B . En el último renglón aparece la representación correspondiente a las traslaciones, denotada por $\Gamma_{x,y,z}$. En el cuerpo de la tabla, en la primera sección, aparecen los caracteres de cada representación irreducible, correspondientes a cada operación de simetría. En las dos últimas columnas aparecen las funciones base de cada representación irreducible.

Tabla A.3: Tabla de Caracteres del grupo puntual de simetría C_{2v}

C_{2v}	E	C_2	$\sigma_v(xz)$	$\sigma_v(yz)$	Lineales y rot.	Cuadráticas
A_1	1	1	1	1	z	x^2, y^2, z^2
A_2	1	1	-1	-1	R_z	xy
B_1	1	-1	1	-1	x, R_y	xz
B_2	1	-1	-1	1	y, R_x	yz
$\Gamma_{x,y,z}$	3	-1	1	1		

El primer paso que llevaremos a cabo es obtener la representación total reducible, denotada generalmente por Γ_{3N} o Γ_{tot} . Esto se logra tomando los caracteres correspondientes a

la representación $\Gamma_{x,y,z}$ y multiplicarlos, para cada operación de simetría, por el número de átomos que permanecen invariantes bajo dicha transformación. En la Tabla A.4 se muestran los valores utilizados y el resultado obtenido al llevar a cabo el procedimiento descrito.

Tabla A.4: Tabla de Caracteres de Γ_{tot}

C_{2v}	E	C_2	$\sigma_v(xz)$	$\sigma_v(yz)$
$\Gamma_{x,y,z}$	3	-1	1	1
Átomos fijos	3	1	1	3
Γ_{tot}	9	-1	1	3

Expresemos ahora la representación reducible de Γ_{tot} en términos de representaciones irreducibles correspondientes a los 9 grados de libertad de la molécula. Para ello, hacemos uso de la siguiente fórmula:

$$n_i = (1/h) \sum_{\hat{R}} \chi_{tot}(\hat{R}) \chi_i(\hat{R}) C(\hat{R}) \quad (\text{A.12})$$

En esta expresión n_i indica el número de veces que aparecerá la representación irreducible χ_i en la expresión para Γ_{tot} ; h corresponde al orden del grupo (número de elementos del grupo), en este caso 4; $\chi_{tot}(\hat{R})$ indica el caracter de la representación total, Γ_{tot} , para la operación \hat{R} ; $\chi_i(\hat{R})$ indica el caracter de la representación χ_i correspondiente a la operación \hat{R} . $C(\hat{R})$ representa el número de elementos de la clase \hat{R} ; en caso de que la suma se realice sobre los operadores, tenemos $C(\hat{R}) = 1$. La Tabla A.5 muestra los caracteres a utilizar para llevar a cabo el cálculo de n_i y el resultado obtenido.

Tabla A.5: Cálculo de coeficientes, A_1

C_{2v}	E	C_2	$\sigma_v(xz)$	$\sigma_v(yz)$
A_1	1	1	1	1
Γ_{tot}	9	-1	1	3
$\Rightarrow n_1 = 3$				
A_2	1	1	-1	-1
Γ_{tot}	9	-1	1	3
$\Rightarrow n_2 = 1$				
B_1	1	-1	1	-1
Γ_{tot}	9	-1	1	3
$\Rightarrow n_3 = 2$				
B_2	1	-1	-1	1
Γ_{tot}	9	-1	1	3
$\Rightarrow n_4 = 3$				

Por tanto, podemos asegurar que la descomposición de la representación reducible Γ_{tot} en términos de representaciones irreducibles toma la forma siguiente:

$$\Gamma_{tot} = 3A_1 + A_2 + 2B_1 + 3B_2 \quad (\text{A.13})$$

Finalmente, para obtener la representación irreducible de los modos vibracionales, denotada por Γ_{vib} , tenemos que restar las representaciones irreducibles correspondientes a traslaciones y rotaciones, denotadas por Γ_{tras} y Γ_{rot} , respectivamente. Este paso ya es directo, pues la Tabla de Caracteres del grupo nos indica que las representaciones irreducibles correspondientes a traslaciones son A_1, B_1 y B_2 ; en tanto que las correspondientes a las rotaciones son A_2, B_1 y B_2 ; esto es,

$$\Gamma_{tras} = A_1 + B_1 + B_2 \quad (\text{A.14})$$

y

$$\Gamma_{rot} = A_2 + B_1 + B_2 \quad (\text{A.15})$$

Por lo que podemos asegurar que Γ_{vib} toma la forma siguiente

$$\Gamma_{vib} = \Gamma_{tot} - \Gamma_{tras} - \Gamma_{rot} = 2A_1 + B_2 \quad (\text{A.16})$$

Así, podemos concluir, por un lado, que los tres modos vibracionales de la molécula tri-dimensional no colineal de tipo **B-A-B** tienen simetrías A_1, A_1 , y B_2 , respectivamente. Y, por otro, finalmente, podemos asegurar que los tres modos vibracionales son activos en IR y en Raman.

Apéndice B

Análisis de Componentes Principales

En el campo de la estadística frecuentemente se está frente a situaciones en las que los objetos observados tienen carácter multidimensional. Cada uno de los objetos es considerado como un conjunto de valores que representan diversos atributos o propiedades de los mismos, en el entendido de que en todos los objetos son observadas la misma cantidad de atributos, supongamos p atributos. En estas circunstancias se tiene, por tanto, una situación multivariada conformada por n objetos en los que en cada uno de ellos ha sido observado el valor que toma cada una de las p variables que representan estos los atributos.

En estas situaciones, por lo general, conforme el número de variables consideradas es mayor, la descripción y análisis de los datos se vuelve más compleja. A manera de ejemplo, para el caso de dos variables la matriz de varianzas-covarianzas de los datos queda definida con tres valores; para el caso de cinco variables, es necesario conocer 15 valores para identificar a dicha matriz. En forma general, para el caso de p variables, el número de valores necesarios para calcular dicha matriz está dado por la siguiente expresión

$$\frac{p(p+1)}{2} \tag{B.1}$$

esto es, dicho número crece de manera cuadrática respecto al número de variables involucradas.

Adicionalmente, suele suceder que en estas situaciones multivariadas, se presenta multicolinealidad entre las variables consideradas, lo cual plantea dificultades en cuanto a los requerimientos que deben cumplir dichas variables para poder aplicar diferentes técnicas estadísticas para el análisis de los datos.

Para afrontar esta situación, formulemos de manera un poco más técnica el problema. Partamos de la condición de que las p variables de interés toman valores reales. Así, tenemos entonces n objetos, tales que cada uno de ellos puede estar representado por un punto en un espacio de dimensión p ; a saber, en el espacio vectorial \mathbb{R}^p . Sea

$$\mathbf{x}_i = \begin{pmatrix} x_{i1} \\ x_{i2} \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ x_{ip} \end{pmatrix} \quad (\text{B.2})$$

el vector que representa al objeto i -ésimo, con $i = 1, 2, 3, \dots, n$; siendo x_{ij} el valor que toma la variable j -ésima en el objeto i -ésimo. De esta manera, el conjunto de objetos queda representado como una nube de puntos en \mathbb{R}^p .

En el caso en que la dimensión p sea grande, es asunto de primordial importancia averiguar si es posible estudiar el conjunto de datos en un espacio de dimensión menor, digamos r , con $r < p$, y obtener información análoga a la que se obtendría si estudiáramos los datos en la dimensión en que originalmente se presentan.

La técnica de Análisis de Componentes Principales es precisamente un técnica estadística multivariada que permite representar al conjunto de datos en espacios de dimensión r , con $r < p$, a datos que originalmente se encuentren representados en un espacio p -dimensional, rescatando propiedades de los mismos. Avancemos en ello.

Los n puntos en \mathbb{R}^p que conforman los datos pueden representarse mediante la matriz \mathbf{X} de dimensión $n \times p$, conformada de la siguiente manera

$$\mathbf{X} = \begin{pmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdot & \cdot & \cdot & x_{1p} \\ x_{21} & x_{22} & \cdot & \cdot & \cdot & x_{2p} \\ \cdot & \cdot & \cdot & & & \cdot \\ \cdot & \cdot & & \cdot & & \cdot \\ \cdot & \cdot & & & \cdot & \cdot \\ x_{n1} & x_{n2} & \cdot & \cdot & \cdot & x_{np} \end{pmatrix} \quad (\text{B.3})$$

En esta matriz cada renglón representa a un objeto y cada columna a una variable. Para mayor sencillez de las expresiones matemáticas, y sin pérdida de generalidad, supondremos que estos valores ya han sido centralizados; esto es, la media de cada una de las variables consideradas es cero.

Denotemos por \mathbf{S} a la matriz de varianzas-covarianzas de los datos representados en la matriz \mathbf{X} ; por definición, dicha matriz es cuadrada de dimensión $p \times p$ y tiene la siguiente forma

$$\mathbf{S} = \begin{pmatrix} s_{11} & s_{12} & \cdot & \cdot & \cdot & s_{1p} \\ s_{21} & s_{22} & \cdot & \cdot & \cdot & s_{2p} \\ \cdot & \cdot & \cdot & & & \cdot \\ \cdot & \cdot & & \cdot & & \cdot \\ \cdot & \cdot & & & \cdot & \cdot \\ s_{p1} & s_{p2} & \cdot & \cdot & \cdot & s_{pp} \end{pmatrix} \quad (\text{B.4})$$

donde s_{ii} representa la varianza de la variable i -ésima, en tanto que s_{ij} , para $i \neq j$, representa la covarianza entre las variables i -ésima y j -ésima. Esto es, las varianzas de las variables se encuentran en la diagonal de la matriz y las covarianzas en fuera de esta diagonal.

Así, la matriz de varianzas-covarianzas \mathbf{S} entonces puede expresarse, en notación matricial, mediante la siguiente forma

$$\mathbf{S} = (1/n) \mathbf{X}'\mathbf{X} \quad (\text{B.5})$$

donde \mathbf{X}' denota a la matriz transpuesta de \mathbf{X} . Observemos que la matriz de varianzas-covarianzas es un caso particular de matriz hermitiana, pues todas sus entradas son reales y, dado que por definición de covarianza siempre se tiene que $s_{ij} = s_{ji}$ para todo i, j , es también simétrica respecto a la diagonal principal [104, 105].

Tomemos ahora un vector arbitrario unitario en \mathbb{R}^p , denotado por \mathbf{a}_1 , cuya expresión en componentes es la siguiente

$$\mathbf{a}_1 = \begin{pmatrix} a_{11} \\ a_{12} \\ \cdot \\ \cdot \\ a_{1p} \end{pmatrix} \quad (\text{B.6})$$

Representemos por z_i al producto escalar del vector \mathbf{x}_i por el vector unitario \mathbf{a}_1 ; esto es, z_i está dado por

$$z_i = a_{11}x_{i1} + a_{12}x_{i2} + \dots + a_{1p}x_{ip} \quad (\text{B.7})$$

Debido a que el vector \mathbf{a}_1 tiene norma unitaria, el producto escalar realizado representa a la proyección ortogonal del vector \mathbf{x}_i en la dirección del vector unitario \mathbf{a}_1 ; el valor de esta proyección puede tomar valores positivos o negativos, incluido el cero.

Obtengamos ahora todos los productos escalares de los vectores \mathbf{x}_i , con $i = 1, 2, \dots, n$, con el vector \mathbf{a}_1 . Representemos este conjunto de valores por el vector \mathbf{z}_1 , n -dimensional; utilizando notación matricial, dicho vector está dado por

$$\mathbf{z}_1 = \mathbf{X}\mathbf{a}_1 \quad (\text{B.8})$$

Recordemos que estamos trabajando con p variables centralizadas; es decir, con p variables que tienen media cero. Por tanto, podemos asegurar que las n proyecciones en la dirección del vector \mathbf{a}_1 también tienen media cero. De aquí que la varianza de estas proyecciones, denotada por $Var(\mathbf{z}_1)$, puede ser calculada mediante la expresión

$$Var(\mathbf{z}_1) = (1/n) \mathbf{z}'_1 \mathbf{z}_1 \quad (\text{B.9})$$

donde \mathbf{z}'_1 denota el vector transpuesto del vector \mathbf{z}_1 .

Con base en las ecuaciones B.9 y B.8, podemos entonces asegurar que esta varianza puede calcularse de la siguiente forma

$$Var(\mathbf{z}_1) = (1/n) \mathbf{z}'_1 \mathbf{z}_1 = (1/n) \mathbf{a}'_1 \mathbf{X}' \mathbf{X} \mathbf{a}_1 = \mathbf{a}'_1 \mathbf{S} \mathbf{a}_1 \quad (\text{B.10})$$

donde \mathbf{a}'_1 denota el vector transpuesto del vector \mathbf{a}_1 [105, 106].

Procedamos ahora a maximizar la varianza de estas proyecciones sobre el conjunto de valores posibles que puede tomar el vector unitario \mathbf{a}_1 . Para ello, utilizaremos el Método de Multiplicadores de Lagrange [107]. Puede observarse que la varianza a maximizar es una función de p variables y tenemos como restricción la condición de que el vector \mathbf{a}_1 es unitario; esto es, la función a maximizar es

$$f(\mathbf{a}_1) = \mathbf{a}'_1 \mathbf{S} \mathbf{a}_1 \quad (\text{B.11})$$

con la ecuación de restricción siguiente

$$\mathbf{a}'_1 \mathbf{a}_1 = 1 \quad (\text{B.12})$$

Por tanto, la función a maximizar, en términos del Método de Multiplicadores de Lagrange queda formulada en la siguiente forma:

$$h(\mathbf{a}_1, \lambda) = \mathbf{a}'_1 \mathbf{S} \mathbf{a}_1 + \lambda(1 - \mathbf{a}'_1 \mathbf{a}_1) \quad (\text{B.13})$$

Procedamos a obtener los puntos críticos de esta función; para ello, derivamos parcialmente respecto a cada una de las variables de la función h . Así, en particular, obtenemos

$$\frac{\partial h(\mathbf{a}_1, \lambda)}{\partial \mathbf{a}_1} = 2\mathbf{S} \mathbf{a}_1 - 2\lambda \mathbf{a}_1 \quad (\text{B.14})$$

Finalmente, igualando a cero para obtener los puntos críticos de esta función, obtenemos que la condición que deben cumplir está dada por la siguiente ecuación:

$$\mathbf{S} \mathbf{a}_1 = \lambda \mathbf{a}_1 \quad (\text{B.15})$$

Esto es, los puntos críticos de la función h son los eigenvectores de la matriz de varianzas-covarianzas \mathbf{S} , con λ igual al correspondiente eigenvalor. Debido a que la matriz \mathbf{S} es hermitiana, se puede asegurar que sus eigenvalores son reales [108]. A partir de estas propiedades y con base en las ecuaciones B.10 y B.15, se puede afirmar que el eigenvalor λ coincide con la varianza de las proyecciones ortogonales de los puntos \mathbf{x}_i en la dirección determinada por el eigenvector \mathbf{a}_1 , veamos

$$Var(\mathbf{z}_1) = (1/n) \mathbf{z}'_1 \mathbf{z}_1 = \mathbf{a}'_1 \mathbf{S} \mathbf{a}_1 = \mathbf{a}'_1 \lambda \mathbf{a}_1 = \lambda \quad (\text{B.16})$$

Finalmente, con base en lo anterior, dentro del conjunto de eigenvectores de la matriz de varianzas-covarianzas seleccionamos aquel que determine la dirección en la que se obtiene la máxima varianza de las proyecciones; dicho eigenvector corresponde al que tenga el mayor eigenvalor asociado; dicho eigenvalor lo denotaremos como λ_1 . Esta dirección, con estas características señaladas, será la dirección que denominaremos como la dirección del primer

componente principal. Los valores de las proyecciones de los vectores \mathbf{x}_i en esta dirección conformarán así una nueva variable denominada primer componente principal.

Una vez formulado el primer componente principal, podemos ahora pasar a construir el segundo componente principal. La dirección del segundo componente principal será aquella que logre la máxima varianza de las proyecciones de los puntos \mathbf{x}_i en esa dirección, sin considerar la primera dirección ya seleccionada y asignada al primer componente principal. Para encontrar esta segunda nueva dirección procedemos de igual forma en que lo hicimos con la primera; esto es, definimos la función a maximizar e incorporamos la nueva condición de restricción. Una vez hecho esto, procedemos a obtener los puntos críticos de dicha función de la misma forma en que lo hicimos con el primer componente principal, utilizando el Método de Multiplicadores de Lagrange. Veamos, sea \mathbf{a}_2 el vector unitario cuya expresión es

$$\mathbf{a}_2 = \begin{pmatrix} a_{21} \\ a_{22} \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ a_{2p} \end{pmatrix} \quad (\text{B.17})$$

y sea \mathbf{z}_2 el vector conformado por todas las proyecciones de los datos en esa dirección, cuya expresión, por tanto, es:

$$\mathbf{z}_2 = \mathbf{X}\mathbf{a}_2 \quad (\text{B.18})$$

La varianza de las proyecciones en esta nueva dirección está dada, sabemos, por la siguiente expresión

$$\text{Var}(\mathbf{z}_2) = (1/n) \mathbf{z}_2' \mathbf{z}_2 = (1/n) \mathbf{a}_2' \mathbf{X}' \mathbf{X} \mathbf{a}_2 = \mathbf{a}_2' \mathbf{S} \mathbf{a}_2 \quad (\text{B.19})$$

Procedemos a definir la función a maximizar tomando en cuenta la nueva la nueva condición de restricción. En consecuencia, sea h la función siguiente:

$$h(\mathbf{a}_1, \mathbf{a}_2, \lambda_1, \lambda_2) = \mathbf{a}_1' \mathbf{S} \mathbf{a}_1 + \mathbf{a}_2' \mathbf{S} \mathbf{a}_2 + \lambda_1 (1 - \mathbf{a}_1' \mathbf{a}_1) + \lambda_2 (1 - \mathbf{a}_2' \mathbf{a}_2) \quad (\text{B.20})$$

Obtenemos la derivada parcial respecto a cada una de las variables de la función h ; esto es,

$$\begin{aligned} \frac{\partial h(\mathbf{a}_1, \mathbf{a}_2, \lambda_1, \lambda_2)}{\partial \mathbf{a}_1} &= 2\mathbf{S}\mathbf{a}_1 - 2\lambda_1 \mathbf{a}_1 \\ \frac{\partial h(\mathbf{a}_1, \mathbf{a}_2, \lambda_1, \lambda_2)}{\partial \mathbf{a}_2} &= 2\mathbf{S}\mathbf{a}_2 - 2\lambda_2 \mathbf{a}_2 \end{aligned} \quad (\text{B.21})$$

Al igualar a cero para obtener los puntos críticos de esta función, se observa que la condición que deben cumplir los vectores seleccionados que determinan las direcciones buscadas son las siguientes:

$$\mathbf{S}\mathbf{a}_1 = \lambda_1\mathbf{a}_1 \tag{B.22}$$

$$\mathbf{S}\mathbf{a}_2 = \lambda_2\mathbf{a}_2$$

Esto es, los puntos críticos de la función h vuelven a ser los eigenvectores de la matriz de varianzas-covarianzas \mathbf{S} , con λ_1 y λ_2 iguales a los correspondientes eigenvalores. Por tanto, podemos asegurar se cumplen las siguientes expresiones para las varianzas de las proyecciones de los puntos \mathbf{x}_i en las direcciones determinadas por los dos eigenvectores \mathbf{a}_1 y \mathbf{a}_2 :

$$Var(\mathbf{z}_1) = (1/n)\mathbf{z}'_1\mathbf{z}_1 = \mathbf{a}'_1\mathbf{S}\mathbf{a}_1 = \mathbf{a}'_1\lambda_1\mathbf{a}_1 = \lambda_1 \tag{B.23}$$

$$Var(\mathbf{z}_2) = (1/n)\mathbf{z}'_2\mathbf{z}_2 = \mathbf{a}'_2\mathbf{S}\mathbf{a}_2 = \mathbf{a}'_2\lambda_2\mathbf{a}_2 = \lambda_2$$

Con base en lo anterior, tomaremos como dirección del segundo componente principal a la dirección determinada por el eigenvector, denotado por \mathbf{a}_2 , correspondiente al eigenvalor, denotado por λ_2 , más grande dentro del conjunto de todos los eigenvalores que restan, una vez que hemos retirado a λ_1 .

Procediendo de esta manera, podemos construir p direcciones determinadas por los eigenvectores $\mathbf{a}_1, \mathbf{a}_2, \dots, \mathbf{a}_p$ de la matriz de varianzas-covarianzas \mathbf{S} , correspondientes a los eigenvalores $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_p$, con

$$\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_p \tag{B.24}$$

cumpliendo todos ellos, por su carácter de eigenvectores, la condición siguiente [105, 106]:

$$\mathbf{S}\mathbf{a}_i = \lambda_i\mathbf{a}_i, \forall i = 1, 2, \dots, p \tag{B.25}$$

Debido a que la matriz \mathbf{S} es hermitiana, dados dos cualesquiera eigenvectores de la matriz \mathbf{S} , digamos \mathbf{a}_i y \mathbf{a}_j , correspondientes a dos eigenvalores diferentes λ_i y λ_j , podemos asegurar que son ortogonales; esto es; si $\lambda_i \neq \lambda_j$, entonces

$$\mathbf{a}'_j\mathbf{a}_i = 0 \tag{B.26}$$

Con estos resultados, podemos ahora exhibir una propiedad interesante de la covarianza entre las nuevas variables \mathbf{z}_i y \mathbf{z}_j construidas, Veamos, si $i \neq j$, por la definición de covarianza y por la Ec. B.25, tenemos

$$\begin{aligned} Cov(\mathbf{z}_i, \mathbf{z}_j) &= Cov(\mathbf{z}_j, \mathbf{z}_i) = (1/n)\mathbf{z}'_j\mathbf{z}_i \\ &= (1/n)\mathbf{a}'_j\mathbf{X}'\mathbf{X}\mathbf{a}_i = \mathbf{a}'_j\mathbf{S}\mathbf{a}_i = \mathbf{a}'_j\lambda_i\mathbf{a}_i = 0 \end{aligned} \tag{B.27}$$

A partir de lo anterior, se puede entonces afirmar que la correlación entre cualesquiera dos de las nuevas variables \mathbf{z} construidas también vale cero; pues por definición, la correlación entre dos variables, supongamos \mathbf{z}_i y \mathbf{z}_j , denotada por $\rho_{\mathbf{z}_i, \mathbf{z}_j}$, está dada por la siguiente expresión

$$\rho_{\mathbf{z}_i, \mathbf{z}_j} = \frac{Cov(\mathbf{z}_i, \mathbf{z}_j)}{\sqrt{s_{ii}s_{jj}}} \tag{B.28}$$

la cual, como vemos, toma el valor cero si $i \neq j$.

Resumiendo, hasta ahora, hemos construido p nuevas variables, $\mathbf{z}_1, \mathbf{z}_2, \dots, \mathbf{z}_p$, que no están correlacionadas entre sí; estas variables son denominadas componentes principales. Recordemos que cada una de estas nuevas variables, esto es, cada uno de los componentes principales tiene la propiedad de que su varianza es precisamente el eigenvalor asociado al eigenvector que determina la dirección del componente principal correspondiente; esto es, para $i = 1, 2, \dots, p$, la varianza del componente principal \mathbf{z}_i cumple con la siguiente condición

$$Var(\mathbf{z}_i) = \lambda_i \quad (\text{B.29})$$

Con esta información, podemos entonces asegurar que la matriz de varianzas-covarianzas de los componentes principales, denotada por Λ , es una matriz diagonal de la siguiente forma [105, 106, 109]

$$\Lambda = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 & \cdot & \cdot & \cdot & 0 \\ 0 & \lambda_2 & \cdot & \cdot & \cdot & 0 \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ 0 & 0 & \cdot & \cdot & \cdot & \lambda_p \end{pmatrix} \quad (\text{B.30})$$

Finalmente, con base en la construcción de los p componentes principales, tomando en cuenta su significado y propiedades, podemos establecer ya un criterio para definir el subespacio de dimensión $r < p$ a ser utilizado para llevar a cabo el estudio de los datos.

Veamos, sabemos que la varianza total obtenida a partir de la suma de las varianzas $\sigma_{11}, \sigma_{22}, \dots, \sigma_{pp}$ de todas las variables originales es la suma de todos los elementos de la diagonal de la matriz de varianzas-covarianzas \mathbf{S} ; es decir, su traza que denotamos por $tr(\mathbf{S})$; la cual a su vez es la suma de todos sus eigenvalores. Esto significa que cada eigenvalor λ_i contribuye a una parte de la suma de las varianzas de las variables originales.

Por otro lado, sabemos también que la traza de la matriz Λ es precisamente la suma de todos los eigenvalores λ_i ; es decir, la traza de la matriz Λ , denotada por $tr(\Lambda)$. Por tanto, también mide la suma de todas las varianzas de las variables originales. Adicionalmente, sabemos que λ_i representa la varianza del componente principal \mathbf{z}_i ; así, cada eigenvalor λ_i representa la parte con la que contribuye la varianza del componente principal \mathbf{z}_i a la suma de las varianzas de las variables originales. Dicho de manera sintética, la expresión

$$\frac{\lambda_i}{tr(\Lambda)} \quad (\text{B.31})$$

representa la fracción con la que contribuye el componente principal \mathbf{z}_i a la varianza total obtenida por la suma de las varianzas de todas las variables originales.

Así, para formar el subespacio en el que serán analizados los datos, se considerarán únicamente los componentes principales que contribuyan de manera importante a la explicación de la varianza de los datos originales; los componentes principales cuyo eigenvalor sea pequeño respecto a la traza de la matriz Λ podrán no ser tomados en cuenta.

Si los primeros r eigenvalores $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_r$, con $r < p$, logran explicar buena proporción de la suma de las varianzas de las variables originales, nuestro subespacio de trabajo podrá entonces quedar definido por los primeros r eigenvectores $\mathbf{a}_1, \mathbf{a}_2, \dots, \mathbf{a}_r$; los demás eigenvectores no serán tomados en cuenta. Por tanto, habremos así construido un nuevo subespacio de trabajo.

Bibliografía

- [1] Bath-Balogh M and Fehrenbach MJ (2006). *Illustrated Dental Embriology, Histology, and Anatomy*. Second Edition. Elsevier Saunders. St. Luis, Mo, USA.
- [2] Barani A, Keown J, Bush MB, Lee JJ-W, Chai H and Lawn BR (2011). Mechanics of longitudinal cracks in tooth enamel. *Acta Biomaterialia*, 7:2285-2292.
- [3] Gómez de Ferraris ME y Campos Muñoz A (2009). *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*. 3a. Edición. Editorial Médica Panamericana. México.
- [4] Ten Cate AR (1986). *Histología Oral: Desarrollo, estructura y función*. 2a. Edición. Editorial Médica Panamericana S. A. Buenos Aires, Argentina.
- [5] Al-Jawad M, Addison O, Khan MA, James A and Hendriksz CJ. (2012). Disruption of enamel crystal formation quantified by synchrotron microdiffraction. *Journal of Dentistry*, 40:1074-1080.
- [6] Xie Z, Swain M, Munroe P and Hoffman M (2008). On the critical parameters that regulate the deformation behaviour of tooth enamel. *Biomaterials*, 22:2697-2703.
- [7] Elliot JC, Wilson RM and Dowker SEP (2002). Apatite structures. *Advances in X-ray Analysis*, 45:172-181.
- [8] Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teaford MF and Weihs TP (2002). Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Archives of Oral Biology*, 47:281-291.
- [9] Bajaj D and Arola DD (2009). On the R-curve behavior of human tooth enamel . *Biomaterials*, 30:4037-4046.

- [10] Lu C, Nakamura T and Korach CS (2012). Effective property of tooth enamel: Monoclinic behavior. *J Biomechanics*, 45:1437-1443.
- [11] Daculsi G and Kerebel B (1978). High-Resolution Electron Microscope Study of Human Enamel Crystallites: Size, Shape, and Growth. *Journal of Ultrastructure Research*, 65:163-172.
- [12] Bechtle S, Ang SF and Schneider GA (2010). On the mechanical properties of hierarchically structured biological material. *Biomaterials*, 31:6378-6385.
- [13] An B, Wang R and Zhang D (2012). Role of crystal arrangement on the mechanical performance of enamel. *Acta Biomaterialia*, 8:3784-3793.
- [14] Nanci A (2013). *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function*. Chapter 7. Enamel: Composition, Formation, and Structure. 8th Edition. Mosby, Elsevier Inc. St. Louis, Missouri, USA.
- [15] Aoba T (1997). The Effect of Fluoride on Apatite Structure and Growth. *Crit Rev Oral Biol Med*, 8(2):136-153.
- [16] Fejerskov O, Yanagisawa T, Tohda H, Larsen MJ, Josephsen K and Mosha HJ (1991). Poreruptive changes in human dental fluorosis - a histological and ultrastructure study. *Proc Finn Dent Soc*, 87(4):607-619.
- [17] Bawden JW, Crenshaw MA, Wright JT and LeGeros RZ (1995). Consideration of Possible Biologic Mechanisms of Fluorosis., *J Dent Res*, 74(7):1349-1352.
- [18] DenBesten P and Li W (2011) Chronic Fluoride Toxicity: Dental Fluorosis. , *Monogr Oral Sci*, 22:81-96.
- [19] Dean HT (1934). Classification of mottled enamel diagnosis. *Journal of American Dental Association*, 21:1421.
- [20] Funmilayo ASM and Mojirade AD (2014). Dental Fluorosis and its Indices, what's new? IOSR. *Journal of Dental and Medical Sciences*. 13(7):55-60.

- [21] Rozier RG (1994). Epidemiologic Indices for Measuring the Clinical Manifestations of Dental Fluorosis: Overview and Critique. *Adv Dent Res*, 8(1):39-55.
- [22] Thylstrup A and Fejerskov O (1978). Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histological changes. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 6(6):315-328.
- [23] Horowitz HS, Driscoll WS, Meyers RJ, Heifetz SB and Kingman A (1984). A new method for assessing the prevalence of dental fluorosis: The Tooth Surface Index of Fluorosis. *Journal of American Dental Association*, 109:37-41.
- [24] Betancourt Linares A, Irigoyen Camacho ME, Mejía González A, Zepeda Zepeda M y Sánchez Pérez L (2013). Prevalencia de fluorosis dental en localidades mexicanas ubicadas en 27 estados y el D.F. a seis años de la publicación de la Norma Oficial Mexicana para la fluoruración de la sal. *Revista de Investigación Clínica*, 65(3):237-247.
- [25] Gopalakrishnan P, Vasan RS, Sarma PS, Ravindran Nair KS and Thankappan KR (1999). Prevalence of dental fluorosis and associated risk factors in Alappuzha district, Kerala. *The National Medical Journal of India*, 12(3):99-103.
- [26] Hernández Montoya V, Bueno López JI, Sánchez Ruelas AM, García Servín J, Trejo Vázquez R, Bonilla Petriciolet A y Márquez Algara C (2003). Fluorosis y caries dental en niños de 9 a 11 años del Estado de Aguascalientes, México. *Rev Int Contam Ambient*, 19(4):197-204.
- [27] Juárez López MLA, Hernández Guerrero JC, Jiménez Farfán D y Ledesma Montes C (2003). Prevalencia de fluorosis dental y caries en escolares de la Ciudad de México. *Gac Méd Méx*, 139(3):221-225.
- [28] Beltrán Valladares PR, Cocom Tun H, Casanova Rosado JF, Vallejos Sánchez AA, Medina Solís CE y Maupomé G (2005). Prevalencia de fluorosis dental y fuentes adicionales de exposición a fluoruro como factores de riesgo a fluorosis dental en escolares de Campeche, México. *Revista de Investigación Clínica*, 57(4):532-539.
- [29] Irigoyen Camacho ME, Zepeda MA, Sánchez Pérez L y Luengas I (2006). Prevalencia de fluorosis dental en escolares, de una zona con baja concentración de flúor en agua, en la Delegación Tláhuac, D.F. *Revista de Ciencias Clínicas*, 7(1):5-11.

- [30] Irigoyen Camacho ME, Muñiz Ramírez A, Sánchez Pérez L, Huizar Álvarez R, Picquart M, Zepeda Zepeda MA y García Pérez A (2010). Fluorosis dental y prácticas de salud bucal: Estudio en una zona de Morelos con niveles de flúor en agua superiores al óptimo. *Revista de Ciencias Clínicas*, 11(1):36-44.
- [31] Molina Frechero N, Castañeda Castaneira E, Sánchez Flores A y Robles Pinto G (2007). Incremento de la prevalencia y severidad de fluorosis dental en escolares de la Delegación Xochimilco en México, D.F. *Acta Pediatr Mex*, 28(4):149-153.
- [32] Azpeitia Valadez ML, Rodríguez Frausto M y Sánchez Hernández MA (2008). Prevalencia de fluorosis dental en escolares de 6 a 15 años de edad. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 46(1):67-72.
- [33] Azpeitia Valadez ML, Sánchez Hernández MA y Rodríguez Frausto M (2009). Factores de riesgo para fluorosis dental en escolares de 6 a 15 años de edad. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 47(3):265-270.
- [34] Jiménez Farfán MD, Hernández Guerrero JC, Juárez López LA, Jacinto Alemán LF and de la Fuente Hernández J (2011). Fluoride Consumption and Its Impact on Oral Health *Int J Environ Res Public Health*. , 8:148-160.
- [35] Smekal A (1923). Zur Quantentheorie der Dispersion. *Die Naturwissenschaften*, 11(43): 873-75. DOI:10.1007/BF01576902.
- [36] Raman CV and Krishnan KS (1928). A New Type of Secondary Radiation. *Nature*, 121:501-502.
- [37] Long DA (1977). *Raman Spectroscopy*. MacGraw-Hill, Inc. Great Britain.
- [38] Tu AT (1982). *Raman Spectroscopy in Biology*. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- [39] Gardiner DJ and Graves PR (Editors)(1989). *Practical Raman Spectroscopy*. Springer Verlag, New York, USA.
- [40] Harris DC and Bertolucci MD (1989). *Symmetry and Spectroscopy. An introduction to vibrational and electronic spectroscopy*. Dover Publications, Inc. USA.

- [41] Colthup NB, Daly LH and Wiberly SE (1990). *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. Third Edition. Academic Press, Inc. USA.
- [42] Requena A y Zúñiga J (2004). *Espectroscopía*. Pearson Educación, S.A. Madrid, España.
- [43] Nárday-Szabó S (1930). The Structure of Apatite. *Zeitschrift für Kristallographie*, 75:387-398.
- [44] Mehmel M (1930). Über die Struktur das Apatites I. *Zeitschrift für Kristallographie*, 75:323-331.
- [45] Sands DE (1993). *Introducción a la cristalografía*. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España.
- [46] Posner AS, Perloff A and Diorio AF (1958). Refinement of the hydroxyapatite. *Acta Cryst*, 11:308.
- [47] Kay MI, Young RA and Posner AS (1964). Crystal Structure of Hydroxyapatite. *Nature*, 204:1050-1052.
- [48] Beevers CA and McIntyre DB (1946). The atomic structure of fluor-apatite and its relation to that of tooth and bone mineral. *Miner Mag*, 27:254-257.
- [49] Dashevskiy I, Balueva A, Todebhush P, Campbell C, Magana J and Clement N (2019). On Estimation of adhesive Strength of Implants Bioactive Coating with Titanium by Density Functional Theory and Molecular Dynamics Simulations. *Materials Research*, 22(3):e20190030.
- [50] Kittel C (2005). *Introduction to Solid State Physics*. Eighth Edition. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- [51] Behroozibakhsh M, Hajizamani H, Shekofteh K, Otadi M, Ghavami-Lahiji and Sadat Faal Nazari N (2019). Comparative assessment of crystalline structure of powder and bulk human dental enamel using X-ray diffraction analysis. *Journal of Oral Biosciences*, 61(3):173-178.

- [52] Venkataraman G and Sahni VC (1970). External Vibrations and Complex Crystals. *Reviews on Modern Physics*, 42(4):409-470.
- [53] de Aza PN, Santos C, Pazo A, de Aza S, Cuscó R y Artús L (1997). Vibrational Properties of Calcium Phosphate Compounds. 1. Raman Spectrum of β -Tricalcium Phosphate. *Chem Mater*, 9:912-915.
- [54] Iqbal Z, Tomaselli VP, Fahrenfeld O, Möller KD, Ruzsala FA and Kostiner E (1977). Polarized Raman Scattering and Low Frequency Infrared Study of Hydroxyapatite. *J Phys Chem Solids*, 38:923-927.
- [55] Bhagavantam S and Venkatarayudu T (1969). *Theory of Groups and its Application to Physical Problems*. Academic Press, Inc. USA.
- [56] de Aza PN, Guitián F, Santos C, de Aza S, Cuscó R y Artús L. (1997). Vibrational Properties of Calcium Phosphate Compounds. 2. Comparison between Hydroxyapatite and β -tricalcium Phosphate. *Chem Mater*, 9:916-922.
- [57] Adams DM and Gardner IR (1974). Single-crystal Vibrational Spectra of Apatite, Vanadinite, and Mimetite. *Journal of the Chemical Society Dalton Transactions*, 14:1505-1509.
- [58] Nakamoto K (2009). *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry*. Sixth Edition. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, USA.
- [59] Kravitz LC, Kingsley JD and Elkin EL (1968). Raman and Infrared Studies of Coupled PO_4^{3-} Vibrations. *The Journal of Chemical Physics*, 49(10):4600-4610.
- [60] Tsuda H and Arends J (1994). Orientational Micro-Raman Spectroscopy on Hydroxyapatite Single Crystals and Human Enamel Crystallites. *J Dent Res*, 73(11):1703-1710.
- [61] Sowa MG, Popescu DP, Werner J, Hewko M, Ko AC-T, Payette J, Dong CCS, Cleghorn B and Choo Smith L-P (2007). Precision of Raman depolarization and optical attenuation measurements of sound tooth enamel. *Anal Bioanal Chem*, 387:1613-1619.

- [62] González Solís JL, Martínez Cano E and Magaña López Y (2015). Early detection of dental fluorosis using Raman Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Lasers Med Sci*, 30(6):1675-1681. DOI:10.1007/s10103-014-1638-9.
- [63] Aoba T and Fejerskov O (2002). Dental Fluorosis: Chemistry and Biology. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13(2):155-170.
- [64] Fejerskov O, Larsen MJ, Richards A and Baelum V (1994). Dental Tissue Effects of Fluoride. *Adv Dent Res*, 8(1):15-31.
- [65] Yanagisawa T, Takuma T and Fejerskov O (1989). Ultrastructure and Composition of Enamel in Human Dental Fluorosis. *Adv Dent Res*, 3(2):203-210.
- [66] Cullity BD (1978). *Elements of X-Ray Diffraction*. Second Edition. Addison-Wesley Publishing Company, Inc. USA.
- [67] David WIF, Shankland K, McCusker LB and Baerlocher Ch (2002). *Structure Determination from Powder Diffraction Data*. International Union of Crystallography. Oxford University Press. USA.
- [68] Shmueli U (2007). *Theories and Techniques of Crystal Determination*. International Union of Crystallography. Oxford University Press. USA.
- [69] Goodhew PJ (1975). *Electron Microscopy and Analysis*. Wykeham Publications (London) Ltd. UK.
- [70] Secretaría de Salud. PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-007-SSA3-2017, Para la Organización y Funcionamiento de los Laboratorios Clínicos. [Health Ministry. PROJECT of Official Mexican Standard PROY-NOM-007-SSA3-2017, For the Organization and Operation of Clinical Laboratories].
- [71] Horiba Jobin Yvon T64000. User's Training Course. Doc UM-T64/En.
- [72] Horiba Jobin Yvon. LabSpec 5. User's Manual.
- [73] Beleites C, Sergo V. HyperSpec: A package to Handle Hyperspectral Data Sets in R. R package version 0.99-20180627. Available online.

- [74] Kutner MH, Nachtsheim CJ, Neter J and Li W (2005). *Applied Linear Statistical Models*. Fifth Ed. McGraw Hill International Edition. Singapore.
- [75] von Ende CN (2001). *Chap. 8. Repeated-measures Analysis. Growth and other Time-dependent Measures in Design and Analysis of Ecological Experiments*. Second Edition. Scheiner SM and Gurevitch J Eds. Oxford University Press. New York, USA.
- [76] Herliansyah MK, Hamdi M, Ide-Ektessabi A, Wildan MW and Toque JA (2009). The influence of sintering temperature on the properties of compacted bovine hydroxyapatite. *Material Science and Engineering C*, 29:1674-1680.
- [77] Venkateswarlu K, Chandra Bose A and Rameshbabu N (2010). X-ray peak broadening studies of nanocrystalline hydroxyapatite by Williamson-Hall analysis., *Physica B*, 405:4256-4262.
- [78] Pourmollaabbassi B, Karbasi S and Hashemibeni B (2016). Evaluate the growth and adhesion of osteoblast cells on nanocomposite scaffold of hydroxyapatite/titania coated with poly hydroxybutyrate. *Advanced Biomedical Research*, IP:184.174.98.45.
- [79] Webster TJ, Massa-Schlueter EA, Smith JL and Slamovich EB (2004). Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations. *Biomaterials*, 25:2111-2121.
- [80] Klug HP and Alexander LE (1974). *X-Ray Diffraction Procedures*. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.
- [81] Reyes-Gasga J, Koudriavtseva O, Herrera-Becerra R and Escobosa A (2015). XRD Characterization of Crystallinity of Human Tooth Enamel under Influence of Mechanical Grinding. *Materials Sciences and Applications*, 6:464-472.
- [82] Buchwald T, Okulus Z, Szybowicz M (2017). Raman Spectroscopy as a Tool of Early Dental Caries Detection - New Insights. *J. Raman Spectrosc*, 48(8):1094-1102.
- [83] Fraser SJ, Natarajan AK, Clark ASS, Drummond BK, Gordon KC (2015). A Raman Spectroscopic Study of Teeth Affected with Molar – Incisor Hypomineralisation. *J Raman Spectrosc*, 46(2):202-210.
- [84] Xu C, Reed R, Gorski JP, Wang Y, Walker MP (2012). The Distribution of Carbonate in Enamel and Its Correlation with Structure and Mechanical Properties. *J Mater Sci*,

47(23):8035–8043.

- [85] Gong B, Oest ME, Mann KA, Damron TA, Morris MD (2013). Raman Spectroscopy Demonstrates Prolonged Alteration of Bone Chemical Composition Following Extremity Localized Irradiation. *Bone*, 57(1):252-258.
- [86] Zavala-Alonso V, Loyola-Rodríguez JP, Terrones H, Patiño-Marín N, Martínez-Castañón GA, Anusavice K (2012). Analysis of the Molecular Structure of Human Enamel with Fluorosis Using Micro-Raman Spectroscopy. *J Oral Sci*, 54(1):93-98.
- [87] Martinez-Mier EA, Shone DB, Buckley CM, Ando M, Lippert F, Soto-Rojas AE (2016). Relationship between Enamel Fluorosis Severity and Fluoride Content. *J Dent*, 46(317):42-46.
- [88] Suga S (1989). Enamel Hypomineralization Viewed from the Pattern of Progressive Mineralization of Human and Monkey Developing Enamel. *Adv Dent Res*, 3(2):188-198.
- [89] Sajda P (2006). Machine Learning for Detection and Diagnosis of Disease. *Annu Rev Biomed. Eng*, 8(1):537-565.
- [90] Gamal Ga, Al-Mufadi FA and Said AH (2013). Effect of Iron Additives on Microstructure of Hydroxyapatite. , *Engineering, Technology & Applied Science Research* 3(6):532-539.
- [91] Shinoda H and Ogura H (1978). Scanning electron Microscopical Study on the Fluorosis of Enamel in Rats. *Calcified Tissue Research*, 25:75-83.
- [92] Jie M, Ping Y, Zhou X, Zhi L, QianqianZ, Haiyang Y and Shanshan G (2018). Investigation on the Gradient Nanomechanical Behavior of Dental Fluorosis Enamel. *Nanoscale Research Letters*, 13:347.
- [93] Sereda V, Ralbovsky NM, Vasudev MC, Naik RR, Lednev IK (2016). Polarized Raman Spectroscopy for Determining the Orientation of Di-D-Phenylalanine Molecules in a Nanotube. *J Raman Spectrosc*, 47(9):1056-1062.
- [94] Mohanta A (2018). Dental Fluorosis - Revisited. *Biomed J Sci Tech Res*, 2(1).

- [95] Susheela AK, Toteja GS (2018). Prevention and Control of Fluorosis and Linked Disorders: Developments in the 21st Century - Reaching out to Patients in the Community and Hospital Settings for Recovery. *Indian J Med Res*, 148(5):539-547.
- [96] Vigil GO (2009). *Introducción a la física del estado sólido*. Primera Edición. Instituto Politécnico Nacional, México.
- [97] Picquart M y Vigil O (2009). *Física del estado sólido con Aplicaciones. Problemas Resueltos*. Primera Edición. Editorial Trillas. México.
- [98] Clegg W (2008). *Crystal Structure Determination*. Oxford University Press. Great Britain.
- [99] Bernstein J, Desiraju GR, Helliwel JR, Mak T, Müller P, Paufler P, Schenk H, Spadon P and Viterbo D (2009). *Crystal Structure Analysis. Principles and Practice*. International Union of Crystallography Oxford University Press. Great Britain.
- [100] Chandra S (2009). *Molecular Spectroscopy*. Alpha Science International Ltd. Oxford. UK.
- [101] Herstein IN (1976). *Álgebra Moderna*. Editorial Trillas. México.
- [102] Levine IN (1975). *Molecular Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- [103] Bhagavantam S and Venkatarayudu T (1969). *Theory of Groups and its Application to Physical Problems*. Academic Press. USA.
- [104] Mendenhall W, Scheaffer RL and Wackerly DD (1986). *Estadística Matemática con Aplicaciones*. Grupo Editorial Iberoamericana. México.
- [105] Dillon W and Goldstein M (1984). *Multivariate Analysis. Methods and Applications*. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- [106] Manly BFJ (1994). *Multivariate Statistical Methods. A Primer*. Second Edition. Chapman & Hall.
- [107] Sagan H (1974). *Advanced Calculus*. Houghton Mifflin Company. USA.
- [108] Noble B (1969). *Applied Linear Algebra*. Prentice-Hall, Inc. USA.
- [109] Johnson DE (2000). *Métodos multivariados aplicados al análisis de datos*. International Thomson Editores. México.