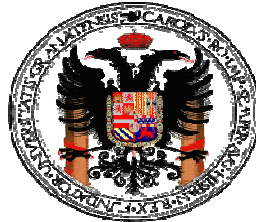


UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA



Efecto del Peróxido de Hidrógeno y
Carbamida sobre la Capacidad
Descalcificante del Acido Fosfórico
sobre el Esmalte

TESIS DOCTORAL

Carmen Lucia Soares Gomes de Medeiros
Granada - 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Carmen Lucia Soares Gomes de Medeiros
D.L.: GR.1729-2008
ISBN: 978-84-691-5242-3

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA**



**Efecto del Peróxido de Hidrógeno y
Carbamida sobre la Capacidad
Descalcificante del Acido Fosfórico
sobre el Esmalte**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

Carmen Lucia Soares Gomes de Medeiros

DIRIGIDA POR:

Prof. Dr. Santiago González López

Profa. Dra. Purificación Sánchez Sánchez

Profa. Dra. Maria Victoria Bolaños Carmona

Granada - 2008
UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA



Efecto del Peróxido de Hidrógeno y Carbamida sobre la Capacidad Descalcificante del Acido Fosfórico sobre el Esmalte

Memoria de Tesis Doctoral Presentada por Carmen Lucia
Soares Gomes de Medeiros, para optar al grado de
Doctora en Odontología.

Granada, Junio de 2008

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'C. Medeiros', with a long horizontal line extending to the right.

Fdo.: Carmen Lucia Soares Gomes de Medeiros



Universidad de Granada



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

SANTIAGO GONZALEZ LOPEZ, Profesor Titular del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada

CERTIFICA:

Que la alumna Carmen Lucia Soares Gomes de Medeiros ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado "EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y CARBAMIDA SOBRE LA CAPACIDAD DESCALCIFICANTE DEL ÁCIDO FOSFÓRICO SOBRE EL ESMALTE" y que este trabajo reúne los requisitos exigidos por la ley para ser presentado como Tesis Doctoral.

En Granada a 2 de junio del 2008

Fdo.- Santiago González López



Universidad de Granada



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

MARÍA VICTORIA BOLAÑOS CARMONA, Profesora Titular del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada

CERTIFICA:

Que la alumna Carmen Lucia Soares Gomes de Medeiros ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado "EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y CARBAMIDA SOBRE LA CAPACIDAD DESCALCIFICANTE DEL ÁCIDO FOSFÓRICO SOBRE EL ESMALTE" y que este trabajo reúne los requisitos exigidos por la ley para ser presentado como Tesis Doctoral.

En Granada a 2 de junio del 2008

Fdo.- María Victoria Bolaños Carmona



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GRANADA
18071 - GRANADA (España)

M^a PURIFICACIÓN SÁNCHEZ SÁNCHEZ, Profesora Titular del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada

CERTIFICA:

Que la alumna Carmen Lucia Soares Gomes de Madeiros ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado “EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y CARBAMIDA SOBRE LA CAPACIDAD DESCALCIFICANTE DEL ÁCIDO FOSFÓRICO SOBRE EL ESMALTE” y que este trabajo reúne los requisitos exigidos por la ley para ser presentado como Tesis Doctoral.

En Granada a 2 de junio del 2008

Fdo.- M^a Purificación Sánchez Sánchez

Dedicatoria

Dedico este trabajo de investigación al mi marido Pedro Paulo y mis hijas Paula Danielle e Isabela Alice, por permanecieren a mi lado, durante esa trayectoria académica y de vida.

Agradecimientos

Quiero hacer expreso mis agradecimientos, a todos que me apoyaron con su valiosa cooperación para la realización de ese trabajo de investigación, especialmente:

- © A Dios doy las gracias, por concluir más una etapa en mi vida académica;
- © A todos mis familiares que siempre creyeron en mí;
- © A Profesor Santiago González López mi gratitud, por las orientaciones, enseñándome y contribuyendo para la realización de este trabajo;
- © A Profesora Purificación Sánchez-Sánchez o sencillamente Prof^a Puri, por su disponibilidad, enseñanza, humildad que le hacer magnífica y por su incentivo personal;
- © A Profesora Victoria Bolaños, por su disponibilidad, enseñanza, ayuda en la estadística, por sus palabras de ánimo, incentivo personal;
- © Al Profesor Alejandro por su contribución académica y científica en esta investigación.
- © A Yudi, responsable por el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología, por la paciencia y sabiduría en transmitir a los

- © principiantes la practica del primeros pasos en el saber investigar;
- © À Bendy del Centro de Documentación Científica de la Universidad de Granada, responsable por las análisis de la Electrofotometría de Absorción Atómica;
- © Al Prof. Alberto Rodríguez Archilla por el apoyo y orientación desde el principios del doctorado;
- © A amiga querida que con el tiempo os quedémonos hermanas: Aline Savariz.
- © A Todos mis amigos(as) brasileños que he conocidos en España.
- © A Universidad de Granada (España) y Universidade Estadual da Paraíba (Brasil)

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

RESUMO

ABSTRACT

1 JUSTIFICACIÓN	18
2 INTRODUCCIÓN	22
2.1 ETIOLOGÍA DE LAS ALTERACIONES DE COLOR	23
2.1.1 Factores Externos o Extrínsecos	23
2.1.2 Factores Internos o Intrínsecos	24
2.2 AGENTES BLANQUEADORES	25
2.2.1 Agentes blanqueadores usados en la Consulta	25
2.2.1.1 Peróxido de Hidrógeno	25
2.2.1.2 Peróxido de Carbamida	26
2.2.1.3 Perborato de Sodio	27
2.2.1.4 Ácido Clorhídrico	27
2.2.2 Agentes Blanqueadores Usados en el Domicilio	28
2.2.2.1 Peróxido de Carbamida	28
2.2.2.2 Peróxido de Hidrógeno	29
2.3 MECANISMO DE ACTUACIÓN DE LOS AGENTES BLANQUEADORES	30
2.4 HISTOLOGIA DEL ESMALTE.....	31
2.4.1 Composición Química del Esmalte	33
2.4.2 Estructura Histológica del Esmalte	36
2.5 EFECTO DEL GRABADO EN ESMALTE DENTAL POR ÁCIDO FOSFÓRICO.....	36
2.6 EFECTO DEL BLANQUEAMIENTO SOBRE LA ESTRUCTURA DENTAL	38
2.6.1 Efecto en la Morfología y Pérdida Mineral	39
2.6.2 Efectos en las Propiedades Físicas del Esmalte	46
2.6.3 Efecto en Subsuperficie	53
2.6.4 Efecto en la Estructura Molecular de Esmalte y Dentina	57
2.6.5 Efecto en los Materiales de Restauración	58
2.6.6 Efecto en la Adhesión	59
2.7 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA	62
2.8 ESPECTROSCOPIA.....	65
2.8.1 Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR)	65
2.8.2 Espectroscopia de Infrarrojo – ATR (Reflectancia Total Atenuada)	69
2.8.3 Espectroscopia de Raman	72
2.9 DIFRACCIÓN DE Rayo X	74
2.10 MÉTODOS TÉRMICOS Y CALORIMÉTRICOS	76

3 HIPÓTESIS	78
4 OBJETIVOS	80
4.1 OBJETIVO GENERAL	81
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	81
5 MATERIALES Y METODOS	83
5.1 MATERIALES	84
5.2 MÉTODOS	87
5.2.1 Diseño del Estudio	87
5.2.2 Selección de la Muestra	87
5.2.3 Preparaciones de los Especímenes	88
5.3 SUSTANCIAS BLANQUEADORAS UTILIZADAS EN LA INVESTIGACIÓN	90
5.3.1 Peróxido de Carbamida (PC).....	90
5.3.2 Peróxido de Hidrógeno (PH)	91
5.4 DIVISIÓN DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.....	94
5.4.1 Tratamiento con Peróxido de Carbamida.....	94
5.4.2 Tratamiento con Peróxido de Hidrogeno	96
5.5 DISEÑO DEL EXPERIMENTO	97
5.6 DETERMINACIÓN DE CALCIO	100
5.7 ESTUDIO EN FASE SÓLIDA DE LAS MUESTRAS DE ESMALTE	103
5.7.1 Preparación de las Muestras	103
5.7.2 Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR).....	108
5.7.3 Espectroscopia de Infrarrojo – ATR.....	109
5.7.4 Espectroscopia Raman.....	110
5.7.5 Difracción de Rayos X.....	111
5.7.6 Analizador Termogravimétrico.....	113
5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	115
6 RESULTADOS	116
6.1 RESULTADOS CON PERÓXIDO DE CARBAMIDA	117
6.2 RESULTADOS CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	120
6.3 COMPARACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE CALCIO ENTRE LOS DOS MATERIALES BLANQUEADORES: PERÓXIDO DE CARBAMIDA Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	123
6.4 RESULTADOS DEL ESTUDIO EN FASE SÓLIDA	128
6.4.1 Análisis de los Espectros de Infrarrojo.....	129
6.4.2. Análisis de los Espectros de IR por ATR	137
6.4.3. Análisis de los Espectros Raman.....	138
6.4.4 Difracción de Rayos X.....	139
6.4.5 Análisis Termogravimétrico.....	143
7 DISCUSIÓN	145
7.1 EFECTO DESCALCIFICANTE DEL PERÓXIDO DE CABAMIDA.	148
7.2 EFECTO DESCALCIFICANTE DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	154
7.3 COMPARACIÓN ENTRE PERÓXIDO DE CARBAMIDA Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	161
8 CONCLUSIONES	166
BIBLIOGRAFÍAS	169
ANEXO (PRODUCCIÓN CIENTÍFICA)	189

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Composición del esmalte dental.	32
Figura 2 - Secuencia de la preparación del espécimen.....	89
Figura 3 - Especímenes cortados 4 x 4mm.....	89
Figura 4 – Lupa y balanza.	90
Figura 5 - Agente blanqueador (Peróxido de Carbamida al 30%)	91
Figura 6 – Agente blanqueador (Peróxido de Hidrógeno al 30%)	92
Figura 7- La secuencia utilizada para la preparación de la sustancia blanqueadora.	93
Figura 8 - Secuencia del los procedimientos experimentales.....	99
Figura 9 - Espectrofotómetro de Absorción Atómica - Perkin Elmer mod 5100 ZL.....	100
Figura 10 – Esquema gráfico para los cálculos de mg deCa ²⁺	102
Figura 11 – Mortero de Ágata.....	104
Figura 12 – Tamices.....	104
Figura 13 – Centrifuga.....	107
Figura 14 – Balanza METLER Toledo AX 26.....	107
Figura 15 - TERMO NICOLET IR 200.....	108
Figura 16 - Prensa SPECAC.....	109
Figura 17 – Golden Gate Single Reflection Diamond ATR System de Specac	110
Figura 18 - Módulo FT-RAMAN, BRUKER FRA 10.....	111
Figura 19 - Equipo de difracción de monocristal con detector de área (Bruker Smart Apex, Alemania) usado para microanálisis en diferentes puntos del diente.	112
Figura 20- Equipo de difracción de polvo con detector puntual (Bruker D-8 Advanced Alemania).....	105
Figura 21 – Termograviméto (TG).....	113

Figura 22 – Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC).	114
Figura 23 – Ca ²⁺ extraído (mg) en cada uno de los grupos experimentales (PC) en función del tiempo de aplicación del ácido.....	118
Figura 24 – Ca ²⁺ extraído (mg) en cada uno de los grupos experimentales (PH) en función del tiempo de aplicación del ácido.	123
Figura 25 – Representación de los valores promedio de Ca ²⁺ extraídos en los especímenes blanqueados con PC o PH, para cada tiempo de exposición al ácido.	125
Figuras 26 - Los perfiles de descalcificación en función del tiempo del peróxido de carbamida y peróxido de hidrógeno, en el grupo experimentales BL-I.	128
Figura 27 - Los perfiles de descalcificación en función del tiempo del peróxido de carbamida y peróxido de hidrógeno, en los grupos experimentales BL-24h.	128
Figura 28 - Los perfiles de descalcificación en función del tiempo del peróxido de carbamida y peróxido de hidrógeno, en los grupos experimentales BL-72h.	128
Figura 29 - Los perfiles de descalcificación en función del tiempo del peróxido de carbamida y peróxido de hidrógeno, en los grupos experimentales BL-7d.	128
Figura 30 - Espectro IR correspondiente al fondo (CO ₂ y H ₂ O).....	130
Figura 31 - Espectro infrarrojo de la muestra control de esmalte (F-2).	131
Figura 32 - Espectros infrarrojos de esmalte tratados con ácido fosfórico a 1, 2, 3, 5, 10, 15, 30 y 90 minutos.....	132
Figura 33 - Espectros de Infrarrojo del control y muestra tratada con peróxido (Exp 2PH) y peróxido más ácido fosfórico (Exp 2 ácido+PH).....	133
Figura 34 - Espectro de infrarrojos de un hueso donde aparecen los picos de las bandas principales de la parte orgánica y de la parte mineral. (A) La región de 1950-1350 cm ⁻¹ contiene tres picos asociados a los grupos amida del colágeno del hueso y un cuarto pico asociado a los grupos carbonatos. (B) La banda de 1200-900 cm ⁻¹ , se compone de siete picos asociados a grupos fosfatos con diferente entorno molecular. Los picos HCP están asociados a apatito altamente cristalino y los PCP a apatito pobremente cristalino. Los picos se pueden resolver usando programas informáticos de deconvolución como PeakFit	134
Figura 35 - Efecto del tratamiento con ácido fosfórico diluido sobre el grado de mineralización a diferentes tiempos.	136
Figura 36 - Espectro de ATR de la muestra control de esmalte donde se indica las energías de los grupos funcionales del esmalte	137

Figura 37 - Espectro Raman de la muestra control de esmalte (F-2).	139
Figura 38 - Difractograma en polvo de rayos X: A) Muestra tratada con ácido 90 minutos; en rojo patrón de hidroxiapatito cálcico. B) Muestra control.	140
Figura 39 - Análisis puntuales por difracción de rayos X del esmalte del diente usando un difractómetro con detector de área (Smart Apex, Bruker). En el patrón 2D (izq) aparecen arcos indicativos de una orientación preferencial de los cristales de apatito en el esmalte. A partir de este patrón 2D se calculó el diagrama de polvo equivalente (derecha) que muestra picos muy bien definidos y que indican que el esmalte tiene una alta cristalinidad (comparado con la dentina de más baja cristalinidad y que produce picos más anchos). Asimismo, se muestra el patrón de apatito (fosfato cálcico) superpuesto (en rojo) y con el que hay un gran acuerdo.....	142
Figura 40 (A y B) - Diagramas de TG (A) y DSC (B) del esmalte sin tratar y tratado con ácido fosfórico durante 90 minutos	144

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 - Organización de la muestras con Peróxido de Carbamida (PC) y Peróxido Hidrogeno (PH)	95
Tabla 2 - Grupos de estudios con Peróxido de Carbamida.....	96
Tabla 3 - Grupos de estudios con Peróxido de Hidrógeno.....	97
Tabla 4 - Formulación de la saliva artificial utilizada.....	100
Tabla 5 – Fracciones de muestras.....	104
Tabla 6 - Muestras de esmalte tratadas con ácido fosfórico y peróxido de hidrógeno.....	106
Tabla 7 - Relación del tratamiento blanqueador con Peróxido de Carbamida al 30% y del tiempo de exposición al ácido fosfórico al 37% con respecto a los miligramos de calcio extraídos.	119
Tabla 8 - Relación del tratamiento blanqueador con Peróxido de Hidrógeno al 30% y del tiempo de exposición al ácido fosfórico al 37% con respecto a los miligramos de calcio extraídos.....	122
Tabla 9 - Cantidad promedio de Ca^{2+} calcio extraído por el ácido después de la aplicación de PC y PH.	124
Tabla 10 - Comparación de los valores promedio de Ca^{2+} extraído en los especímenes blanqueados con PC o PH, en función del tiempo de exposición al ácido fosfórico.....	125
Tabla 11 - Comparación entre la cantidad de Ca^{2+} extraído en cada periodo de tiempo de exposición al ácido para cada uno de los grupos de blanqueamiento.....	127
Tabla 12 - Asignaciones de las bandas de FTIR de esmalte.....	138

RESUMEN

Los objetivos de este estudio fueron medir la capacidad desmineralizante del ácido fosfórico al 37% en esmalte bovino en períodos de tiempo diferentes (0 h, 24 h, 72 h, y 7 días) después de realizar un blanqueamiento con el peróxido de carbamida al 30% (Vivastyle[®]) y peróxido de hidrógeno al 30% (Illumine Office[™]). Se obtuvieron cinco secciones de 4x4mm del esmalte de cada corona de 25 incisivos bovinos. Después de aplicar los agentes blanqueadores durante 90 minutos, los especímenes fueron almacenados en la saliva artificial durante 0h, 24 h, 72 h y 7 días, y posteriormente sumergidos en una solución de ácido fosfórico al 37%. A los 15, 30, 60, 90 y 120 segundos, se extrajeron alícuotas de 5ml. Los especímenes de los grupos controles no fueron blanqueados. El Ca^{2+} presente en la solución de ácido fosfórico se midió mediante Espectroscopia de Absorción Atómica y adicionalmente se realizaron estudios de FTIR, ATR, Raman y DRX sobre muestras de esmalte finamente pulverizado. El ácido fosfórico extrajo una mayor cantidad de Ca^{2+} del esmalte después de la aplicación de peróxido de carbamida al 30% (Vivastyle[®]) y peróxido de hidrógeno al 30% (Illumine Office[™]). En los grupos blanqueados con peróxido de carbamida al 30% la mayor cantidad de Ca^{2+} pasó a la solución de ácido fosfórico en los primeros 30 segundos de inmersión. A las 24 h la cantidad de Ca^{2+} extraído fue significativamente mayor en relación al control, estas diferencias fueron más evidentes a las 72h y persistieron a la semana. Cuando el blanqueamiento se realizó con peróxido de hidrógeno se perdió más Ca^{2+} cuando la inmersión en ácido fosfórico se realizó inmediatamente y a las 24h tras el blanqueamiento. Aunque el peróxido de hidrógeno ocasiona una mayor extracción de calcio, no se encontraron diferencias significativas con respecto al peróxido de carbamida

Palabras clave: peróxido de carbamida; peróxido de hidrógeno; descalcificación; ácido fosfórico; esmalte; espectrofotometría.

ABSTRACT

The objectives proposed on this study were to measure the demineralizing capability of the phosphoric acid at 37% in bovine enamel in different periods of time (0h, 24h, 72h, and 7 days) after clearing with carbamide peroxide at 30% (Vivastyle®) and hydrogen peroxide at 30% (Illumine Office™). It was obtained five 4x4mm sections of enamel of each crown of 25 bovine incisive teeth. After applying the clearing agents during 90 minutes, the samples were stored in artificial saliva during 0h, 24h, 72h, and 7 days, and then were submersed in a phosphoric acid solution at 37%. At 15, 30, 60, 90 and 120 seconds, were extracted 5ml aliquots. The control groups' samples weren't cleared. The Ca^{2+} present in the phosphoric acid solution were verified by Atomic Absorption Spectroscopy, and, additionally, studies of FTIR, ATR, Raman and DRX were made on samples of very fine dust of enamel. The phosphoric acid extracted a greater quantity of Ca^{2+} of the enamel after the application of carbamide peroxide at 30% (Vivastyle®) and hydrogen peroxide at 30% (Illumine Office™). On the groups cleared with carbamide peroxide at 30%, the greatest quantity of Ca^{2+} outstripped the phosphoric acid solution at the firsts 30m seconds of insertion. At 24h the quantity of Ca^{2+} extracted was significantly bigger than the control group; these differences were more evident at 72h and persisted by all the week. When the clearing was made by hydrogen peroxide, there was a greater loss of Ca^{2+} , when submersed immediately in phosphoric acid and at 24h after the clearing made. Even though the hydrogen peroxide have occasioned a bigger extraction of calcium, wasn't found significant difference when compared with the carbamide peroxide.

Keywords: carbamide peroxide; hydrogen peroxide; decalcification; phosphoric acid; enamel; photospectroscopy;

Justificación

1 JUSTIFICACIÓN

Actualmente muchas personas desean mejorar el aspecto de sus dientes, y se someten a tratamiento de blanqueamiento dental sin reflexiones sobre sus posibles efectos adversos. El blanqueamiento dental es el tratamiento de elección para tener dientes blancos^{1, 2,3}.

La ADA ha expresado su preocupación con respecto a la seguridad de los productos blanqueadores, principalmente los utilizados de forma incontrolada en el hogar, y ha recomendado limitar inicialmente su uso hasta que se haya establecido totalmente su seguridad. Todavía sigue su uso y las preocupaciones por la seguridad de esos materiales blanqueadores^{1, 4}.

Existe un amplio conocimiento sobre las características de la desmineralización ocasionada por el grabado ácido del esmalte, que no tiene consecuencias perjudiciales cuando es correctamente usado⁵. Los resultados de varias investigaciones han informado que los productos blanqueadores ocasionan desmineralización de las estructuras dentales e incrementa la ocasionada por el grabado ácido del esmalte^{1, 5, 6}.

Es de suma importancia que el dentista tenga conocimientos actualizados acerca de los agentes blanqueadores, de sus posibles efectos adversos y de las distintas técnicas para prevenirlos⁴.

En la actualidad hay pocos estudios sobre la pérdida mineral dental provocada por el uso del material blanqueador o su influencia sobre otros procedimientos odontológicos rutinariamente utilizados en la clínica diaria. En vista del expuesto anteriormente, este trabajo de investigación se propone evaluar la influencia del blanqueamiento con peróxido de carbamida y peróxido de hidrógeno al 30% sobre el poder descalcificante del ácido fosfórico al 37%, inmediatamente después y en diferentes períodos de demora 24hs, 72hs y 7 días y en diferentes períodos de aplicación 15, 30, 60, 90 y 120 segundos.

Introducción

2 INTRODUCCIÓN

El blanqueamiento dental es una técnica relativamente simple y conservadora que posibilita el restablecimiento del color y la recuperación de la estética dental.^{3,7, 8, 9, 10}

Los primeros casos de blanqueamiento dental fueron realizados a finales del siglo XIX^{3, 9}, pero no se popularizaron hasta la década de los 70, cuando se consiguieron los primeros resultados satisfactorios en tinciones por tetraciclinas. En 1989 Haywood y Heymann¹¹ publicaron con detalle la técnica de blanqueamiento domiciliario mediante la aplicación de peróxido de carbamida. A partir de ese momento se ha divulgado enormemente el blanqueamiento domiciliario y su mayor incremento ha ocurrido en los últimos diez años¹¹

Recientemente, se ha empezado a alternar el blanqueamiento realizado en casa por el paciente con el realizado en la consulta¹. La posibilidad de abuso del uso de blanqueadores por los pacientes en su casa sin la supervisión del dentista es actualmente preocupante^{7, 13}.

El tratamiento blanqueador se considera seguro y no destructivo, para eliminar descoloraciones de diente. Sin embargo, a pesar de su extendido uso, no hay consenso sobre el efecto de los agentes blanqueadores sobre el esmalte. Algunos investigadores no han observado ningún efecto deletéreo sobre el esmalte o la dentina después de las aplicaciones de altas concentraciones de agua

oxigenada usada como blanqueador¹¹. Sin embargo, numerosos estudios *in vitro* han observado efectos negativos de las terapias blanqueadoras sobre las propiedades físicas, la integridad marginal del esmalte y color de materiales restauradores.¹⁴

2.1 ETIOLOGÍA DE LAS ALTERACIONES DE COLOR

La etiología de las alteraciones de color de los dientes es multifactorial, ya que diferentes partes del diente pueden aceptar distintos tipos de manchas¹⁵. El oscurecimiento del diente puede ser ocasionado por distintos factores, esta decoloración de las piezas dentarias es un problema que afecta a un gran parte de la población. Entre los múltiples tratamientos que existen para solucionar este problema destaca el blanqueamiento dental^{7, 16, 17}

Las alteraciones de color de los dientes se clasifican según la literatura en las causadas por factores externos o extrínsecos y las causadas por influencia factores internos o intrínsecos, que pueden ser congénitas o adquiridas.

2.1.1 Factores Externos o Extrínsecos:

Diversos agentes externos pueden manchar o dañar la superficie de los dientes, a través de su incorporación a la película adquirida. Son los más frecuentes,

causando alteraciones superficiales del color. Las manchas más frecuentes son: café, té negro, tabaco, pipas, vino tinto, marihuana, mascar tabaco, coca-cola, frutos silvestres, placas bacterianas, mala higiene oral, uso excesivo de productos para enjuague, metales, taninos y cromógenos. El blanqueamiento en los casos citados puede ser eficaz. Es importante que el paciente sea consciente que el abandono de sus hábitos permitirá un efecto más duradero del blanqueamiento^{5, 6, 15,16, 19, 20,21,22, 23,24}.

2.1.2 Factores Internos o Intrínsecos:

Son aquellas producidas por sustancias cromógenas en el interior de las estructuras dentarias. Ese tipo de manchas son mucho más complicadas y difíciles de tratar por afectar tanto al esmalte como a la dentina. Generalmente esas manchas solo pueden eliminarse mediante blanqueamiento dental o procedimientos más radicales²⁴.

Las manchas internas más frecuentes son las ocasionadas por la herencia, fluorosis y tetraciclinas. A demás de otras causas como: traumatismos durante la formación dentaria; necrosis pulpar; hemorragia intrapulpar debida a traumatismo; hipercalcificación dentaria; caries dental; uso de selladores de conductos radiculares a base de nitratos; ictericia grave; eritroblastosis fetal; deficiencia vitamínica; fenilcetonuria; tinciones debidas a la edad (envejecimiento); restauraciones degradadas; restauraciones metálicas y otros materiales usados en las restauraciones dentales pueden producir tinciones^{5, 6,15,16,18,19,20,21,22,23}.

2.2 AGENTES BLANQUEADORES

Actualmente los agentes blanqueadores más utilizados son el peróxido de hidrógeno y el peróxido de carbamida. Ambos pueden ser aplicados tanto en la consulta como en el domicilio o en una asociación de ambas técnicas²⁰

2.2.1 Agentes Blanqueadores usados en la consulta

2.2.1.1 Peróxido de Hidrógeno

Este agente blanqueador, parece ser el producto más eficaz para blanquear los dientes²⁵. Se puede utilizar asociado con el perborato de sodio en forma de pasta. Habitualmente se utiliza a concentraciones del 30 o el 35%, pero puede ser usado a concentraciones más bajas. El peróxido de hidrógeno es el agente blanqueador que habitualmente se utiliza en la consulta tanto en dientes vitales como no vitales^{8, 25,26}.

La mayoría de los agentes blanqueadores contienen peróxido de hidrogeno, siendo habitual su presentación comercial en gel. Para potenciar su acción de

decoloración, se ha recomendado aplicar una fuente de calor, pero debido a su elevada causticidad, es necesario realizar una técnica muy cuidadosa.

Los geles blanqueadores usados en los tratamientos ambulatorios se deben aplicar con una férula termoplástica, que tiene como objetivo mantener un contacto prolongado entre el gel blanqueador y los dientes. Es importante que tenga un buen ajuste, para que el producto no se disuelva rápidamente en la saliva, lo que reduciría su eficacia.

2.2.1.2 Peróxido de Carbamida:

El uso del peróxido de carbamida inicialmente se introdujo como antiinflamatorio en heridas de guerra²⁷. Posteriormente se extendió a otras especialidades²⁷. El peróxido de carbamida se considera una alternativa segura al blanqueamiento vital con PH^{3,28}.

Habitualmente se usa a una concentración del 10 al 15%. El peróxido de carbamida se descompone en peróxido de hidrogeno y urea. El peróxido de hidrógeno a su vez se transforma en oxígeno reactivo y agua. Para el blanqueamiento en la consulta habitualmente se utiliza a concentraciones que van del 30 al 44%^{19, 29,30, 32}. Casi siempre se añade carbopol y otros espesantes para producir un gel o pasta para mejorar las propiedades del material.

2.2.1.3 Perborato de Sodio:

El perborato de sodio es un polvo blanco, alcalino y cristalino que, en contacto con el agua, se descompone en metaborato de sodio, peróxido de hidrógeno y oxígeno^{8, 22, 29,32}. Su uso está indicado en el tratamiento blanqueador de los dientes no vitales. Se puede usar solo o conjuntamente con peróxido de hidrogeno, con el objetivo de aumentar su poder blanqueador. Al mezclar los dos componentes se obtiene una pasta espesa que se coloca en el interior de la cámara pulpar. La mayor parte de las preparaciones son alcalinas, ya que permiten un mejor manejo y mayor seguridad.

2.2.1.4 Ácido Clorhídrico

Aunque no es un verdadero agente blanqueador, sus aplicaciones justifican su presencia en la revisión de los tratamientos de las pigmentaciones dentales. Se utiliza en la técnica de la microabrasión asociado a otros compuestos como la piedra pómez y el agua oxigenada. El ácido clorhídrico es altamente cáustico y por lo tanto es el más peligroso de todos los agentes blanqueadores³⁰

El ácido clorhídrico es un potente agente descalcificante. No actúa selectivamente y descalcifica tanto la estructura dentaria sana como las manchas. Si se asocia el ácido clorhídrico con agentes abrasivos, se elimina completamente el esmalte junto con la mancha³⁰.

2.2.2. Agentes Blanqueadores Usados en el Domicilio

El blanqueamiento domiciliario es una técnica simple, en la que el dentista confecciona una férula, para que el paciente la utilice con el agente blanqueador en su casa y vuelva al consultorio una vez por la semana, para que el dentista pueda supervisar y monitorizar su uso¹⁶. Los productos usados se basan en peróxido de carbamida en concentraciones que van del 10% al 22%, y en peróxido de hidrogeno entre 1% y 10%²⁴.

2.2.2.1 Peróxido de Carbamida:

Se presenta en la forma del gel a distintas concentraciones: 10, 15, 16 y 22%. El peróxido de carbamida al 10% es la solución acuosa más utilizada en los estuches de blanqueamiento domiciliario. Cuando se pone en contacto con los

dientes, libera oxígeno, verdadero responsable del blanqueamiento. Aunque sea auto-administrable y su uso se considera seguro, solamente se debe adquirir y aplicar bajo la indicación y orientación de un dentista^{10, 22, 28, 31,30}. Las soluciones blanqueadoras de peróxido de carbamida pueden ser clasificadas en dos clases, según Haywood y Heymann²⁷ (1991), según la presencia o ausencia de un polímero denominado carbopol. Las soluciones que contiene carbopol liberan el oxígeno lentamente y las que no lo contienen, lo liberan rápidamente. El carbopol se añade con la finalidad de espesar el material, prolongar la liberación de oxígeno y mejorar la adherencia del agente blanqueador a los tejidos²².

2.2.2.2 Peróxido de Hidrógeno:

Es un agente oxidante de bajo peso molecular y produce radicales libres (HO_2)⁷ a concentraciones del 1.5 a 7.5 % es de los agentes blanqueadores más utilizados. Debe ser aplicado utilizando una férula y su efecto blanqueador se produce por oxidación.

2.3. MECANISMO DE ACTUACIÓN DE LOS AGENTES BLANQUEADORES.

El blanqueamiento dental ocurre gracias a la permeabilidad de los dientes. Las moléculas de peróxido fluyen a través del esmalte y dentina, debido a su bajo peso molecular⁷. La mayoría de las sustancias blanqueadoras son ligeramente ácidas, lo que favorece su difusión³³.

El proceso en que se basa el blanqueamiento dental es una reacción de oxidación que consiste en un proceso químico por el que el material orgánico se transforma en dióxido de carbono y agua. Los pigmentos dentales están compuestos por numerosas moléculas de carbono. Éstas se dividen y se convierten en compuestos intermedios (pocas cadenas). Esta reacción química modifica el tipo, el número y la posición relativa de los átomos que componen estas moléculas. En el transcurso del blanqueamiento, las cadenas de carbono se transforman en dióxido de carbono y agua, que se libera gradualmente junto con el oxígeno. En un determinado momento el proceso blanqueador alcanza el máximo blanqueamiento. Ese momento se denomina saturación. En el punto de saturación se empieza a degradar la estructura de las proteínas y otros compuestos que contengan carbono. En esa etapa la acción blanqueadora deja de producirse y el agente blanqueador empieza a actuar en otros compuestos que presentan cadenas de carbono, como en las proteínas de la matriz del esmalte^{17,18, 29,34, 35,36, 37}.

Las técnicas utilizadas para el blanqueamiento de dientes sin vitalidad se basan en reacciones químicas de oxidación y reducción²⁴.

Según Baratierri et al³² (1989) la oxidación es un proceso químico por el cual los materiales orgánicos son eventualmente convertidos en dióxido de carbono y agua.

El blanqueamiento ocurre desde la superficie hacia el interior. El punto de saturación, en el que se obtiene el máximo blanqueamiento, ocurre en el punto medio y más allá solo tiene lugar la degradación del material ^{17,25}.

Carrilho et al ³⁸ (2006) describen todo el proceso de las reacciones químicas que ocurren durante el blanqueamiento: en la estructura dentaria existen cadenas moleculares largas y complejas responsables del aumento de absorción de la luz por el diente. Estas macromoléculas se van transformando en cadenas moleculares más pequeñas y, al final del proceso, son total o parcialmente eliminadas de la estructura dentaria. Inicialmente, los compuestos con anillos de carbono fuertemente pigmentados se abren y se convierten en cadenas de color más claro. Al progresar la oxidación, el blanqueamiento también continúa hasta el punto de saturación (donde se llega al blanqueamiento máximo). Cuando se sobrepasa ese punto, los compuestos de carbono, empieza a degradarse. Compuestos del grupo hidroxilo (en general sin color) son fragmentados en sus constituyentes menores que se degradan rápidamente. Si este proceso sigue adelante ocurre la conversión en dióxido de carbono y agua.

2.4 HISTOLOGÍA DEL ESMALTE

Los dientes están formados por cuatro tejidos diferentes: esmalte, dentina, cemento y pulpa. Los tres primeros están mineralizados, mientras que el cuarto, en condiciones normales, no lo está ^{39, 40}.

Los tres tejidos duros están formados por una matriz orgánica sobre la que se encuentra depositado en material inorgánico. La matriz orgánica de la dentina y cemento son estructuralmente semejantes entre sí y muy parecidas a la del hueso, pero todas ellas difieren notablemente de la del esmalte ^{39, 40}.

El esmalte es el tejido humano más duro, debido a que estructuralmente está constituido por millones de prismas altamente mineralizados. La dureza del esmalte se debe a su constitución, integrada por un 96% de matriz inorgánica y 4% de matriz orgánica (Figura 1). El esmalte está más mineralizado en la superficie, aumentando la proporción de materia orgánica y de agua a medida que se acerca al límite amelodentinario ³⁹.

Composición del esmalte

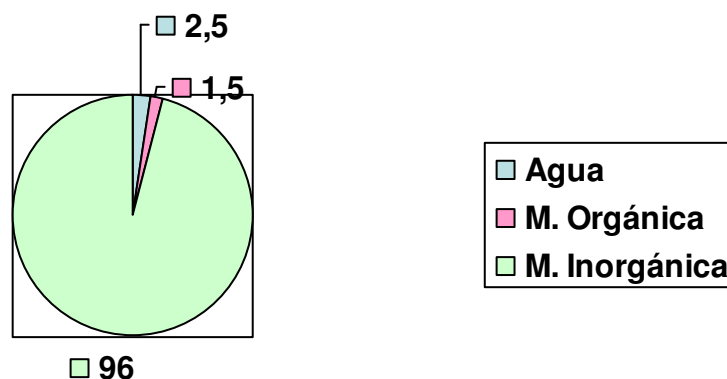


Figura 1 – Composición del esmalte humano ³⁹

La matriz inorgánica está constituida por fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita, lo que la hace semejante a los otros tejidos calcificados³⁰.⁴⁰. El esmalte está compuesto principalmente de cristales de hidroxiapatita, que pertenecen al sistema hexagonal bajo distintas formas, cristales aciculares, paralelepípedos o barras hexagonales.^{39, 41} Este es el único factor semejante que existe entre el esmalte y los otros tejidos calcificados, sin embargo, hay una serie de características que hacen del esmalte humano maduro sea único entre todos los tejidos calcificados, en los siguientes aspectos^{39, 41}.

- 1- Deriva del ectodermo.
- 2- Su matriz orgánica es de naturaleza proteica con agregados polisacáridos y colágeno.
- 3- Sus cristales de hidroxiapatita son extremadamente grandes, mucho mayores que los de otros tejidos calcificados.
- 4- Las células secretoras del tejido adamantino, los ameloblastos, tras completar la formación del esmalte involucionan y desaparecen durante la erupción dentaria, no existiendo crecimiento ni nueva aposición de esmalte después de la erupción dentaria.
- 5- Las vesículas de la matriz en calcificación, limitadas por membranas, no participan en el proceso de calcificación del esmalte.

2.4.1 Composición Química del Esmalte

El esmalte esta constituido de una matriz orgánica, una matriz inorgánica y agua:

- La matriz orgánica: es de naturaleza proteica, y está constituida por un complejo sistema multiagregado polipeptidos. Entre las proteínas presentes en mayor o menor medida en la matriz orgánica del esmalte, en las distintas fases de su formación hay que destacar: ⁴¹

- 1 **Las amelogeninas**, moléculas hidrofóbicas, fosforiladas y glicosiladas, ricas en prolina, glutámico, histidina y leucina. Son las más abundantes. Se denominan proteínas del esmalte Inmaduro y se localizan entre los cristales y las sales minerales sin estar ligadas a ellos.

- 2 **Las enamelinas**, moléculas hidrofílicas, glicosiladas, ricas en serrinas, ácido aspartico y glicina. Representa del 2 al 3 % de la matriz orgánica del esmalte.

- 3 **Las ameloblastinas o amelinas** que inmunohistoquímicamente se localizan en las capas más superficiales del esmalte y en la periferia de los cristales. Representan el 5% del componente orgánico.

- 4 **La tuftelina**, se encuentra en la zona de unión amelodentinaria al comienzo del proceso de formación del esmalte.

- 5 **La pavalbúmina**, proteína identificada en el polo distal del proceso de Tomes del ameloblasto secretor. Su función esta

asociada al transporte de calcio del medio intercelular al extracelular.

- Matriz inorgánica: está formada por sales minerales cálcicas básicamente de fosfato y carbonato. Dichas sales cuando se utiliza difracción de rayos X muestra una organización apatítica que se ajusta, al igual que ocurre en hueso, dentina y cemento, a la fórmula general $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Esas sales se depositan en la matriz del esmalte originando un proceso de cicatrización que transforma la masa mineral en cristales de hidroxiapatita⁴². La unidad de cristales de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ contiene otros componentes además de calcio, fosfato y residuos de hidroxilo. Cuando se analiza, el esmalte de la unión amelodentinaria se encuentra sodio, magnesio y carbonato. Esa concentración es menor en la superficie del esmalte. Por otro lado, se han encontrado altas concentraciones de elementos como flúor, plomo y zinc en las capas más superficiales del esmalte, lo que hace que los cristales sean extremadamente duros y resistentes a la disolución por ácidos⁴⁰.
- Agua: se localiza en la periferia del cristal constituyendo la denominada capa de hidratación, en la que el catión Ca^{2+} puede ser sustituido por Na^+ , Mg^{2+} , e H_3O^+ , y el anión OH^- por F^- , Cl^- y otros.

2.4.2 Estructura Histológica del Esmalte

La estructura histológica del esmalte esta constituida por la denominada unidad estructural básica “el prisma del esmalte” y por las secundarias (Estrías de Retzius; Penachos adamantinos; Bandas de Hunter-Schreger; Esmalte Nudoso; Conexión amelodentinaria y Husos adamantinos)⁴¹.

Mediante microscopia óptica, los primeros especialistas en histología bucal identificaron la unidad estructural de este tejido y se creyó que los prismas seguían un trayecto rectilíneo, que se extendía hasta la unión amelo-dentinaria. Estudios posteriores con microscopia electrónica han revelado que los prismas siguen un trayecto ondulado y, en ciertas regiones más cercanas al límite amelo-dentinario, existen zonas aprismáticas.

Las zonas aprismáticas se relacionan con la ausencia de prolongaciones de *Tomes* durante la amelogénesis. Todo el esmalte ya sea prismático, aprismático o interprismático esta formado por cristales de hidroxiapatita agrupados.

2.5 EFECTO DEL GRABADO EN ESMALTE DENTAL POR ÁCIDO FOSFÓRICO

El grabado de áreas seleccionadas del diente es ejecutado por el profesional mediante la aplicación de una solución que generalmente es ácida, con la finalidad de remover, por reacción química, los detritos existentes en la superficie del esmalte

y dentina, originando así micro-poros y la consecuente desmineralización de esas superficies, que funcionarán posteriormente como micro-retenciones para la resina³⁴.

La técnica de grabado ácido del esmalte fue desarrollada por Buonocore (1955) y cambió totalmente el rumbo de la Odontología. El ácido actúa de manera selectiva sobre la estructura prismática del esmalte, promoviendo la disolución inorgánica de los prismas. Tras un corto periodo de grabado, se originan espacios microscópicos, que proporcionan un aumento en su reactividad e irregularidades en el esmalte dental^{32,33, 39}.

Cuando la superficie del esmalte dental se graba con ácido fosfórico y se expone al contacto con la saliva, ocurre una remineralización por la precipitación del fosfato de calcio de la saliva. En un período de aproximadamente 96 horas, el esmalte grabado por el ácido estará completamente remineralizado³³.

El grabado ácido del esmalte se ha utilizado como referencia para evaluar la posible pérdida de calcio inducida por el tratamiento blanqueador, ya que es un procedimiento habitual en Odontología y sus efectos son bien conocidos.⁴² También se utilizan como referencia los modelos experimentales basados en la exposición a bebidas dulces carbonatadas⁴³. Así, los efectos de la exposición cíclica a estas bebidas y saliva artificial se han utilizado como control para evaluar el impacto sobre la pérdida mineral del esmalte sometido a blanqueamiento en situaciones clínicas simuladas *in vitro*)¹⁸

2.6 EFECTOS DEL BLANQUEAMIENTO SOBRE LA ESTRUCTURA DENTAL

En la actualidad no existe un acuerdo general sobre los efectos de los agentes blanqueadores sobre las estructuras dentales. Algunos investigadores no observan efectos deletéreos en esmalte o dentina tras la aplicación de peróxido de hidrógeno al 35% durante 30 minutos¹⁵, o de peróxido de carbamida al 35%⁴⁴ concentraciones máximas recomendadas para los procedimientos de blanqueamiento profesional. Incluso con la ayuda de sofisticados métodos analíticos, algunos autores no obtienen evidencias de alteraciones químicas o estructurales en el esmalte superficial o subsuperficial⁴⁵

Sin embargo, existen numerosas aportaciones a la literatura que indican que el blanqueamiento tiene efectos no deseables sobre

La mayoría de los estudios coinciden en afirmar que el agente blanqueador causa algún tipo de efecto en los tejidos dentales, los materiales de obturación, su adhesión y adaptación al diente⁴⁶.

A nivel del esmalte, los efectos más frecuentemente descritos en las investigaciones consultadas son cambios en la morfología superficial del esmalte^{1, 21, 48,49}, disminución de la dureza^{4, 21,35, 48,} y pérdida del contenido mineral^{1, 21 48,49}.

La mayor parte de la investigación sobre dichos efectos se ha realizado in vitro y explora distintas concentraciones de esos productos. El PH generalmente se aplica

a concentraciones entre el 5,3 y el 38% y el PC, a concentraciones entre el 10 y el 37%⁵⁰.

Se han utilizado diversas metodologías para evaluar la desmineralización ocasionada por los agentes blanqueadores: Espectrofotómetro de Absorción por Dispersión de Rayos-X^{3,51}; Espectrofotómetro de Absorción en el Infrarrojo^{3,43,52}, Espectrofotómetro de Absorción Atómica^{1,20,52,53}; Tomografía Micro Computadorizada⁵³; Microscopia Electrónica de Barrido^{6, 19, 54, 55, 56} y Microscopia Óptica⁵⁷.

2.6.1 Efecto en la Morfología y Pérdida Mineral

La posibilidad de que el tratamiento blanqueador induzca alteraciones cualitativas y cuantitativas en la superficie dental se ha estudiado mediante diversos métodos, entre los que destacan la MEB sobre esmalte y dentina y la perfilometría. Esta técnica permite, mediante medios mecánicos u ópticos, determinar la rugosidad de la superficie dental antes y tras la aplicación del agente blanqueador, cuantificando así los cambios inducidos y la pérdida de material dentario del espécimen inducida por el tratamiento⁵⁹. Sin embargo, se han utilizado otras técnicas analíticas como la microscopia de fuerza atómica⁴⁸ o la microscopía láser confocal (MLC)⁶⁰.

Haywood et al⁶¹ (1990), evaluaron in vitro los efectos del PH liberado a partir de un gel de PC al 10%, aplicado durante 5 semanas en un régimen similar a su

utilización nocturna domiciliaria. Se protegieron de su efecto algunas áreas de las superficies dentales que actuaron como control. Al final del periodo experimental, se obtuvieron réplicas de los modelos dentales en epoxi-resina y se examinaron bajo MEB. Los autores no apreciaron alteraciones en la textura del esmalte blanqueado respecto a las áreas de esmalte sin contacto directo con el producto. Sin embargo, tampoco apreciaron diferencias en la coloración del diente entre las áreas control y las expuestas directamente al PC.

Spalding et al⁶² (2000), exploraron las alteraciones morfológicas del esmalte tras aplicar tres protocolos distintos de blanqueamiento. Observaron que la variabilidad morfológica del esmalte no tratado supera en ocasiones a las alteraciones atribuidas a la aplicación del peróxido de hidrógeno al 35% solo o combinado con peróxido de carbamida al 10%.

Josey et al⁵⁷ (1996), mediante Microscopia óptica y microscopia electrónica de barrido, observaron que el proceso de blanqueamiento da como resultado una pérdida del contenido mineral del esmalte que se hace evidente 24 horas tras el tratamiento y se mantiene tras 12 semanas de almacenamiento en saliva artificial. El grabado ácido del esmalte sometido previamente a blanqueamiento produjo una pérdida de la estructura prismática del mismo y le proporcionó una apariencia de 'sobregabado'.

Bitter⁶³ (1998) observó que las alteraciones en la micromorfología superficial del esmalte se mantenían a largo plazo, entre 21 y 90 días post tratamiento, con

exposición del esmalte prismático y extensión de las alteraciones en la profundidad de los prismas del esmalte.

Perdigao et al³⁷ (1998) verificaron que blanqueamiento vital no provoca alteraciones en la concentración relativa de oxígeno del esmalte, pero disminuye las concentraciones relativas de calcio y fósforo, produciendo alteraciones morfológicas en la mayor parte de los cristales superficiales del esmalte, con puntos de densidad electrónica reducida y disminución del material cristalino presente en torno a los mismos.

Se han demostrado alteraciones microestructurales mediante MEB similares a la lesión inicial de caries que se acompañan de disminución de las concentraciones de calcio y fósforo respecto a las del esmalte no tratado. Potonick et al⁴⁵ (2000) observaron cambios en la micro-estructura del esmalte después del tratamiento con PC al 10% similares a las de la lesión inicial de caries. Mediante microanálisis por sonda de electrones, comprobaron que las concentraciones de Ca^{2+} y P eran inferiores en el esmalte blanqueado que en el no blanqueado.

Las alteraciones inducidas por el blanqueamiento vital con peróxido de carbamida se han relacionado con la concentración a la que se aplica el producto y el tiempo de exposición⁴³.

McGuckin et al⁶⁴ (1992) investigaron la topografía y morfología del esmalte humano sometido a dos productos de blanqueamiento domiciliario y a PH al 30%. Este último indujo la aparición de mayores irregularidades en la superficie del esmalte evaluadas mediante MEB y perfilometría, lo que apoya la afirmación de que la concentración del agente blanqueador es el factor determinante en la aparición de alteraciones morfológicas en el esmalte.

Hedegus et al⁴⁸ (1998) observaron mediante Microscopía de Fuerza atómica, la superficie del esmalte tratada con PC 10% y una preparación de PH al 30%. Las alteraciones morfológicas del esmalte tratado fueron evidentes tras 28 horas de tratamiento. El esmalte no tratado presentaba numerosas fosas que se hicieron más profundas en todos los casos tratados. Las alteraciones más pronunciadas correspondieron al tratamiento con solución de PH al 30%, lo que relaciona las alteraciones morfológicas con la concentración del agente blanqueador. En este sentido, Oltu y Gürkan³ (2000) afirman que los productos que contienen peróxido de carbamida al 10 ó al 16% no inducen cambios en la estructura del esmalte, mientras que éstos son evidentes al aplicar el producto a una concentración del 35%.

Martínez Bello et al¹⁷ (2002) investigaron los cambios que produce el peróxido de carbamida al 10% sobre la superficie del esmalte y compararon los efectos de dos blanqueadores de distinta marca comercial y una formulación magistral, utilizando MEB. Los blanqueadores se aplicaron durante dos horas. Las muestras del grupo control presentaron una superficie de esmalte lisa y en algunos casos se observaron líneas de desgaste fisiológico. Las muestras tratadas con las sustancias blanqueadoras revelaron alteraciones topográficas superficiales con disolución

selectiva de los prismas de esmalte, que afectó principalmente a su centro, manteniéndose la periferia intacta.

Cavalli et al⁶⁵ (2005) examinaron la rugosidad superficial del esmalte mediante perfilometría antes y después de la exposición del esmalte a un protocolo de blanqueamiento profesional con PH al 35 y al 37%. Los resultados revelaron la presencia de irregularidades en la superficie del esmalte blanqueado similares a un patrón de grabado ácido de tipo II.

En el estudio de Namen et al⁶⁶ (2005) se aplicaron cuatro productos basados en PC. Tres de ellos tenían entre un 10 y el 16% de PC y el cuarto producto, una concentración del 35%. El tiempo de aplicación osciló entre 28 y 56 horas para los peróxidos de 10 y 16% y fue de 30 minutos para el PC al 35%. Todos los productos indujeron alteraciones superficiales en el esmalte dental, aunque existen diferencias significativas entre materiales, tiempos y concentraciones de los mismos.

Pérez Vargas et al⁶⁷ (2004) observaron la variación de la morfología superficial, estructura histológica y color del esmalte de las caras vestibulares expuestas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición de peróxido de carbamida. Los especímenes se dividieron en tres grupos y se sometieron a distintas concentraciones de peróxido de carbamida (5%, 10% y 20%). La cara vestibular de cada diente se dividió en cuatro cuadrantes, que se expusieron a 5, 20 y 40 horas de blanqueamiento, respectivamente, mientras que un cuadrante no se blanqueó, actuando como grupo control. Aunque en todos los grupos del estudio se obtuvieron resultados similares en cuanto a la intensidad del blanqueamiento, se observaron

cambios superficiales del esmalte relacionados con el tiempo de exposición y la concentración del peróxido de carbamida. El tiempo de exposición mayor a 20 horas produjo cambios histológicos en los prismas del esmalte.

Además del tiempo de aplicación y la concentración del agente blanqueador, otras características del mismo podrían influir en la aparición de las alteraciones superficiales del esmalte descritas. En opinión de Shannon et al⁶⁸ (1993), el pH del producto concreto que se utiliza puede ser determinante de los efectos erosivos del blanqueamiento. Utilizaron tres compuestos basados en peróxido de carbamida al 10% y observaron las alteraciones superficiales más intensas en los especímenes tratados con productos de menor pH.

Castelo y Monnerat⁵⁴ (2004) aplicaron blanqueador con peróxido de hidrógeno al 35% en dos presentaciones: comercial (Whiteness HP FGM®) ó fórmula magistral. Las alteraciones en la superficie externa e interna del esmalte aumentaron con el tiempo de exposición al agente blanqueador, siendo más acusadas cuando se utilizó la fórmula magistral, de pH ácido, que cuando se aplicó el producto comercial, de carácter alcalino.

En el estudio sobre esmalte humano de Andrade et al⁶ (2005) las superficies tratadas con blanqueador se analizaron mediante Espectrofotometría de Emisión Atómica por inducción de plasma de argón acoplado. Observaron una pérdida de calcio y fosfato y alteraciones morfológicas en todos los grupos de estudio sometidos a blanqueamiento. La severidad de las alteraciones se relacionó con la acidez del

producto blanqueador siendo, en las de menor pH, semejantes a las obtenidas con el grabado con ácido fosfórico 15 segundos.

Otros factores, además del pH del producto blanqueador podrían ser responsables de las alteraciones detectadas en la superficie del esmalte. Los agentes blanqueadores liberan peróxido de hidrógeno que afecta a la fase orgánica del esmalte. De esta manera el PH podría afectar no sólo a la superficie, sino también al interior del esmalte ya que, dado su bajo peso molecular, presenta una elevada capacidad de difusión. Así, la capacidad oxidante del PH podría alterar la superficie y la subsuperficie del esmalte.

Labramanti ²² (2005) observó alteraciones de la morfología de la mayoría de los cristales de la capa superficial del esmalte, en comparación con esmalte no tratado. La liberación de oxígeno a partir de los agentes blanqueadores podría inducir cambios en la estructura orgánica del esmalte, favoreciendo la pérdida en su contenido en Ca y P. ⁴²

Esberard et al ⁵⁶ (2004), evaluaron la unión amelo-cementaria tras el tratamiento blanqueador mediante SEM. Demostraron que se producían grandes defectos estructurales en el cemento con intensa pérdida mineral. Se observaba un incremento de la superficie dentinaria expuesta, así como la formación de defectos o fenestraciones en forma de valle en las que el cemento se separaba del esmalte, con exposición de los túbulos dentinarios.

2.6.2 Efectos en las Propiedades Físicas del Esmalte

La medida de la microdureza superficial mediante micro-indentación es el método más utilizado para determinar las propiedades mecánicas de esmalte y dentina porque guarda una estrecha relación con las pérdidas o ganancias en su contenido minera ⁵⁹. Otros estudios evalúan directamente la pérdida de iones cuantificándola mediante métodos químicos analíticos ^{1, 18, 69} o mediante ambas aproximaciones ⁷⁰. También se han evaluado las propiedades mecánicas de esmalte o dentina mediante su resistencia a distintos tipos de carga mecánica ^{65, 71, 72, 73}. Otros autores han cuantificado la abrasión superficial tras el blanqueamiento mediante la pérdida real de masa del diente ^{5, 74}.

McCracken y Haywood ¹(1996) advirtieron que el PC tiene capacidad intrínseca de desmineralización. La aplicación de peróxido de carbamida al 10% durante 6 horas causó desmineralización del esmalte. Esta pérdida de calcio se cuantificó mediante espectroscopia de absorción atómica, en $\mu\text{gr}/\text{mm}^2$ de superficie expuesta y fue significativamente mayor a la que se produjo en el mismo tiempo de exposición a agua deseonizada. Sin embargo, resultó ser similar a la movilización de calcio inducida por la exposición a una bebida carbonatada durante dos minutos y medio, por lo que, probablemente, su impacto clínico sea limitado.

Pinheiro Júnior ⁷⁵ et al (1996) estudiaron la acción de los blanqueadores a base de peróxido de carbamida sobre la microdureza en el esmalte humano. Los especímenes fueron sometidos a la acción de blanqueadores de 5 diferentes firmas,

durante 8 horas diarias. Después del periodo experimental de siete días, se tomaron nuevas medidas de microdureza de Vickers con 200 gramos de carga y 15 segundos de aplicación. Bajo las condiciones del estudio, todos los productos testados disminuyeron de manera estadísticamente significativa la microdureza del esmalte.

Sulieman et al ⁴⁶ (2004), no observaron efectos perjudiciales en el esmalte ni en dentina humanos tras aplicar altas concentraciones (35%) de PH durante 30 minutos. Esta pauta de blanqueamiento no indujo por sí misma alteraciones detectables, ni aumentó la susceptibilidad a la erosión por ácido cítrico o por el cepillado, medible mediante perfilometría o detectable mediante microscopía electrónica, ni alteró de forma de forma significativa en la microdureza de los tejidos¹².

Unlu et al ⁷⁶ (2004) utilizaron PC a concentraciones del 10 o 15% en regímenes cortos de aplicación (4 horas), simulando un tratamiento domiciliario de una semana de duración. Durante los intervalos entre las aplicaciones del blanqueador, los especímenes se almacenaron en agua destilada a 37%. No se observaron diferencias significativas en la dureza superficial del esmalte ni de la dentina frente a los especímenes no tratados.

Joiner et al ⁴² (2004) analizaron la influencia del blanqueamiento con peróxido de hidrógeno al 6% (XtraWhite) en la microdureza, morfología (SEM) y el color en esmalte y dentina, sin que detectaran efectos adversos significativos debidos al

blanqueamiento a lo largo de 28 aplicaciones de 20 minutos, ni diferencias entre las distintas pautas de almacenamiento (en agua o saliva artificial con o sin flúor añadido).

Pinto et al ⁵⁵ (2004) evaluaron las alteraciones inducidas sobre el esmalte humano por 6 productos blanqueadores, basados en PC al 10, 35 y 37% o en PH al 7,5 y al 35%, respecto a un grupo control sin tratamiento. Todos los productos indujeron una disminución de la microdureza y un aumento la rugosidad del esmalte.

Oliveira et al ⁵⁰ (2005) analizaron la repercusión del blanqueamiento con peróxido de carbamida al 10% sobre la microdureza del esmalte bovino y los efectos de la adición al agente blanqueador de calcio o de flúor a distintas concentraciones. El protocolo de blanqueamiento incluyó la aplicación diaria durante 6 horas del producto y el almacenamiento de los especímenes en saliva artificial 8 horas diarias, durante 14 días. El grupo control no se sometió a blanqueamiento. Se determinó la microdureza del esmalte al inicio del experimento, a los 7 días, a los 14 días y una semana tras completar el protocolo blanqueador. Todos los grupos experimentales sometidos a blanqueamiento demostraron una disminución de la microdureza del esmalte respecto al grupo control, sin que se observaran efectos protectores debidos a la adición de calcio o de flúor a ninguna de las concentraciones utilizadas.

Al-Salehi et al ⁷⁰ (2007) evaluaron la pérdida mineral y la microdureza de Vickers de esmalte y dentina bovinos sometidos a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (0%, 3%, 10% y 30%). La pérdida de calcio y fósforo se midió en la solución de blanqueamiento mediante espectrometría de masas por plasma

inductivamente acoplado y demostró un incremento significativo tanto en los especímenes de esmalte como en los de dentina, respecto al grupo control para cualquier concentración de PH aplicada. Esta liberación de iones aumentó de forma significativa al aumentar la concentración del PH, con la única excepción de la concentración de fosfato liberado del esmalte, que se mantuvo estable al incrementar la concentración del PH del 3 al 10%. La microdureza del esmalte disminuyó significativamente ($p < 0,05$) después de la decoloración con PH para todas las concentraciones aplicadas.

Cavalli et al ⁷⁴ (2004) midieron el efecto del peróxido de carbamida a bajas concentraciones sobre la resistencia a la tensión del esmalte humano. El protocolo de aplicación comprendió la aplicación del blanqueador 6 horas diarias durante 14 días. Se demostró un descenso en la Resistencia tensional última (Ultimate Tensile Strength, UTS) del esmalte blanqueado respecto al control, no sometido a blanqueamiento, sin diferencias significativas entre los productos o concentraciones empleados. El análisis de las superficies fracturadas demostró que el esmalte blanqueado presentaba un aspecto más poroso que el de los especímenes no blanqueados y que el tratamiento parecía atacar preferentemente los límites entre los prismas y la sustancia interprismática.

Adachi ⁵ (2001) evaluó la pérdida cuantitativa de la masa dental inducida por el uso de PC al 10% respecto a la ocasionada con el grabado con ácido fosfórico al 37%, durante 30 segundos en esmalte y 15 segundos en dentina. La pérdida de la masa total de esmalte sometido a grabado ácido durante 30 segundos fue de 15,05 g/mm² y en dentina de 154,2 g/mm².

Tong et al ⁷⁴ (1993) estudiaron los efectos de las técnicas de blanqueamiento microabrasivas en dientes vitales sobre el esmalte dental. Los especímenes tratados con ácido fosfórico al 37% mostraron una pérdida de 5,7 mm de esmalte. Los tratados con aplicación del ácido fosfórico al 37% previa a la acción del peróxido de hidrógeno al 30% tuvieron una pérdida de 5,3 mm. La aplicación directa de ácido clorhídrico al 18% resultó en la pérdida de 100 mm de esmalte. La aplicación del ácido clorhídrico al 18% con piedra pómez ocasionó pérdidas de 360 mm de esmalte.

Aunque la mayor parte de los autores detectan alguna disminución de la dureza y por tanto del contenido mineral de la superficie y subsuperficie dental estos efectos pueden ser reversibles por remineralización ^{78, 79}.

Attin et al ⁸⁰ (2007) evaluaron el período de tiempo necesario para restablecer la microdureza del esmalte bovino tras el tratamiento con un blanqueador con fluoruro (0,5% NaF). El procedimiento de blanqueamiento consistió en aplicaciones de 8 horas diarias con periodos de remineralización en saliva artificial de 16 horas, durante una semana. Las pruebas de microdureza de Knoop se llevaron a cabo al principio del estudio, tras cada intervalo de blanqueamiento y después de su conclusión. Al cabo de una semana de tratamiento, el test de Knoop demostró una reducción de la microdureza en todos los grupos blanqueados, que oscilaba entre el 7 y el 15% respecto a los valores iniciales. Sin embargo, la reducción fue menor en los grupos experimentales con fluoruro añadido, en los que también se observó una remineralización más rápida.

Giannini et al ⁷¹ (2006) se propusieron revertir los efectos negativos del PC sobre la resistencia a la tensión del esmalte mediante la adición de flúor y calcio. Los grupos blanqueados recibieron un blanqueador con PC al 10% no ácido (pH 6.5 a 7.2), 6 horas al día durante 14 días consecutivos y se mantuvieron en saliva artificial a 37°C entre aplicaciones. El esmalte de los grupos sometidos a blanqueamiento con PC al 10% exhibió una resistencia a la tracción (UTS) significativamente reducida respecto al esmalte no blanqueado, mientras que los agentes blanqueadores experimentales que contenían fluoruro ó calcio demostraron una UTS similar a los grupos de control sin blanquear. El análisis fractográfico de los especímenes mediante MEB, demostró que el esmalte fracturado sin blanquear presentó una estructura compacta, típica del esmalte intacto. El esmalte fracturado blanqueado con el PC al 10% presentó prismas desplazados y aspecto poroso. Esta porosidad era menor en los especímenes experimentales con fluoruro o el calcio en la composición del blanqueador. Por lo tanto, la adición del calcio o del fluoruro al agente blanqueador constituye, en opinión de los autores, una alternativa aceptable para reducir los efectos nocivos causados por los peróxidos durante el proceso de blanqueamiento. Los autores atribuyen la debilidad del esmalte sometido al PC al 10% a la capacidad oxidante del mismo.

Algunos estudios recientes sugieren que tanto la pérdida mineral como las alteraciones morfológicas del esmalte podrían estar relacionadas no sólo con la aplicación de peróxidos, sino también con los efectos de los excipientes de cada producto. El carbopol es el agente espesante más utilizado en los sistemas de blanqueamiento y ha demostrado que, por sí mismo, puede causar una disminución de la microdureza del esmalte ⁸¹ El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del

tratamiento con peróxido de carbamida al 10%, con o sin agentes espesantes (carbopol) respecto a la aplicación de los excipientes aplicados de forma aislada. La disminución de la microdureza dependió del tiempo de aplicación, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos blanqueadores o sus excipientes⁸².

Lee et al¹⁸ (2006) investigaron el efecto del peróxido de hidrógeno al 30% aplicado durante un tiempo total de 120 horas sobre el contenido mineral del esmalte bovino. Para ello se cuantificó tanto la pérdida mineral del esmalte mediante microanálisis por sonda de electrones con espectrómetro de dispersión de longitudes de onda, como la cantidad de calcio y fósforo disueltos en la solución blanqueadora, así como la presencia y cantidad de otros elementos, como flúor, magnesio y Zinc. Se utilizó un espectrómetro de emisión atómica por plasma inductivamente acoplado para el análisis cuantitativo de los elementos disueltos en la solución en forma de iones positivos. Para cuantificar los iones negativos, se utilizó cromatografía de iones (IC) El contenido de calcio y fosfatos en el esmalte blanqueado fue aproximadamente un 5% menor que el del esmalte intacto tras 120 horas de contacto con el PH al 30%. La cantidad de calcio que pasó a la solución blanqueadora en ese tiempo ($1,23 \pm 220,08 \mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-2}$) fue similar a la que tiene lugar en dientes expuestos a un refresco o zumo durante 2 a 2,5 minutos. Por lo tanto, los autores consideran que la pérdida mineral causada por el proceso de blanqueamiento no supone una amenaza para la integridad del esmalte.

De Medeiros et al⁶⁹ (2008) cuantificaron la influencia de la aplicación previa de peróxido de carbamida al 30 % sobre la capacidad de descalcificación del ácido

fosfórico al 37%, utilizando la espectrofotometría de absorción atómica. La cantidad de Ca^{2+} extraído del esmalte por el ácido fosfórico se evaluó inmediatamente, a las 24 h, 72 h, y 7 días tras el blanqueamiento. El calcio movilizado por el grabado ácido tras la aplicación del peróxido de carbamida al 30% aumentó de forma inmediata tras el blanqueamiento, siendo significativamente mayor a las 24h después del mismo y esta diferencia persistió durante, al menos, una semana tras el tratamiento.

2.6.3 Efectos en la Subsuperficie

La gran capacidad de difusión del PH justifica que distintos autores hayan investigado qué consecuencias estructurales, químicas o mecánicas pueden derivarse de la aplicación de blanqueadores en la superficie del diente.

Potonick et al ⁴⁵ (2000) no encontraron reducción alguna en la microdureza del esmalte subsuperficial tras un tratamiento prologando, de 336 horas, con PC al 10%. Tampoco Unlu et al ⁷⁶ (2004) obtuvieron diferencias significativas en la microdureza del esmalte ni de la dentina tras la aplicación de PC al 10 ó al 15%.

En cambio, Attin et al ⁷⁹ (2005) obtuvieron valores reducidos en el test de microdureza de Knoop en la subsuperficie del esmalte, aunque no en la dentina subsuperficial. La profundidad a la que el esmalte resultaba afectado dependió del producto y pauta de aplicación. Entre los productos testados se incluían protocolos

de blanqueamiento con PH ó PC al 35%. La profundidad a la que se observó desmineralización del esmalte osciló entre 150 y 700 μm .

Mediante métodos no destructivos, como la Microscopía Láser Confocal, Götz et al ⁶⁰ (2007) no observaron alteraciones subsuperficiales tras la aplicación de PC al 10%. Exploraron la reversibilidad de las alteraciones en la superficie y subsuperficie del diente, simulando in vitro un protocolo de blanqueamiento domiciliario, para el que se utilizaron tiras impregnadas en peróxido de hidrógeno a concentraciones del 13% y 16% aplicadas de forma discontinua 1 hora diaria, alternando con periodos de remineralización por inmersión en saliva humana, durante un total de 28 días. Demostraron la eficacia del blanqueamiento respecto al obtenido en los especímenes tratados con tiras placebo, sin que se observaran alteraciones en la microdureza del esmalte ni en la morfología superficial del mismo, mediante microscopía electrónica de barrido de presión variable (VP-SEM). La Microscopía láser confocal (MLC) permitió observar la subsuperficie de los especímenes blanqueados, sin que se detectaran alteraciones respecto a los especímenes de control en esmalte ni dentina. Tampoco mediante espectroscopia Raman se observaron alteraciones superficiales ni subsuperficiales en las bandas correspondientes a fosfatos y carbonatos, que conservaron los espectros correspondientes a las apatitas dentales.

Sin embargo, Efeoglu et al ⁸³ (2005) mediante microtomografía computadorizada observaron la desmineralización del esmalte humano hasta una profundidad de 50 μm , sin afectación dentinaria. Su pauta de administración

experimental simuló un tratamiento domiciliario de 14 de duración, con periodos de blanqueamiento de 8 horas y de contacto con saliva artificial de 16 horas.

Más tarde, Efeoglu et al ⁸⁴ (2007) obtuvieron valores significativamente reducidos en el contenido mineral, cuando de la aplicación de peróxido de carbamida al 10%, siendo la causa de la desmineralización del esmalte, que extendió una profundidad de 50 μm por debajo de la superficie del esmalte

Se han demostrado, además, valores reducidos en la resistencia micromecánica del esmalte sometido a tensión. Da Silva et al ⁸⁵ (2005), comprobaron una disminución de la resistencia última a la tensión en la subsuperficie del esmalte sometido a tratamiento con concentraciones elevadas de PH (35%) ó PC (37% ó 10%). Resultados similares obtuvieron Cavalli et al ⁷⁷ (2004). Sin embargo, en opinión de los autores, este método de ensayo podría sobreestimar los efectos de los agentes blanqueadores ya que los especímenes a testar son barritas de esmalte de dimensiones muy reducidas obtenidas mediante reducción mecánica. El esmalte testado no representaría de forma fiable los efectos del agente blanqueador en la superficie del diente in vivo, la cual se espera que exhiba una mayor grado de mineralización y, por tanto, de resistencia a la tensión, a la vez que favorecería la difusión del agente blanqueador al interior del espécimen testado.

Tam et al ⁷² (2005), evaluaron las propiedades mecánicas de la dentina mediante dos parámetros: la resistencia a la flexión (FS) y el módulo de flexión (FM), tras la inmersión de bloques de dentina bovina en PC ó PH a distintas concentraciones y tiempos de aplicación. El PC al 10 ó al 15% se utilizó simulando

regímenes nocturnos de aplicación durante 6 horas diarias, de 2 semanas ó 2 meses de duración, mientras que el PH se testó en un protocolo de aplicación domiciliaria diurna, a concentraciones del 6,5 o 7,5%, 1 hora a la semana, durante 3 semanas y en un protocolo de aplicación profesional, al 35%, 1 hora al día, 2 días por semana, durante 3 semanas. Se observó que el PC a las concentraciones y pautas de administración empleadas reducía significativamente los valores de FS y FM de la dentina bovina respecto a los de los grupos control sin blanqueamiento. Sin embargo, ninguno de los regímenes de aplicación del PH indujo cambios significativos en las propiedades mecánicas de la dentina, lo que podría estar relacionado con los tiempos más cortos de tratamiento que se utilizaron en estos grupos experimentales.

En un trabajo relacionado, Tam et al ⁷³ (2005) compararon las propiedades mecánicas de la dentina bovina cuando se sometía a PC 10%, de forma directa o indirecta, es decir, cuando el blanqueador se aplicaba sobre el esmalte. Las pautas de aplicación del blanqueador en los grupos experimentales fueron similares. La aplicación directa del PC sobre la dentina redujo de forma significativa el FS y FM, mientras que no se observaron efectos significativos sobre estos parámetros en la aplicación indirecta del blanqueador.

Por otra parte, Carrasco et al ⁸⁷ (2003) usaron el peróxido de hidrógeno al 35%, en el blanqueamiento interno con activación con LED y luz halógena y en la técnica convencional. Evaluaron cuantitativamente la acción de éstos en la permeabilidad de la dentina mediante métodos histoquímicas. Todos los

procedimientos de blanqueamiento aplicados en el estudio demostraron una efectividad similar y aumentaron la permeabilidad de la dentina de forma parecida.

2.6.4 Efecto en la Estructura Molecular de Esmalte y Dentina.

Cimilli y Pameijer ⁸ (2001) utilizaron peróxido de carbamida al 10, 15 y 16% sobre el esmalte humano y observaron, mediante espectroscopia infrarroja, espectroscopia infrarroja transformada de Fourier y difracción de Rayos X que el PC provocó un cambio en la estructura de la hidroxiapatita a ortofosfato calcio amorfo [Ca(H₂PO₄)₂], con la única excepción del grupo experimental en el que se aplicó PC al 10% durante sólo 5 ó 10 días.

Bistey et al ⁴³ (2007) evaluaron los efectos de las soluciones del peróxido de hidrógeno al 10, 20 y 30% en la estructura molecular del esmalte humano, mediante espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FT-IR). Se utilizaron 10 especímenes por grupo, que se sometieron a blanqueamiento con PH. Se determinaron los espectros antes del tratamiento, así como para los tiempos de aplicación del blanqueador de 30, 60 y 120 minutos y transcurrida una semana desde su realización, tiempo durante el que los especímenes permanecieron almacenados en solución salina isotónica. El análisis espectroscópico demostró, en los especímenes blanqueados, modificaciones estructurales del esmalte superficial respecto al grupo control sin blanqueamiento a nivel de las bandas que definen al ión PO₄. Dichas alteraciones eran proporcionales a la duración del tratamiento y a la

concentración del PH y persistían 1 semana después del blanqueamiento, sin tendencia, por tanto, a la reversibilidad espontánea.

Jiang et al ⁵² (2007) investigaron los efectos de H₂O₂ al 30 % sobre la estructura de la dentina humana y sus mecanismos posibles de actuación. Los espectros de la dentina intacta y tratada se determinaron mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y reflexión total atenuada (ATR). Las diferencias más importantes fueron observadas en los espectros de ATR de la dentina tratada. Al someter al blanqueador especímenes de dentina previamente desmineralizada, se pudo observar su práctica disolución en el PH. Los autores proponen que la pérdida mineral se podría explicar por la acidez de los productos, mientras que la destrucción de los componentes orgánicos se explicaría por un mecanismo de oxidación.

2.6.5 Efecto en los Materiales de Restauración

Basting et al ⁸⁸ (2005) evaluaron los efectos del peróxido del carbamida al 10% en la rugosidad y la microdureza superficiales de tres resinas compuestas condensables. Los especímenes fueron expuestos a peróxido de carbamida al 10% durante 6 horas al día, 3 semanas. Durante el tiempo restante se almacenaron en saliva artificial, como solución remineralizadora. Las resinas compuestas condensables sometidas al PC al 10% presentaron una rugosidad superficial mayor que la del grupo de control. Sin embargo, no se afectó su microdureza superficial

Mujdeci y Gokay ⁸⁹ (2006) no observaron diferencias significativas en la microdureza de Vickers de tres materiales de restauración, una resina microhíbrido, y un vidrio ionómero convencional, tras el tratamiento durante 21 días con agua destilada, gel de PC al 10%, o blanqueamiento en tiras con PH al 14%.

2.6.6 Efectos en la Adhesión

Uno de los inconvenientes más conocidos del blanqueamiento es el hecho de que afecta negativamente a la adhesión de los materiales de restauración. Se ha demostrado que los agentes blanqueadores que incorporan PC a concentraciones comprendidas entre el 10 y el 35% tienen un efecto adverso sobre la fuerza de adhesión al esmalte previamente grabado. Numerosos estudios han comprobado que existe una reducción significativa en la resistencia adhesiva de las resinas compuestas ^{90, 91, 92, 93}, cuando la adhesión se lleva a cabo tras el blanqueamiento.

Türkün et al ⁹⁴ (2004) comprobaron que la resistencia adhesiva a la cizalla era significativamente menor en los grupos de especímenes de esmalte bovino blanqueados con PC al 10, 16 ó 22% respecto al grupo control no blanqueado y, en su trabajo, la reducción de la fuerza de adhesión fue mayor cuanto mayor era la concentración del agente blanqueador⁹⁴. No obstante, no todos los autores coinciden en esta afirmación. De hecho, Cavalli et al ⁹⁵ (2001) no observaron influencia alguna de la concentración del blanqueador sobre la fuerza de adhesión inmediata con el test de cizalla en esmalte humano.

Numerosas investigaciones han intentado establecer las causas del descenso en la fuerza adhesiva inmediatamente tras el blanqueamiento.

Josey et al ⁵⁷(1996) observaron que, tras el blanqueamiento, tenía lugar una disminución del contenido mineral superficial del esmalte que se manifestaba 24 horas tras el blanqueamiento y se mantenía incluso tras 12 semanas de almacenamiento en saliva artificial, con cambios en su textura superficial y pérdida de su estructura prismática. Esto hacía al esmalte más sensible al ataque del grabado ácido que le proporcionaba una apariencia de 'sobregabado'.

Santos ⁹⁶ (2004) utilizó el peróxido de carbamida en diferentes concentraciones 10,15 y 20%, sobre esmalte bovino. La fuerza de adhesión de un adhesivo de grabado total evaluada mediante microcizalla, disminuyó de forma significativa sobre el esmalte recién blanqueado, lo que atribuyó a la presencia de peróxido residual. El grabado ácido de la superficie de esmalte blanqueada indujo, además, un patrón de sobregabado.

Los agentes blanqueadores reducen la microdureza superficial del esmalte ⁸⁶. Además, se sabe que el PH, debido a su bajo peso molecular puede penetrar en el esmalte y ser retenido en su interior. Adibfar ⁹⁷ (1992), liberando oxígeno residual que podría inhibir la polimerización y dificultar la penetración de los adhesivo ⁹⁸, proporcionando un aspecto poroso a la interfase adhesivo ⁹⁹.

Algunos autores han propuesto diversos métodos para evitar los problemas clínicos que plantea la adhesión al esmalte blanqueado.

Dishman et al ⁹⁸ (1994) observaron que los valores de resistencia a la cizalla de la adhesión de una resina de grabado total a esmalte caían de forma significativa cuando la adhesión se realizaba inmediatamente tras el blanqueamiento, pero se recuperaban cuando la adhesión se retrasaba 1 día y permanecían al nivel de los obtenidos en el esmalte no blanqueado durante, al menos, un mes. Sugieren que la capa rica en oxígeno sería eliminada cuando se aplica el grabado ácido, antes de la resina adhesiva.

Cadenaro et al ¹⁰⁰ (2006) consideran que dicha eliminación no se produce y demuestran, mediante calorimetría diferencial de barrido, una disminución en el grado de conversión de los adhesivos en los especímenes blanqueados. El aumento del tiempo de polimerización y una demora de 14 días entre el blanqueamiento y la adhesión mejorarían el nivel de polimerización de los adhesivos tras el blanqueamiento.

La mayor parte los investigadores aconsejan esperar una semana antes de realizar algún procedimiento adhesivo sobre el esmalte blanqueado ⁹². Machado Silveiro et al ¹⁰¹ (2004) comprobaron que, tras una semana de demora entre el uso del agente blanqueador y el agente de adhesión, la penetración de éste último era más alta con la formación de los habituales tags de adhesivo ¹⁰²

La remoción del oxígeno residual podría reducir los efectos negativos del blanqueamiento sobre la adhesión, reduciendo así el periodo de demora entre los tratamientos blanqueador y conservador. Kum et al ¹⁰³ (2004) compararon la eficacia del lavado con agua, la aplicación de etanol ó de catalasa antes de la adhesión a

esmalte blanqueado. El pretratamiento de la superficie blanqueada con catalasa y etanol previo al proceso adhesivo, mejoraron significativamente la fuerza de adhesión respecto al simple lavado con agua. Sin embargo, el etanol no restauraba los niveles de adhesión al nivel de los obtenidos en esmalte no tratado. El examen fractográfico demostró que la disminución de la adhesión inducida por el PH se debía tanto a alteraciones tanto a nivel de la interfase resina-esmalte como en la calidad de la resina.

Türkün y Kaya ¹⁰⁴ (2004) testaron la aplicación de ácido ascórbico y la demora de una semana de almacenamiento en saliva artificial sobre la fuerza adhesiva tras el blanqueamiento. Se comprobó que la fuerza adhesiva era significativamente inferior en el grupo experimental adherido inmediatamente tras el blanqueamiento respecto a la obtenida en el grupo control no tratado, diferencia que no se halló en el grupo tratado con antioxidantes ni en el grupo mantenido en saliva artificial durante una semana.

2.7. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORSIÓN ATÓMICA

Espectrofotometría significa estudio de la estructura y dinámica moleculares mediante la absorción, emisión y dispersión de la luz. La interacción de la materia con la radiación afecta a los niveles energéticos de dicha materia. El paso de un estado fundamental a un estado excitado tiene lugar cuando la radiación tiene la

energía correspondiente a la diferencia entre dichos estados y la materia lo absorbe

¹⁰⁵.

La espectroscopia de Absorción atómica se basa en la absorción de radiación por átomos libres en estado fundamental mientras que la Espectroscopia de Emisión Atómica estudia la emisión de radiación por átomos o iones en estado excitado ¹⁰⁶.

La caracterización de un material mediante Espectroscopia de Absorción o Emisión Atómica pasa por una etapa fundamental y de enorme repercusión en el resultado del análisis, se trata de la preparación de muestra. Las determinaciones cualitativa y cuantitativa sólo será posible si los elementos a medir se encuentran en disolución o en la forma adecuada para ser transportados a la llama o plasma donde se romperán los enlaces quedando como átomos libres ¹⁰⁶.

Históricamente la espectrofotometría de emisión atómica requería la atomización y excitación mediante llama, arco eléctrico y chispa eléctrica ⁹¹. Durante muchos años, las llamas se han utilizado para obtener los espectros de emisión por excitación de diversos elementos, y los más modernos espectrómetros de absorción atómica están adaptados para trabajar en la modalidad de emisión de llama ¹⁰⁷.

Las muestras tanto líquidas, que es lo más habitual, como sólidas pueden ser introducidas directamente en el sistema de medida de Absorción atómica con llama. El más habitual es que la muestra a analizar se encuentre en estado líquido y se

introduce mediante un sistema de nebulización, que consta de dos componentes: el nebulizador y la cámara de nebulización. El nebulizador transforma la muestra líquida en un conjunto de gotas muy pequeñas, denominado aerosol primario, éste presenta normalmente una elevada dispersión de tamaño de gota ¹⁰⁷.

Una llama resulta de la reacción exotérmica de un gas combustible y un gas comburente. Se pueden obtener llamas de temperaturas y características muy variadas la naturaleza y proporciones de ambos gases adecuadamente, de manera que las posibilidades de sus aplicaciones analíticas se multiplican ¹⁰⁷.

La elección del tipo de llama dependerá de las propiedades espectroquímicas del elemento, de su forma química en disolución, de la especie química que se puede originar en el seno de la llama, etc. Las llamas más frecuentemente utilizado son las de acetileno/ aire y, para aquellos elementos refractarios que requieren un mayor aporte energético (Al, Si, Ti, V, Zr,...), la de acetileno/óxido nitroso.

La reacción química que genera la llama viene dada por la relación estequiométrica de los correspondientes. Esta proporción de gases en la llama suele modificarse ligeramente, dependiendo del elemento a determinar, para originar llama más oxidante o más reductora, lo que permite optimizar las condiciones de análisis de forma particular, pues se ajustan todos los parámetros hasta conseguir la máxima

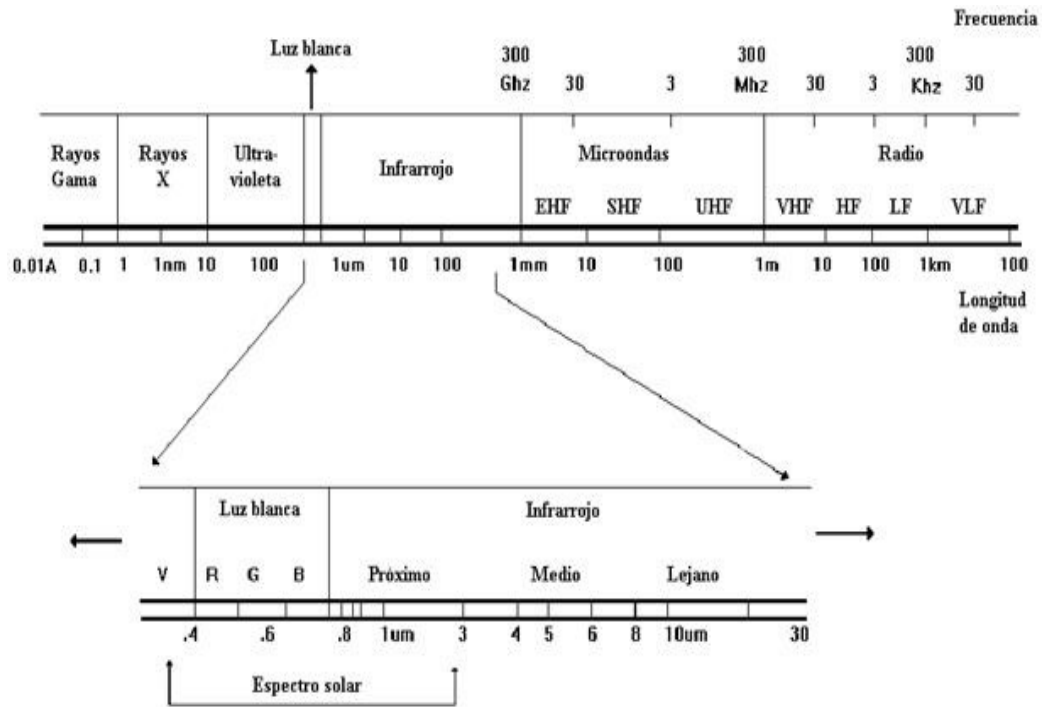
relación señal/ruido. Además, de esta forma se pueden prevenir posibles interferencias, sobre todo de origen químico^{106, 107}.

El dispositivo de aporte más energético más utilizado y estándar para obtener átomo en estado fundamental es una llama, que suministra a la muestra diferentes dosis de energía en cantidad suficiente como para disociar las moléculas, romper sus enlaces y llevar a los átomos hasta el estado fundamental. Las temperaturas que se alcanzan son aproximadamente 2.200K con llamas de acetileno-aire y 2.900 k con llamas de acetileno-óxido nitroso.

2.8 ESPECTROSCOPIA

2.8.1 Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR)

La espectroscopía infrarroja (IR) estudia la interacción entre la materia y la radiación infrarroja, radiación que corresponde a la región del espectro electromagnético que abarca las longitudes de onda entre 0,78 y 1000 μm (micrometro) (que se corresponden a número de onda comprendido entre 12800 y 10 cm^{-1}). Se encuentra entre la zona superior de la región visible y la región de micro-ondas. Los rayos infrarrojos se han utilizado para obtener imágenes de objetos lejanos ocultos por la bruma atmosférica¹⁰⁵.



Espectro electromagnético

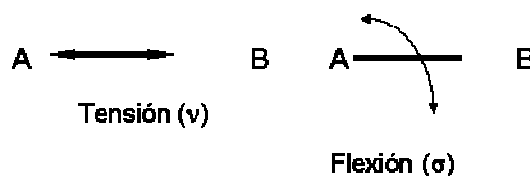
Esta región se divide a su vez en tres regiones denominadas infrarrojo cercano (NIR, 14.300 y 4000 cm^{-1}), que contiene bandas fundamentales y de combinación, infrarrojo medio (MIR, 4000 y 400 cm^{-1}) e infrarrojo lejano (FIR, 400 y 10 cm^{-1}). Las regiones de infrarrojo medio y lejano presentan absorciones debidas a bandas fundamentales, armónicas y de combinación. La gran mayoría de las aplicaciones analíticas clásicas de la espectroscopía infrarroja se basan en el empleo del infrarrojo medio (longitud de onda de $2,5$ a $25\text{ }\mu\text{m}$). Esta radiación es también absorbida por la mayoría de las sustancias (efecto de calentamiento)^{105, 108}.

La espectroscopía infrarroja tiene una gran aplicación en el análisis cualitativo y cuantitativo, siendo su principal utilización la identificación de especies químicas a

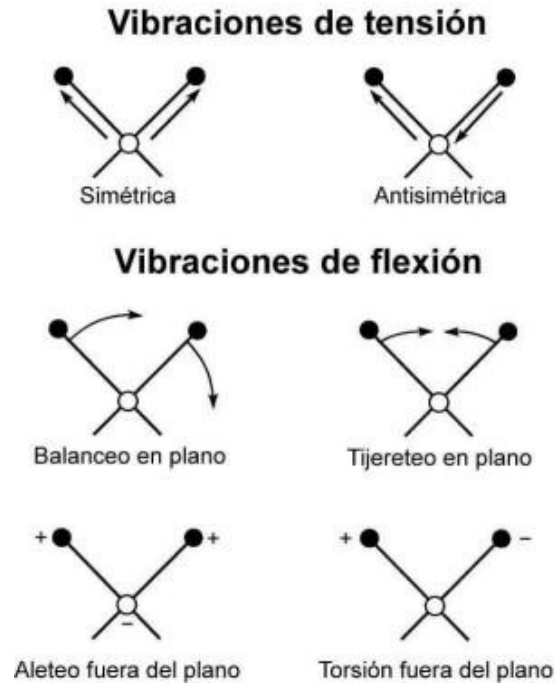
través de la determinación de la frecuencia (número de ondas) a la que los distintos grupos funcionales presentan bandas de absorción en el espectro IR. La intensidad de estas bandas puede utilizarse para determinar la concentración de estas especies en la muestra. Por otra parte, mediante la comparación de los espectros IR de dos muestras se puede determinar si ambas tienen o no la misma composición. Su elevada precisión hace posible la cuantificación de una sustancia en una mezcla compleja, no siendo necesaria una separación previa ¹⁰⁵.

Las posiciones relativas de los átomos en una molécula no están exactamente fijas, sino que fluctúan continuamente como consecuencia de multitud de diferentes tipos de vibración. Para una molécula simple diatómica o triatómica es fácil definir el número y la naturaleza de tales vibraciones, y relacionarlas con las energías de vibración. Sin embargo con moléculas poliatómicas el análisis se hace difícil no sólo a causa del gran número de centros vibratorios, sino porque además ocurren interacciones entre varios centros que deben tomarse en consideración.

Pueden distinguirse dos tipos básicos de vibraciones: de tensión y de flexión.



Una vibración de tensión supone un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son de cuatro tipos: de tijereteo, de balanceo, de aleteo y de torsión.



Tipos de vibraciones

En una molécula que contiene más de dos átomos, pueden darse todos los tipos de vibraciones, además puede producirse una interacción o acoplamiento de las vibraciones si estas implican enlaces a un mismo átomo central, el resultado del acoplamiento es un cambio en las características de las vibraciones. La región infrarroja, contiene además, muchas bandas de absorción significativas que no son debidas a los modos fundamentales de tensión o de flexión, y se referirán a sobretonos, bandas de combinación, acoplamientos y bandas de resonancia de Fermi¹⁰⁵.

Cuando la radiación infrarroja incide sobre una muestra, es capaz de provocar cambios en los estados vibracionales de las moléculas constituyentes de la misma.

La absorción de radiación por parte de una muestra es indicativa del tipo de enlaces y grupos funcionales presentes en la misma. Como cada molécula es una combinación única de átomos y enlaces, el espectro infrarrojo es una identificación de cada compuesto ^{109, 110}.

Esta espectroscopía presenta importantes ventajas como técnica analítica. Permite analizar todo tipo de muestras sólidas, líquidas y gaseosas, siendo una técnica sencilla y rápida, y de una alta sensibilidad. Las aplicaciones son múltiples: análisis de polímeros, aditivos, estudios forenses, identificación de contaminantes ambientales, medicina, diversas áreas de la química (organometálica, orgánica, inorgánica, bioinorgánica, agrícola, industrial), etc ^{109, 110}.

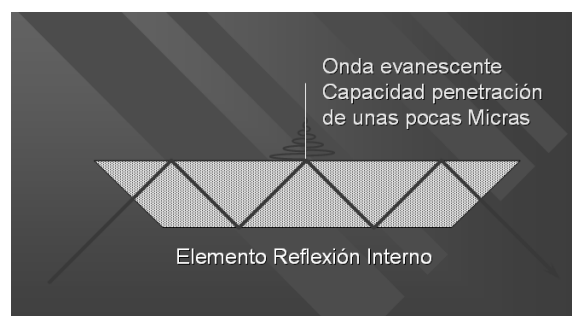
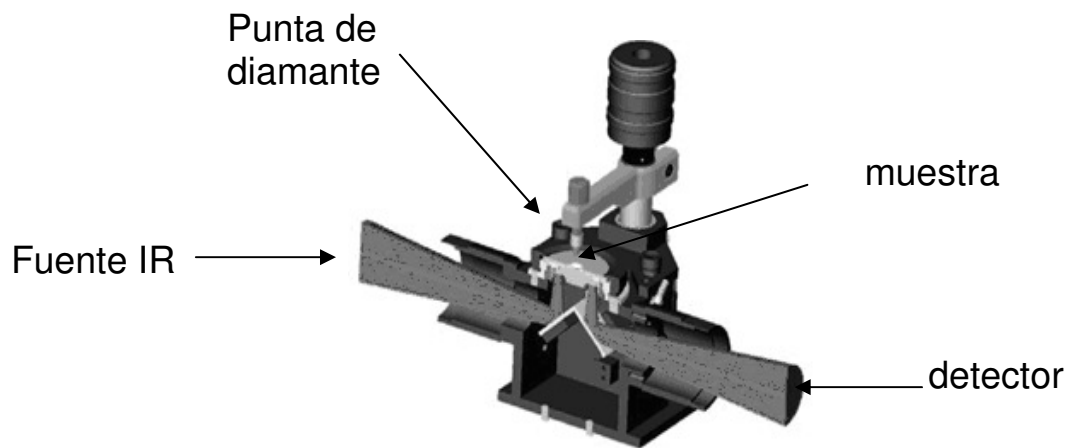
La técnica de transformada de Fourier supuso una revolución en la espectroscopía en general y particularmente en este tipo de espectroscopía, permitiendo la obtención de espectros de forma rápida, precisa y con relaciones Señal/Ruido (S/N) elevadas. Se mejora la señal porque se reciben simultáneamente todas las longitudes de onda del espectro, mientras que en un equipo dispersivo, cada punto del espectro se va registrando sucesivamente ^{109, 110}.

2.8.2 Espectroscopía de Infrarrojo – ATR (Reflectancia Total Atenuada)

El modo más común y sencillo de medir un espectro de una muestra es por transmisión, tanto para muestras sólidas, líquidas y gaseosas. Sin embargo a veces no es posible porque la muestra dispersa la radiación o porque está depositada sobre un soporte que absorbe la radiación. En estos casos se suelen usar otras metodologías, entre las que se encuentra la reflectancia total atenuada (ATR). En el modo ATR las muestras no necesitan ninguna preparación y pueden recuperarse. En el caso del modo de trabajo de transmisión, las muestras sólidas deben mezclarse con KBr para formar una pastilla ^{105, 109, 110}.

En la técnica de ATR se usa un accesorio transparente al infrarrojo sobre el que se deposita la muestra a analizar. Lo más significativo es que el haz incide por detrás de la muestra, y al tratarse de una interfaz donde el medio externo tiene una densidad óptica menor que la del medio donde incide, la radiación sufre reflexión total.

La presencia en la superficie de moléculas que absorben radiación produce una atenuación de la radiación reflejada. Este hecho tiene lugar porque el medio absorbente cambia el índice de refracción local, lo que hace que parte de la radiación penetre en el medio menos denso y sea, por lo tanto, atenuada, de ahí el origen de la denominación de esta técnica.



Esquema de funcionamiento del ATR

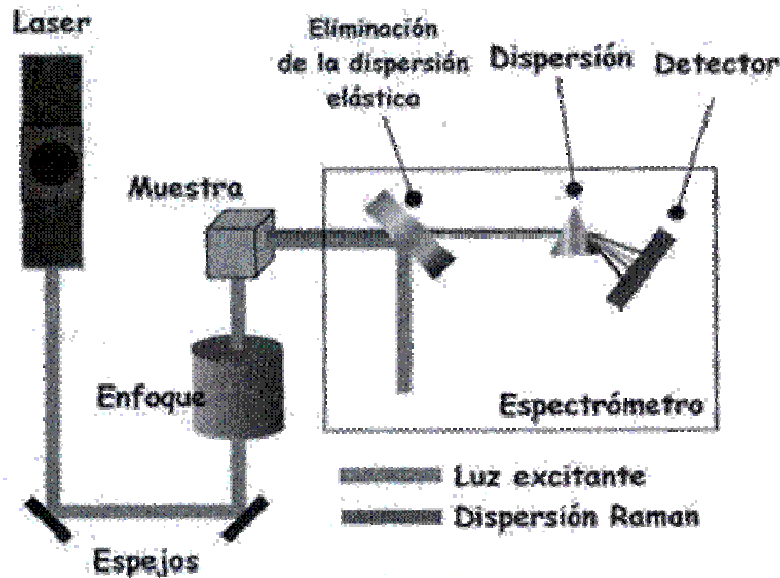
La técnica sirve para medir cualquier muestra no gaseosa que se mantenga presionada sobre la superficie del accesorio. Es especialmente útil para muestras de superficie rugosa, que por transmisión dispersarían la radiación que incide directamente sobre ellas. Como la distancia de penetración de la radiación puede variarse con el ángulo de incidencia, se pueden hacer estudios sobre el cambio de composición de la muestra con la profundidad.

Los espectros obtenidos de esta forma son similares a los de transmisión aunque hay que tener cuidado a la hora de comparar los espectros de transmisión con los de ATR ya que las absorbancias obtenidas por ATR son algo menores que mediante transmisión, especialmente a longitudes de onda cortas. La frecuencia de las bandas será igual pero la intensidad dependerá del ángulo de incidencia y no de

la cantidad de muestra depositada. Además con el dispositivo de ATR los picos pueden aparecer ligeramente desplazados respecto a los de transmisión cuando el contacto entre la muestra y la punta de diamante no es adecuado o uniforme.

2.8.3 Espectroscopía Raman

Las transiciones vibracionales se pueden observar por espectroscopía infrarroja o Raman, pero se registran de manera distinta. En IR se mide la luz infrarroja en función de la frecuencia; por el contrario, el origen del espectro Raman es distinto. La muestra se irradia con un haz láser cuya longitud puede ser cualquiera, ultravioleta, visible o infrarrojo, y se estudia la luz dispersada. Al irradiar con el láser, los fotones del mismo son desplazados a niveles virtuales más altos o más bajos. La energía de esos desplazamientos da información acerca de los estados de energía del sistema y la radiación es recogida y dirigida al monocromador por una lente. Las longitudes de onda próximas a la longitud de onda de excitación son filtradas, y el resto de longitudes de onda son dispersadas hacia el detector ^{105, 111}.



Esquema de un equipo Raman dispersivo

La espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de un compuesto. La interacción entre la radiación incidente y la molécula en estudio da lugar a una excitación de la molécula. La molécula excitada se relaja de dos maneras: a) volviendo a su estado energético en el que se encontraba y entonces se libera una energía igual que la absorbida y, b) la molécula no regresa a su estado inicial, y en este caso la energía liberada es distinta a la absorbida de modo que ha habido un intercambio de energía que es la dispersión inelástica que caracteriza al fenómeno Raman; la molécula ha experimentado ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independientes de la frecuencia de la luz incidente. El análisis mediante espectroscopía Raman se basa pues, en el examen de esa luz dispersada por el material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. El análisis se lleva directamente sobre la muestra a analizar ¹¹¹.

Una de las ventajas de la espectroscopía láser consiste en su alta resolución espacial, es decir, su posibilidad de analizar áreas muy pequeñas (hasta unos micrones) de la muestra, por otro lado tiene la ventaja de poder analizar áreas que no salen a la superficie de la muestra, como inclusiones de minerales. Igualmente, se analiza en la actualidad el contenido químico de las fases líquidas, sólidas y de vapor dentro de las inclusiones fluidas, aportando una enorme cantidad de datos adicionales al estudio microtermométrico de las últimas.

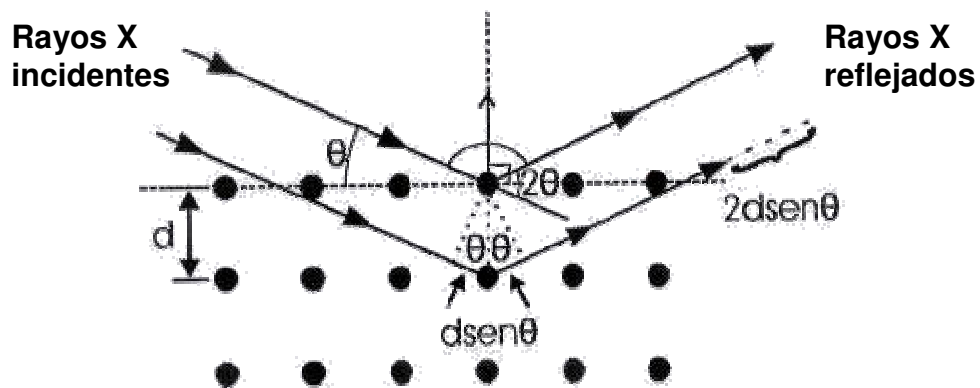
2.9 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

La difracción de rayos X es uno de los fenómenos físicos que se producen al interaccionar un haz monocromático de rayos X de una determinada longitud de onda, con una sustancia cristalina. Además de diversos fenómenos, por ejemplo de absorción, se produce una dispersión de rayos X que mantienen la misma longitud de onda que el haz incidente y que se conoce como dispersión de rayos X coherente que no está distribuida uniformemente en el espacio, sino que es una función de la distribución electrónica de la muestra. De una forma muy simple, la difracción de Rayos X por un cristal y la reflexión de luz por un espejo son parecidas, ya que en ambos fenómenos el ángulo de incidencia es igual al ángulo de reflexión. Si la muestra tiene sus átomos ordenados periódicamente, la intensidad y distribución de los rayos X dispersados forman un patrón de difracción específico que está íntimamente relacionado con la estructura interna del material ^{105, 117}.

El fenómeno de la difracción puede describirse con la ley de Bragg que predice la dirección en la que se da interferencia constructiva entre haces de rayos X dispersados coherentemente por un cristal:

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

donde λ es la longitud de onda del haz de rayos X incidente, d el espaciado de los planos cristalográficos y θ el ángulo de Bragg al que se produce la difracción,



$$n \lambda = 2 d \sin \theta$$

Representación de la condición necesaria para la difracción

La aplicación de esta radiación ha sido ampliamente utilizada en medicina en el diagnóstico de patologías gracias al poder de penetración a través de materiales blandos (radiografías) y por otro lado, actualmente, es una técnica usada de forma rutinaria para la caracterización de materiales cristalinos tanto inorgánicos como orgánicos y para la determinación de su estructura atómica o molecular.

2.10 MÉTODOS TÉRMICOS Y CALORIMÉTRICOS

El análisis térmico es, por definición, la medida de los cambios físicos o químicos que ocurren en una sustancia en función de la temperatura mientras la muestra se calienta (o se enfría) con un programa de temperaturas controlado.

Así, la medida se puede hacer sobre los valores absolutos de una propiedad (p.ej. el peso o el módulo de compresibilidad), sobre la diferencia entre las propiedades de una muestra y un material de referencia que no se ve afectado en esas condiciones (p.ej. la temperatura, o el flujo de calor necesario para mantener los dos materiales a la misma temperatura) y sobre la velocidad de cambio de una propiedad (p.ej. derivada de peso o de otra propiedad). En función de la medida que se produzca, se pueden distinguir varios análisis. Los métodos térmicos más utilizados son tres:

- ◆ Análisis termogravimétrico ATG
- ◆ Análisis térmico diferencial ATD
- ◆ Calorimetría diferencial de barrido DSC (Differential scanning calorimetry).

En el primero se registran cambios de peso de las sustancias y en los otros dos, cambios de energía.

El análisis térmico gravimétrico es una de las técnicas de análisis térmico en las que se determina la pérdida o ganancia de masa en función de la temperatura (ATG). La curva que se obtiene derivando la del análisis termogravimétrico puede suministrar, en algunos casos, información adicional (DTG). El análisis térmico

diferencial (ATD) se basa en registrar la temperatura de una muestra en comparación con la de un material térmicamente inerte cuando la muestra es calentada o enfriada a una velocidad constante en atmósfera controlada. Si en vez de medir cambios de temperatura entre la muestra y la referencia lo que se miden son diferencias en la cantidad de calor absorbido o desprendido entre la muestra y la referencia, tendremos lo que se llama la calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Existen además diversas técnicas múltiples que combinan métodos térmicos o bien un método térmico y un método de detección de gases.

El análisis termogravimétrico (TG y DTG) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC) han sido ampliamente utilizados para el estudio de las reacciones primarias en la descomposición de sólidos, para el estudio de la descomposición térmica de muchos materiales, estudio de transiciones de primer orden (fusión, cristalización etc.), identificación de polímeros, determinación de purezas, estudios cinéticos, oxidaciones etc. La interpretación de los datos experimentales puede proporcionar información detallada acerca de la composición del material, orden de reacción, número de procesos distintos que tienen lugar y las correspondientes constantes cinéticas^{105, 111}.

Hipótesis

3 HIPOTESIS

Nos hemos propuesto como hipótesis de este trabajo que:

- El peróxido de carbamida y el peróxido de hidrógeno al 30% rutinariamente utilizado en la clínica para realizar los procedimientos de blanqueamiento dental, no van a modificar el poder descalcificante del ácido fosfórico utilizado en la técnica de grabado ácido del esmalte.

Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el poder descalcificante del ácido fosfórico al 37% sobre esmalte dental bovino después del tratamiento blanqueador con peróxido de carbamida y peróxido de hidrógeno en los períodos de 15, 30, 60, 90 y 120 segundos.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Verificar la cantidad de calcio que pasa a la disolución de ácido fosfórico al 37% cuando el esmalte no ha sido sometido a tratamiento con blanqueador (Grupos Control), en los períodos de 15, 30, 60, 90 y 120 segundos.
- Verificar la cantidad de calcio que pasa a la disolución de ácido fosfórico al 37%, después del blanqueamiento inmediato y 24 horas, 72 horas, 7 días, tras el tratamiento blanqueador, en los períodos de 15, 30, 60, 90 y 120 segundos.
- Comparar la pérdida de calcio que pasa a la disolución de ácido fosfórico al 37%, cuando se utiliza los agentes blanqueadores (Peróxido de Carbamida y Peróxido de Hidrógeno).

- Determinar mediante espectroscopia infrarroja y Raman del grado de mineralización después del tratamiento ácido.
- Determinar de la composición mineralógica y cristalinidad de las muestras de esmalte mediante difracción de rayos X.

Materiales y Métodos

5 MATERIALES Y MÉTODO

5.1 MATERIALES

A continuación se indican los materiales y aparatos utilizados, en la presente memoria, para el estudio de las muestras de esmalte procedente de dientes bovinos.

- Saliva artificial (Laboratorio Farmacia – UGR)
- Peróxido de Hidrógeno al 30% (Illumine Office™)
- Peróxido de Carbamida al 30% (Vivastyle®)
- Ácido fosfórico al 85 % (Scharlau AC 1100-Barcelona , España)
- Suero fisiológico (Fisiológico Braum – Barcelona)
- Agua Milli-Q
- KBr (FT-IR grade, ≥99% trace metals basis (Sigma-Aldrich)
- Nevera (Rodiber. S.A)
- Lupa (Olimpo España óptico, Barcelona, España)
- Turbina de alta rotación (Kavo – Alemania)
- Cortadora ACCUTOM HARD TISSUE MICROTOME (Struers –Denmark)
- Cortadora STRUERS ACCUTOM 50 (Struers - Denmark)
- Pulidora Exakt (APPARATEBAU D-200 NORDESRSTEDT)
- Balanza digital de precisión (AND HM-202 - Japan)

- Micro pipeta 1-5ml (BOECO - Germany)
- Agitador – MAGNETIC STIRRER MS3000 (BOECO - Germany)
- Cámara digital Canon 620 (7.1mega píxeles)
- Ordenador portátil Toshiba
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica – Perkin Elmer 5100ZL
- Cronómetro
- Estufa Selecta – España
- pH-metro – CRISON microph2000
- Lupa (Olimpo España óptico, Barcelona, España)
- Disco de lija de agua grano P-220 y 500 (WS Struers 18-B, Dinamarca)
- Cera de baja temperatura
- Jeringa desechable de 10cc
- Vaso precipitado de 50ml
- Vaso precipitado 30ml
- Tamices de acero CISA
- Centrífuga HETTICH EBA 21
- Estufa SELECTA P
- Balanza METLER Toledo AX 26
- Espectrofotómetro TERMO NICOLET IR 200
- Prensa SPECAC
- Espectrofotómetro por Transformada de Fourier EQUINOX 55
- Accesorio para ATR Golden Gate Single Reflection Diamond ATR System de Specac.
- Accesorio Bruker FRA 106 para espectros Raman
- Difractómetro de rayos x en polvo BRUKER D8 ADVANCE

- Analizador termogravimétrico (TG) SHIMADZU mod. TGA-50H
- Calorímetro diferencial de barrido (DSC) SHIMADZU mod. DSC-50Q

5.2 MÉTODO

5.2.1 Diseño del Estudio

Hemos realizado un estudio experimental *in vitro*, descriptivo, de tipo transversal y procesado estadísticamente de la influencia del Peróxido de Carbamida y Peróxido de Hidrógeno sobre el poder descalcificante del ácido fosfórico utilizando un Espectrofotómetro de Absorción Atómica y hemos evaluado las alteraciones producidas en el esmalte bovino mediante espectroscopia de infrarrojos.

Este estudio ha sido realizado en el laboratorio de investigación del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología y en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencia. Los análisis de las muestras se han realizado en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada y en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga

5.2.2 Selección de la Muestra

Hemos utilizado 25 dientes incisivos de bovino que fueron extraídos inmediatamente después del sacrificio de los terneros y almacenados en agua destilada con algunos cristales de timol en nevera hasta su utilización.

5.2.3 Preparaciones de los Especímenes

A todos los incisivos, se les eliminó la raíz a nivel del límite amelocementario con disco de diamante en una cortadora ACCUTOM (Struers – Dinamarca). Las coronas fueran pulidas con disco de carbono silicio en la pulidora EXAKT-APPARATEBAU D-2000 NORDERSTEDT, para eliminar las convexidades y conseguir unos límites rectos, con finalidad de llevarlos a la cortadora STRUERS ACCUTOM-50, donde había sido previamente programada para obtener trocitos de la corona de tamaño 4x4mm. De cada corona se obtuvieron 5 trocitos, posteriormente se pesaron en una balanza de precisión (AND / HM-202). Para igualar el peso entre los especímenes, se utilizó un disco de lija de agua de 500grits, siempre quitando de la superficie interior de la sección para no modificar su geometría (Figura 2). De este modo de cada corona obtuvimos 5 secciones con la misma calcificación y geometría (Figura 3). Posteriormente se comprobó en una lupa (Olimpo España óptico, Barcelona, España), que todas las superficies expuestas correspondían a esmalte (Figura 4).



Figura 2- Secuencia de la preparación del espécimen

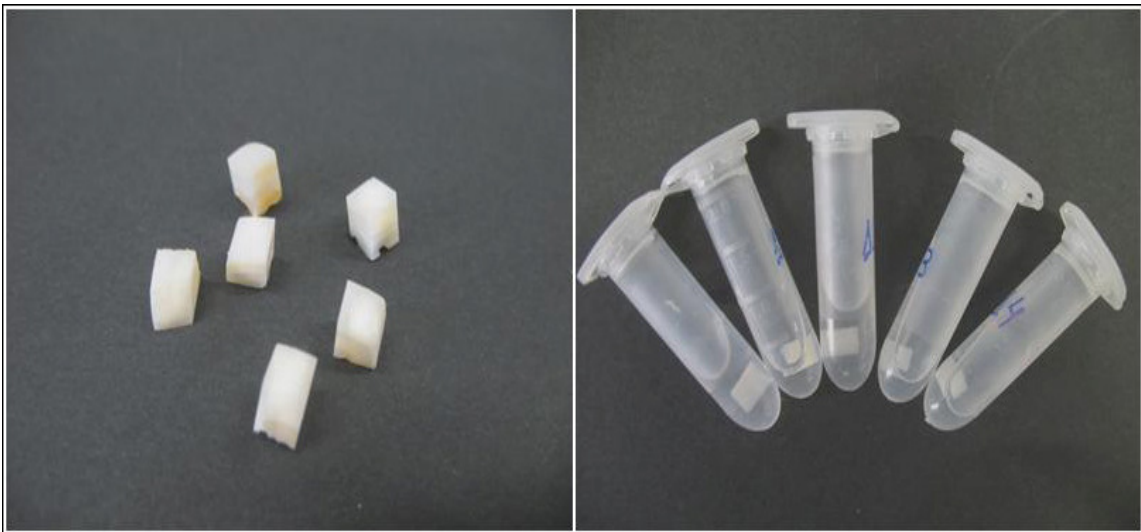


Figura 3 - Especímenes cortados 4 x 4mm.



Figura 4 – Lupa y balanza

5.3 SUSTANCIAS BLANQUEADORAS UTILIZADAS EN LA INVESTIGACIÓN

5.3.1 Peróxido de Carbamida (PC)

Utilizamos el peróxido de carbamida al 30% marca **VivaStyle® 30%** de la casa Ivoclar Vivadent (Figura 5). El gel blanqueador se aplicó a los especímenes durante 90 minutos y fue cambiado completamente cada 30 minutos. Una vez transcurridos los 90 minutos, se eliminó el gel remanente con abundante agua.



Figura 5 - Agente blanqueador (Peróxido de Carbamida 30%)

5.3.2 Peróxido de Hidrógeno (PH)

La sustancia utilizada fue el **Illuminé™ office** de la casa Dentsply DeTrey (Figura 6). El procedimiento de uso es sencillo y consiste básicamente en las siguientes etapas: **Illumine™ Office** se presenta en *kits* con dobles jeringas: una jeringa A y otra jeringa B, en la jeringa A: presenta el catalizador que se va a ocupar de fragmentar el H_2O_2 en las mejores condiciones para así obtener el mayor número posible de radicales HO_2 , y en la Jeringa B: peróxido de hidrógeno al 30%. Y para utilizar se mezcla ambas jeringas, para activar el peróxido de hidrógeno, durante un breve tiempo, 30 segundos aproximadamente (Figura 7).

El gel blanqueador fue aplicado a los especímenes, por un periodo de 90 minutos, cambiando el gel a cada 30 minutos, transcurrido el tiempo propuesto quitamos con una gasa todo el gel que haya quedado adherido a los dientes y se enjuagó abundantemente.



Figura 6 - Agente blanqueador (Peróxido de hidrógeno al 30%)

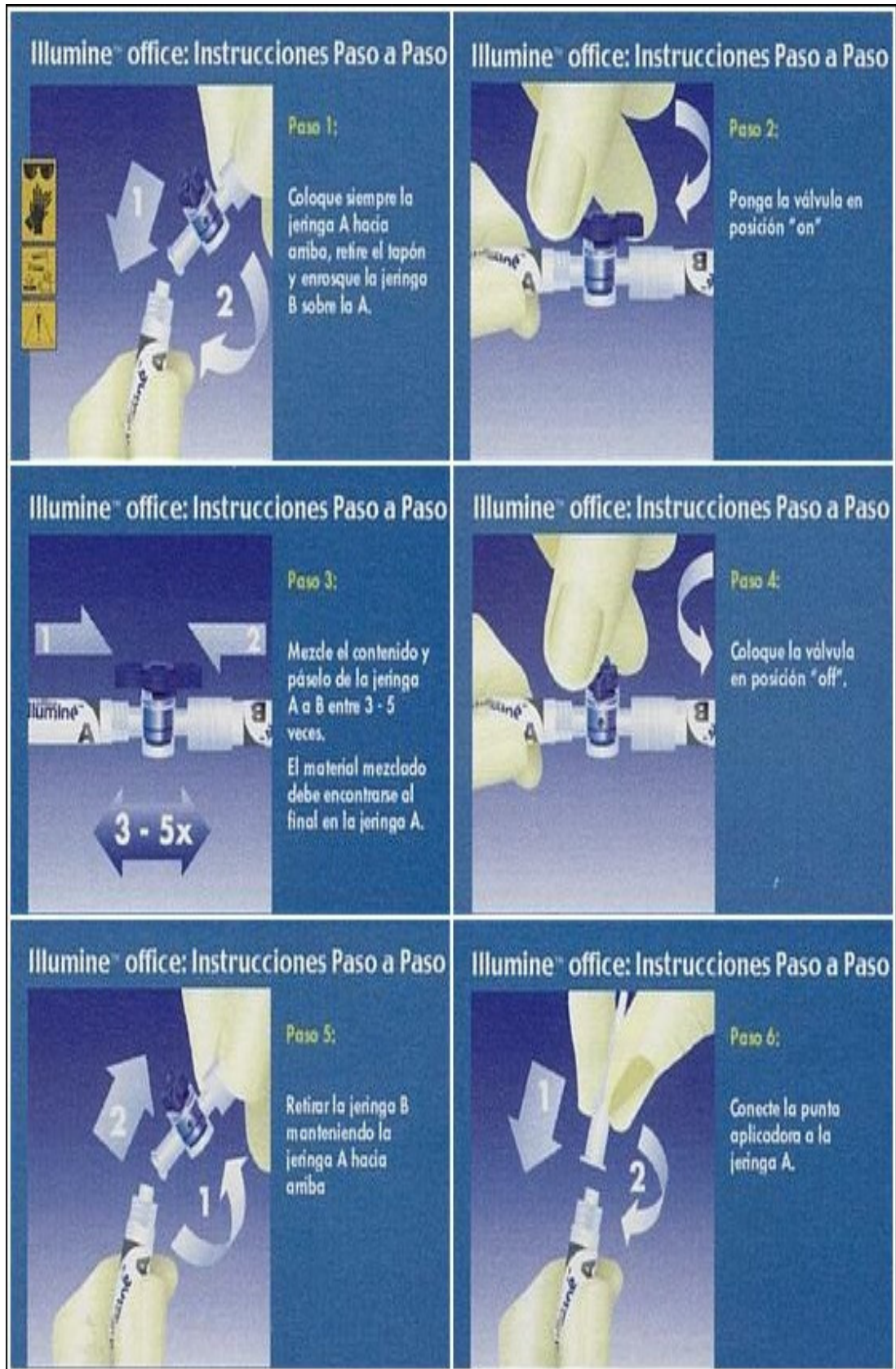


Figura 7 - La secuencia utilizada para la preparación de la sustancia blanqueadora.

5.4 DIVISIÓN DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

De los 25 dientes bovinos, 10 fueron utilizados en los experimentos con peróxido de carbamida al 30% y los demás 15 dientes bovinos fueron utilizados con peróxido de hidrógeno al 30%, totalizando 25 muestras. Cada muestra estaba formada por cinco especímenes, que se dividieron en cinco grupos. Y cada grupo fue evaluado en 5 tiempos distintos 15, 30, 60, 90 y 120 segundos, según el esquema (Tabla 1).

5.4.1 Tratamiento con Peróxido de Carbamida

El agente blanqueador peróxido de carbamida (**VivaStyle® 30%**) fue testado, en 10 muestras anteriormente citadas (PC1; PC2; PC3; PC4; PC5; PC6; PC7; PC8; PC9; PC10). Cada muestra estaba formada por cinco especímenes, que se dividieron en cinco grupos. **I - (C) Control** no se utilizó ningún agente blanqueador; el **II - (BL-I) blanqueamiento Inmediato**, se utilizó el peróxido de carbamida al 30%; el **III - (BL-24h) blanqueamiento 24 horas**, se utilizó el peróxido de carbamida al 30% y después se almacenó en saliva artificial durante 24 horas; el **IV - (BL-72h), blanqueamiento 72 horas** se utilizó el peróxido de carbamida al 30% y después se almacenó en saliva artificial durante 72 horas y el **V grupo (BL-7d) blanqueamiento**

días se utilizó el peróxido de carbamida al 30% y después se almacenó en saliva artificial durante 7 días. Cada grupo fue evaluado en 5 tiempos distintos 15, 30, 60, 90 y 120 segundos. En total se obtuvieron 250 experimentos (Tabla 2)

Tabla 1 - Organización de la muestras con Peróxido de Carbamida (PC) y Peróxido de Hidrógeno (PH)

<i>MUESTRAS</i>	<i>GRUPOS</i>	<i>Tiempos('')</i>	<i>MUESTRAS</i>	<i>GRUPOS</i>	<i>Tiempos('')</i>			
PC 1	PC6	CONTROL	15, 30, 60, 90, 120	PH 1	PH6	PH11	CONTROL	15, 30, 60, 90, 120
		BL I	15, 30, 60, 90, 120				BL I	15, 30, 60, 90, 120
		BL 24hs	15, 30, 60, 90, 120				BL 24hs	15, 30, 60, 90, 120
		BL 72hs	15, 30, 60, 90, 120				BL 72hs	15, 30, 60, 90, 120
		BL 7días	15, 30, 60, 90, 120				BL 7días	15, 30, 60, 90, 120
PC 2	PC 7	CONTROL	15, 30, 60, 90, 120	PH 2	PH7	PH 12	CONTROL	15, 30, 60, 90, 120
		BL I	15, 30, 60, 90, 120				BL I	15, 30, 60, 90, 120
		BL 24hs	15, 30, 60, 90, 120				BL 24hs	15, 30, 60, 90, 120
		BL 72hs	15, 30, 60, 90, 120				BL 72hs	15, 30, 60, 90, 120
		BL 7días	15, 30, 60, 90, 120				BL 7días	15, 30, 60, 90, 120
PC 3	PC 8	CONTROL	15, 30, 60, 90, 120	PH 3	PH 8	PH 13	CONTROL	15, 30, 60, 90, 120
		BL I	15, 30, 60, 90, 120				BL I	15, 30, 60, 90, 120
		BL 24hs	15, 30, 60, 90, 120				BL 24hs	15, 30, 60, 90, 120
		BL 72hs	15, 30, 60, 90, 120				BL 72hs	15, 30, 60, 90, 120
		BL 7días	15, 30, 60, 90, 120				BL 7días	15, 30, 60, 90, 120
PC4	PC 9	CONTROL	15, 30, 60, 90, 120	PH4	PH 9	PH 14	CONTROL	15, 30, 60, 90, 120
		BL I	15, 30, 60, 90, 120				BL I	15, 30, 60, 90, 120
		BL 24hs	15, 30, 60, 90, 120				BL 24hs	15, 30, 60, 90, 120
		BL 72hs	15, 30, 60, 90, 120				BL 72hs	15, 30, 60, 90, 120
		BL 7días	15, 30, 60, 90, 120				BL 7días	15, 30, 60, 90, 120
PC 5	PC 10	CONTROL	15, 30, 60, 90, 120	PH 5	PH 10	PH 15	CONTROL	15, 30, 60, 90, 120
		BL I	15, 30, 60, 90, 120				BL I	15, 30, 60, 90, 120
		BL 24hs	15, 30, 60, 90, 120				BL 24hs	15, 30, 60, 90, 120
		BL 72hs	15, 30, 60, 90, 120				BL 72hs	15, 30, 60, 90, 120
		BL 7días	15, 30, 60, 90, 120				BL 7días	15, 30, 60, 90, 120

Tabla 2 - Grupos de estudios con Peróxido de Carbamida

GRUPOS	TRATAMIENTO
Grupo I - Control (C)	Ácido fosfórico al 37%
Grupo II - Blanqueamiento Inmediato (BL-I)	Peróxido de Carbamida al 30% y ácido fosfórico al 37%.
Grupo III - Blanqueamiento 24horas (BL-24)	Peróxido de Carbamida al 30%, inmersión en saliva artificial durante 24h y grabado con ácido fosfórico al 37%.
Grupo IV - Blanqueamiento 72horas (BL-72)	Peróxido de Carbamida al 30%, inmersión en saliva artificial durante 72h y grabado con ácido fosfórico al 37%.
Grupo V Blanqueamiento 7días (BL-7d)	Peróxido de Carbamida al 30%, inmersión en saliva artificial durante 7 días y grabado con ácido fosfórico al 37%.

5.4.2 Tratamiento con Peróxido de Hidrógeno

Se utilizaron 15 dientes incisivos de bovinos para testar el efecto del peróxido de hidrógeno, totalizando 15 Muestras (PH1; PH2; PH3; PH4; PH5; PH6; PH7; PH8; PH9; PH10; PH11; PH12; PH13; PH14 y PH15)). Cada muestra estaba formada por cinco especímenes, que se dividieron en cinco grupos: **I - (C) Control** no fue utilizado ningún agente blanqueador; el **II - (BL-I) blanqueamiento Inmediato**, se utilizó el peróxido de Hidrógeno al 30%; el **III - (BL-24hs) blanqueamiento 24 horas**, se utilizó el peróxido de hidrógeno al 30%; el **IV - (BL-72hs), blanqueamiento 72 horas** se utilizó el peróxido de hidrógeno al 30% y se almacenó en saliva artificial durante 72h y el grupo **V (BL-7días) blanqueamiento 7 días** se

utilizó el peróxido de hidrógeno al 30% y se almacenó en saliva artificial durante 7 días. Cada grupo fue evaluado en 5 tiempos distintos 15, 30, 60, 90 y 120 segundos. Totalizando 25 experimentos por muestra estudiada, multiplicado por 15, que fue la cantidad de muestras estudiadas, se obtuvieron 375 experimentos (Tabla 3).

Tabla 3 - Grupos de estudios con Peróxido de Hidrógeno

GRUPOS	TRATAMIENTO
Grupo I - Control (C)	Ácido fosfórico al 37%
Grupo II - Blanqueamiento Inmediato (BL-I)	Peróxido de Hidrógeno al 30% y ácido fosfórico
Grupo III - Blanqueamiento 24horas (BL-24)	Peróxido de Hidrógeno al 30%, inmersión en saliva artificial por 24h y grabado con ácido fosfórico al 37%.
Grupo IV - Blanqueamiento 72horas (BL-72)	Peróxido de Hidrógeno al 30%, inmersión en saliva artificial por 72h y grabado con ácido fosfórico al 37%.
Grupo V - Blanqueamiento 7días (BL-7d)	Peróxido de Hidrógeno al 30%, inmersión en saliva artificial por 7 días y grabado con ácido fosfórico al 37%.

5.5 DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Todos los grupos fueron previamente sometidos a dos tratamientos, primero con un agente blanqueador y después al ácido fosfórico al 37%, excepto los especímenes del grupo **Control**, que solamente fueron inmersos en el ácido fosfórico al 37%.

La solución de ácido fosfórico a 37% fue preparada a partir de una disolución de 311mL de 85% de ácido ortofosfórico (Scharlau AC 1100-Barcelona, España), con la densidad de 1.71 g/mL en 689mL de agua bidestilada para obtener 1000mL de solución de ácido fosfórico al 37% con pH de 0.14, medidos en el pH-metro (CRISON – micro pH2000).

Previamente se preparó un blanco conteniendo ácido fosfórico al 37% para determinar los niveles de Ca^{2+} en ausencia del espécimen.

Los grupos de **blanqueamiento inmediato, blanqueamiento 24 horas, blanqueamiento 72 horas y blanqueamiento 7 días** fueron previamente sumergidos en la sustancia blanqueadora (Peróxido de Carbamida o Peróxido de Hidrógeno). Cuando utilizamos **VivaStyle® 30%** dejamos el gel blanqueador en contacto con el espécimen durante 90 minutos, cambiando todo el gel a cada 30 minutos, según las instrucciones del fabricante. Con el **Illuminé Office™** los especímenes se mantuvieron en contacto durante 90 minutos. Inmediatamente después de terminar el blanqueamiento los especímenes fueron lavados con abundante agua, secados con papel absorbente y sumergidos en la saliva artificial en un recipiente hermético. Posteriormente se mantuvieron en una estufa a 37° C, durante el período de tiempo de prueba especificado (24h, 72h o 7 días), para que hubiera una aproximación entre las condiciones experimentales en la cavidad oral (Tabla 4). Los especímenes que fueron evaluados inmediatamente tras el procedimiento de blanqueo (**BL-I**), no se sumergieron en saliva artificial.

Todos los especímenes del grupo control y experimental fueron sometidos al mismo procedimiento experimental. Las muestras fueron introducidas en un vaso de

precipitado, que contenía 30mL de disolución de ácido fosfórico al 37%, con agitación constante mediante un agitador magnético (SBS A-09 series C, Barcelona, España) para homogeneizar la distribución de los iones Ca^{2+} . El tiempo de reacción fue de 15, 30, 60, 90 y 120 segundos. De la disolución se extrajeron, a cada tiempo indicado, alícuotas de 5mL, utilizando una micropipeta calibrada de puntas desechables. Las extracciones fueron puestas en viales de cristal herméticamente sellados y cuidadosamente etiquetados. La concentración de Ca^{2+} en la solución extraída fue determinada por Espectrofotometría de Absorción Atómica (Perkin Elmer mod. 5100ZL) usando la técnica de llama. Los resultados obtenidos, en ppm, se expresaron en mg de Ca^{2+} eliminado por gramo de muestra.



Figura 8 -Secuencia del los procedimientos experimentales.

Tabla 4 - Formulación de la saliva artificial utilizada.

COMPOSICIÓN	CANTIDAD
Cloruro de calcio	0,21g
Cloruro de potasio	4,8g
Cloruro de sodio	3,4g
Cloruro de magnesio	0,27g
Fosfato de potasio	1,32g
Benzoato de sodio	1g
Carboximetilcelulose sódica	25g
Sorbitol	120g
Agua destilada	4850ml

5.6 DETERMINACIÓN DE CALCIO

La concentración de calcio de las disoluciones fue determinada mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica (Perkin Elmer mod. 5100ZL) utilizando El método de llama aire/acetileno (Figura 9).

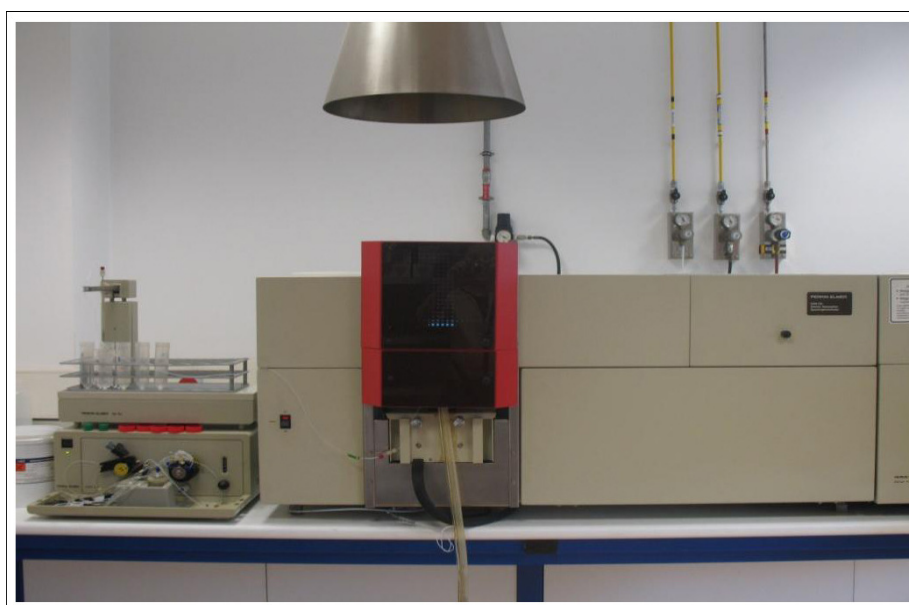


Figura 9- Espectrofotómetro de Absorción Atómica - Perkin Elmer mod. 5100 ZL

En este método la solución muestra, es directamente aspirada a una llama de flujo laminar. La llama tiene como función generar átomos en su estado fundamental de los elementos, presentes en la solución muestra. Temperaturas cercanas a los 1500–3000°C son suficientes para producir la atomización de un gran número de elementos, los que absorben parte de la radiación proveniente de la fuente luminosa. Es la más empleada, debido a que ofrece para muchos elementos, un medio ambiente y temperatura suficientes para la atomización. La llama es completamente transparente y solamente muestra auto absorción bajo los 230nm. La longitud de onda utilizada fue de 422,7nm. El Espectrofotómetro fue calibrado con soluciones de referencia Standard 0, 1, 2, 4, 6 y 8 ppm. La disolución de partida fue de 1000 ppm (Merck Inc. Whitehouse NJ USA). Tanto a las muestras como a los patrones se le añadieron 1000 ppm de CsCl (Cloruro de Cesio) y óxido de lantano con el fin de evitar falsos positivos. Los falsos positivos se pueden producir en las soluciones acuosas que contienen el sodio, el potasio, y el magnesio.

Los resultados de la lectura de calcio fueron obtenidos en ppm, y posteriormente expresados en mg de Ca²⁺

$$\text{mg} \cdot \text{Ca}^{2+} = (\text{ppm} \cdot \text{Ca}^{2+}) \times 10^{-3} \text{ L/mL} \times V(\text{mL}) \times 1 / P(\text{mg})$$

ppm: parte por millón de Ca^{2+} en cada período de tiempo (mg/L)

L: litro

mL: mililitros

V: volumen de la solución (**V1=** a los 15 segundos, **V2=** 30 segundos, **V3=** 60 segundos, **V4=** 90 segundos y **V5=** 120 segundos)

P: peso de la muestra (mg)

Para el cálculo de los miligramos de calcio extraídos se procedió siguiendo el esquema indicado en la figura 10. A los 15, 30, 60, 90 y 120 segundos el volumen resultante de las disoluciones fue de 30, 25, 20, 15 y 10 mL respectivamente debido a la extracción de alícuotas de 5 mL en cada período de tiempo. La cantidad total de mg de Ca^{2+} , en cada uno de esos períodos, se calculó mediante la expresión anteriormente mostrada, sumando los correspondientes mg que contenían las alícuotas de 5 mL extraídas.

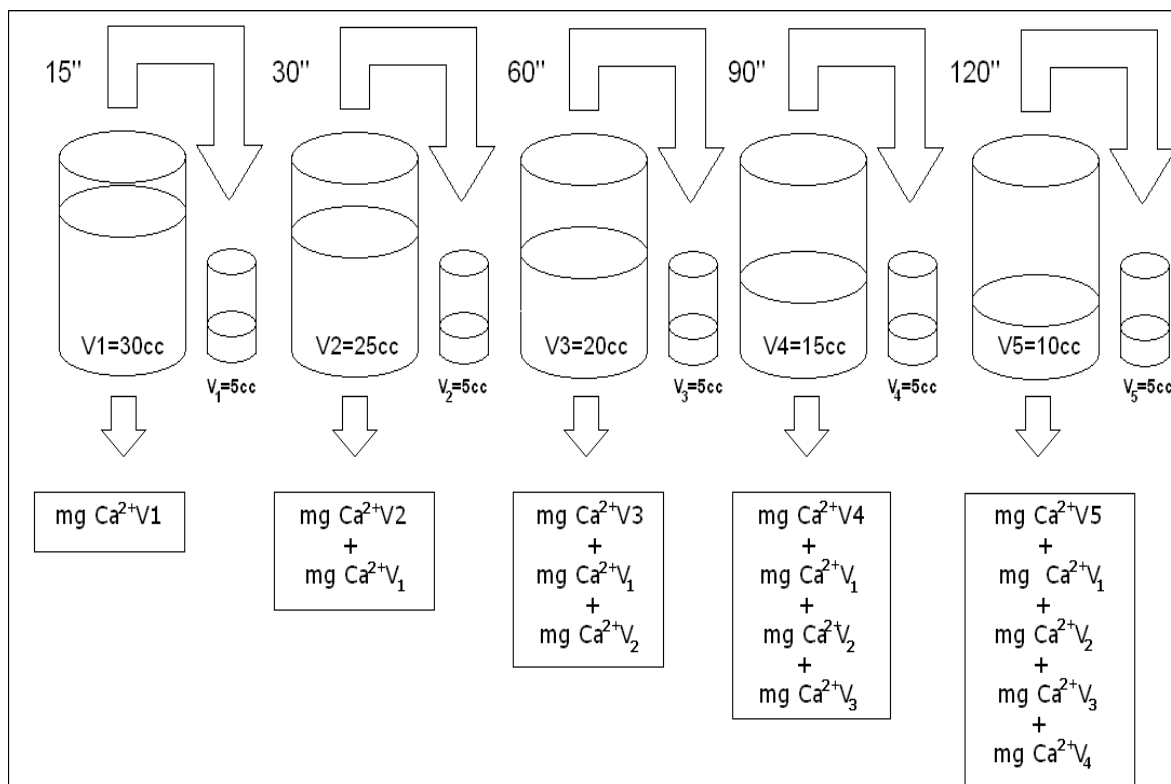


Figura 10 – Esquema gráfico para los cálculos de mg de Ca^{2+} .

5.7 ESTUDIO EN FASE SÓLIDA DE LAS MUESTRAS DE ESMALTE

5.7.1 Preparación de las Muestras

Se ha estudiado el efecto del ácido fosfórico y agua oxigenada sobre muestras de esmalte de dientes bovinos finamente pulverizadas. Las muestras se homogeneizaron con el objeto de obtener estudios comparativos, y que fueran representativos de los efectos de dichos tratamientos, de IR (Infrarrojo), ATR (reflectancia total atenuada), de DRX (difractogramas de rayos X) y análisis de TG (termogravimétrico) y DSC (calorimetría diferencial de barrido). Este trabajo supone un inicio en este campo que en un futuro será ampliado.

Se utilizaron incisivos de bovino a los que después de eliminar la raíz con un disco de diamante, se volvieron a cortar en trozos más pequeños exponiendo la dentina, posteriormente, se desgastaron con disco de carbono de silicio en una pulidora EXAHT-Apparatebau D-2000 Norderstedt hasta eliminar toda la dentina y dejar solo esmalte, posteriormente se comprobó en una lupa (Olimpo España. Barcelona) que no había restos de dentina. Posteriormente se molturaron en un mortero de ágata (Figura 11) y se tomaron 200 mg. La muestra pulverizada se tamizó usando tamices de acero CISA de luz de malla 250, 200, 150 y 100 micras, obteniendo cuatro fracciones de muestras homogéneas (Figura 12 y Tabla 5)

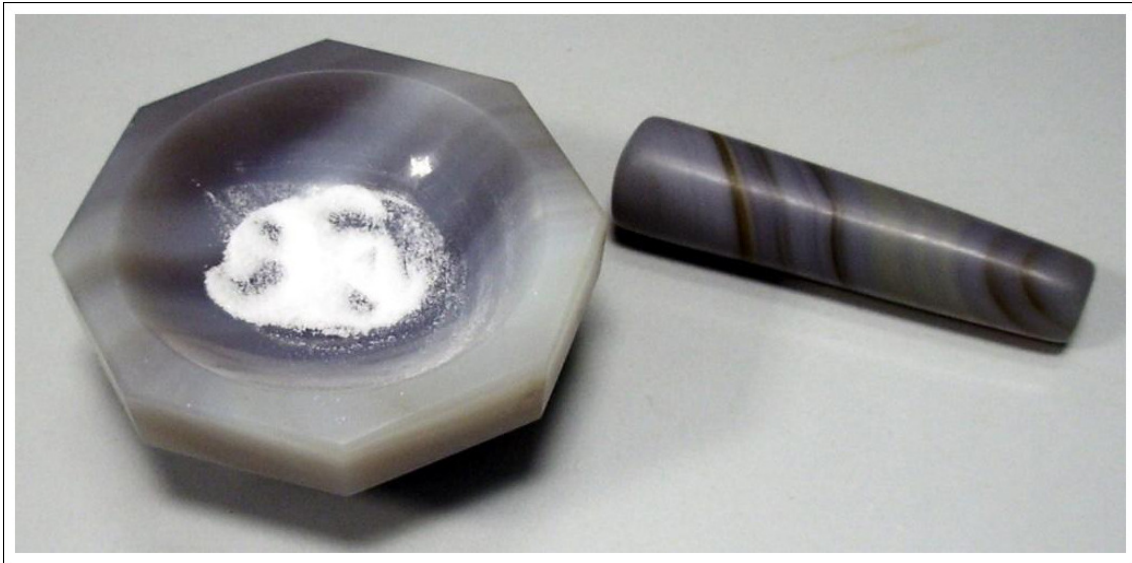


Figura 11 – Mortero de Ágata



Figura 12 - Tamices

Tabla 5 – Fracciones de muestras

<i>Muestra</i>	<i>Tamaño (micras)</i>
Fracción-1	250< F-1
Fracción-2	150< F-2 <250
Fracción-3	100< F-3 <150
Fracción-4	100> F-4

Para las experiencias se escogió la fracción de tamaño de grano comprendido entre 200-150 micras que llamaremos fracción-2.

Se hicieron 11 grupos de 30 mg cada uno utilizando uno de ellos como control (F2-control). El primer grupo se trató con H_2O_2 al 30% (Scharlau Chemie S.A.) durante 1 hora y 30 minutos (F2-PH), una segunda fracción también se trató con agua oxigenada en las mismas condiciones que anteriormente, seguido de un tratamiento durante 5 minutos con 1ml de ácido fosfórico al 0,1% preparado por dilución de ácido fosfórico del 85% (Scharlan Cemise SA) (F2-ácidoPH), en agua bidestilada, (purificada a través de un sistema Milli-Q), y con el resto de los grupos se procedió como se indica a continuación: Cada muestra fue tratada con 1 ml de ácido fosfórico al 0,1% a diferentes tiempos (1, 2, 3, 5, 19, 15, 30 y 90 minutos que se corresponden con las muestras F2-1, F2-2, F2-3, F2-5, F2-10, F2-15, F2-30, F2-90 respectivamente) tal como se indica en la tabla 6.

Las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 2000 rpm en una centrífuga HETTICH EBA 21 (Figura 13). A continuación se lavaron con agua bidestilada hasta pH neutro, se filtraron, se secaron en una estufa SELECTA P a $100^{\circ}C$ y se pesaron en una balanza METLER Toledo AX 26 (Figura 14).

Tabla 6 - Muestras de esmalte tratadas con ácido fosfórico y peróxido de hidrógeno.

Referencia	Peso (gr)	Reactivo	Tiempo de Tratamiento
F- 2 (PH)	30mg	Peróxido de Hidrógeno al 30%	1hs 30'
F- 2 (Acido +PH)	30mg	Peróxido de Hidrógeno al 30%	1hs 30'
		Ac. Fosfórico al 0,1%	5'
F- 2 (1'')	30mg	Ac. Fosfórico al 0,1 %	1'
F- 2 (2')	30mg	Ac. Fosfórico al 0,1 %	2'
F- 2 (3')	30mg	Ac. Fosfórico al 0,1 %	3'
F- 2 (5')	30mg	Ac. Fosfórico al 0,1 %	5'
F- 2 (10')	30mg	Ac. Fosfórico al 0,1 %	10'
F- 2 (15')	30mg	Ac. Fosfórico al 0,1 %	15'
F- 2 (30')	30mg	Ac. Fosfórico al 0,1 %	30'
F- 2 (90')	30mg	Ac. Fosfórico al 0,1 %	90'



Figura 13 – Centrifuga



Figura 14 – Balanza METLER Toledo AX 26

5 7.2 Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR)

Los espectros de infrarrojo se registraron en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada en un espectrofotómetro TERMO NICOLET IR 200 (Figura 15).



Figura 15 - TERMO NICOLET IR 200

La técnica empleada fue la dispersión de la muestra en bromuro potásico. Para ello se molturaron 2 mg de muestra junto con 95 mg de KBr, previamente desecado en estufa a 120 °C, en un mortero de ágata, obteniendo una mezcla homogénea. A continuación se presó a ocho toneladas métricas durante 3 minutos en una prensa SPECAC (Figura 16).

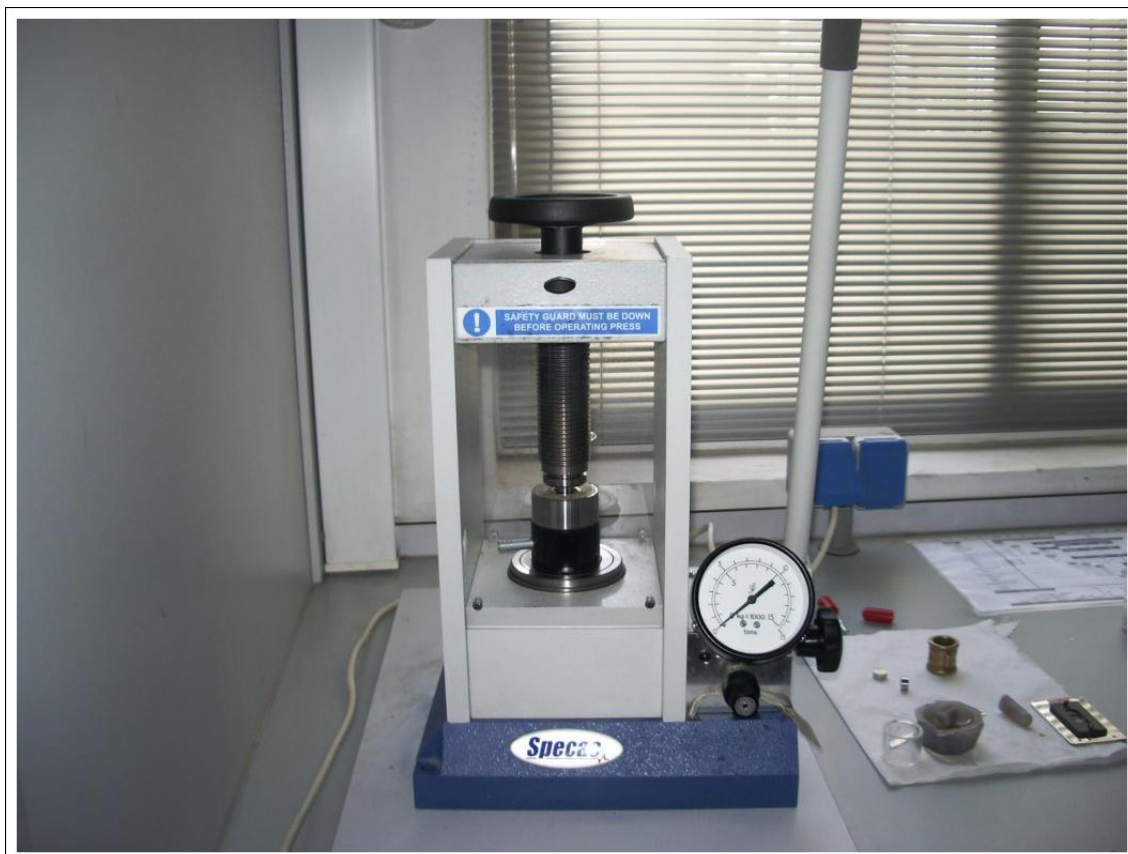


Figura 16 - Prensa SPECAC

5.7.3 Espectroscopia de Infrarrojo - ATR

Los espectros infrarrojos con ATR (Reflectancia Total Atenuada) se registraron en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga en un Espectrofotómetro por Transformada de Fourier EQUINOX 55 (Figura 21). El módulo principal consta de un interferómetro de Michelson, acoplado a una fuente y un sistema DTGS de detección de radiación infrarroja, y un láser de He-Ne como referencia interna. Para el registro de espectros ATR se utilizó un accesorio

Golden Gate Single Reflection Diamond ATR System de Specac (Figura 17). Se registraron en el rango de $550\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.



Figura 17 – Golden Gate Single Reflection Diamond ATR System de Specac

5.7.4 Espectroscopia Raman

Se registraron también los espectros Raman de todas las especies tratadas químicamente con un accesorio Bruker FRA 106/S que permite el registro de

espectros FT-Raman de compuestos sólidos y líquidos (Figura 18). Está acoplado a un detector de Ge, enfriado mediante una columna de nitrógeno líquido, que permite detección a 90 y 180 grados. Dispone de una amplia y fácilmente accesible cámara de muestras, con sistema de posicionamiento remoto (SPR). Utiliza como radiación excitatriz un láser de Nd-YAG que proporciona una línea de 1064 nm (infrarrojo cercano). El rango estudiado fue desde 200 a 2200 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y un promedio de 100 acumulaciones para optimizar la relación señal/ruido.



Figura 18 - Módulo FT-RAMAN, BRUKER FRA 10

5.7.5 Difracción de Rayos X

Los difractogramas de rayos x en polvo de las muestras analizadas se realizaron en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada en un Difractómetro de rayos x en polvo BRUKER D8 ADVANCE con radiación CuK_{α} y filtro con un rango de scanning de 10° a 70° . Equipos de difracción de rayos X (Figuras 19 y 20).



Figura 19 - Equipo de difracción de monocristal con detector de área.(Bruker Smart Apex, Alemania) usado para microanálisis en diferentes puntos del diente

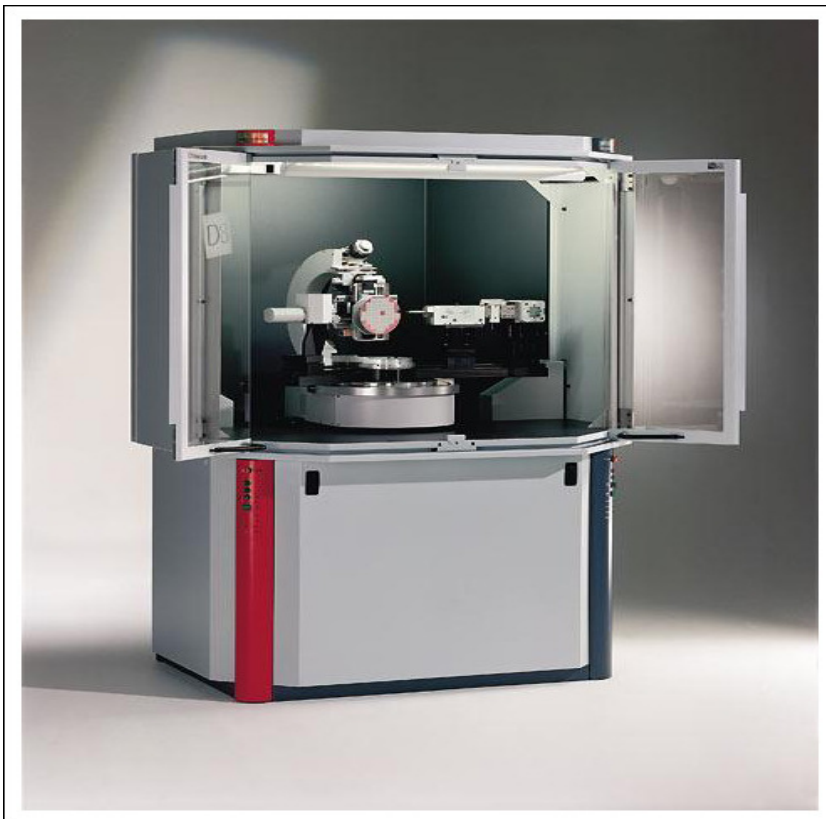


Figura 20- Equipo de difracción de polvo con detector puntual (Bruker D-8 Advanced; Alemania)

5.7.6 Analizador Termogravimétrico

Los diagramas de termogravimetría (TG) se registraron en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada en un equipo Analizador termogravimétrico (TG) SHIMADZU mod. TGA-50H, provisto de un espectrómetro de infrarrojos por transformada de Fourier (IRFT) NICOLET mod. 550. Se realizaron en el rango de 25-950°C. Se registraron en atmósfera dinámica utilizando un caudal de aire puro de 100 ml min⁻¹ y una velocidad de calentamiento de 20 °C.min⁻¹ (Figura 21).



Figura 21 – Termograviméto (TG)

Los diagramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se registraron en Calorímetro diferencial de barrido (DSC) SHIMADZU mod. DSC-50Q de tipo flujo de

calor con una microbalanza de precisión METTLER-TOLEDO AX26 DELTA RANGE. El rango analizado fue de 25-400 °C y se utilizó una velocidad de calentamiento de 10 °C.min⁻¹ (Figura 22).



Figura 22 – Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC)

5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para explorar las relaciones entre el tiempo transcurrido desde el blanqueamiento, la exposición al ácido y la cantidad de calcio extraído, se aplicó el Análisis de la Varianza (ANOVA) de tres vías, seguido de un análisis de la varianza de dos vías y el test de Tukey como contraste post hoc.

Todos los tests se consideraron significativos para un valor de $p < 0.05$.

La totalidad del análisis estadístico del estudio se realizó mediante el programa SPSS 14.0 (SPSS. Inc. Chicago-USA).

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS CON PERÓXIDO DE CARBAMIDA

Los resultados del ANOVA de tres vías (grupo, tiempo de exposición al ácido y muestra) demostraron la existencia de diferencias significativas en la cantidad de calcio extraída entre los grupos experimentales ($F=6,36$, $p<0,001$) y entre los tiempos de exposición al ácido ($F= 60,58$, $p < 0,001$). Ya que la interacción entre ambos fue significativa, se estudió la extracción de calcio en cada grupo de tratamiento en función del tiempo de exposición al ácido, así como la cantidad de calcio extraída en cada periodo de exposición al ácido variaba entre los distintos grupos experimentales.

Los especímenes de esmalte sometidos al blanqueamiento con peróxido de carbamida al 30% pierden más Ca^{2+} cuando se someten al ataque ácido que los dientes no blanqueados en todos los periodos de aplicación del ácido. La cantidad de calcio extraída de los dientes sometidos a blanqueamiento aumenta en función del tiempo, siendo el Ca^{2+} total extraído (120s) mayor en los grupos sometidos a blanqueamiento que en el grupo control no blanqueado (Figura 23).

La mayor cantidad de Ca^{2+} que pasa a la solución ocurre en los primeros 30s incrementándose de forma significativa y constante en cada periodo de 30 segundos.

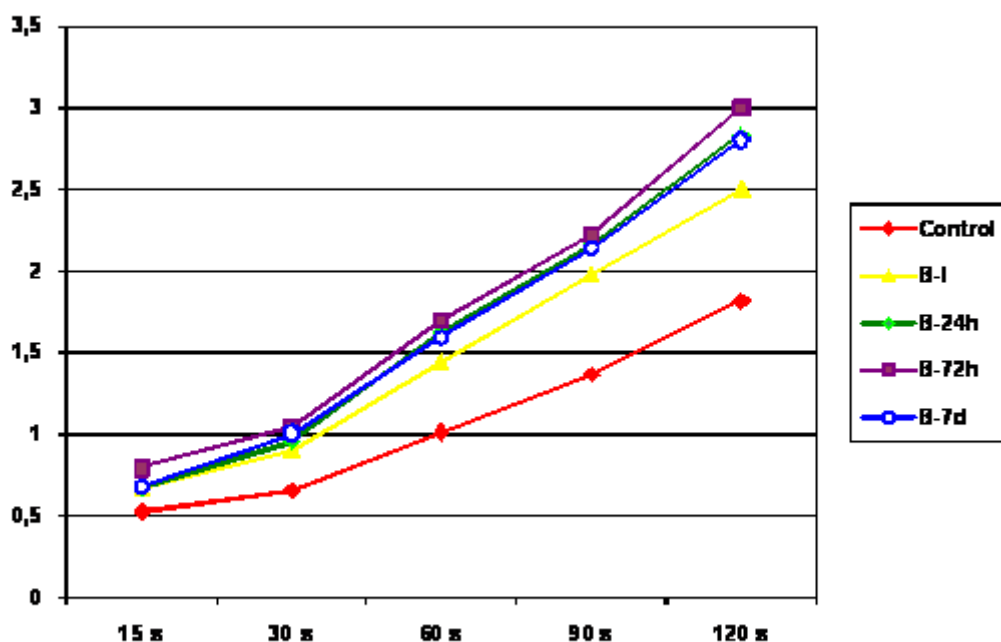


Figura 23 – Ca^{2+} extraído (mg) en cada uno de los grupos experimentales (PC) en función del tiempo de aplicación del ácido.

Si observamos el comportamiento de cada grupo experimental en cuanto a la duración de la exposición al ácido fosfórico al 37%, vemos que la cinética de desmineralización es similar en todos los grupos experimentales sometidos a blanqueamiento y es también parecida a la que se observa en el grupo control. En este grupo, se observan diferencias significativas entre la exposición durante 15 segundos y durante 60 ó más segundos. A partir de ese tiempo se observa un aumento similar en el calcio extraído en cada periodo de tiempo de exposición, como queda reflejado en la comparación por filas de la tabla 7.

Tabla 7 - Relación del tratamiento blanqueador con Peróxido de Carbamida al 30% y del tiempo de exposición al ácido fosfórico al 37% con respecto a los miligramos de calcio extraídos.

Tratamiento blanqueador	Tiempo de exposición al ácido					
	15s	30s	60s	90 s	120s	Total
CONTROL	0,519 (0,309) 1	0,648 (0,359) 1	1,007 (0,506) 2	1,360 (0,598) 3	1,810 (0,751) 4	1,070 (0,697) 1
BL- I	0,659 (0,297) NS / 1	0,898 (0,384) NS / 1	1,443 (0,684) NS / 2	1,977 (0,793) * / 3	2,496 (0,907) NS / 4	1,495 (0,924) 2
BL- 24 h	0,663 (0,365) NS / 1	0,954 (0,425) * / 1	1,620 (0,696) ** / 2	2,166 (0,952) ** / 3	2,825 (1,269) ** / 4	1,646 (1,115) 2
BL- 72 h	0,788 (0,439) ** / 1	1,041 (0,549) ** / 1	1,694 (0,943) ** / 2	2,220 (1,091) ** / 2	2,998 (1,515) *** / 3	1,748 (1,244) 2
BL- 7 days	0,675 (0,303) NS / 1	1,004 (0,484) ** / 1/2	1,586 (0,781) * / 2 y 3	2,138 (1,110) ** / 3	2,799 (1,370) ** / 4	1,640 (1,158) 2
Total	0,661 (0,344) 1	0,909 (0,450) 1	1,470 (0,742) 2	1,973 (0,945) 3	2,586 (1,223) 4	

En cada Fila, números (diferencias entre tiempos para cada grupo)

En cada columna, diferencias entre el control y los demás grupos, en relación al calcio extraído (NS, no significativo; * $P < 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$)

El tiempo transcurrido desde el blanqueamiento dental con peróxido de carbamida influye en la movilización de calcio por el ácido fosfórico al 37%.

Si analizamos el tiempo de exposición al ácido necesario para observar diferencias significativas en la cantidad de calcio extraído en los grupos experimentales sometidos a blanqueamiento respecto al grupo control, observamos

que en el grupo grabado inmediatamente después del blanqueamiento, dichas diferencias se manifiestan tras 90s de inmersión en ácido. Cuando el tiempo de demora entre el blanqueamiento y la exposición al ácido es de 24 horas, sólo son necesarios 30s de exposición al ácido para observar diferencias significativas en la cantidad de calcio extraído respecto a la obtenida en el grupo control y cuando el periodo de demora entre el blanqueamiento y la aplicación del ácido es de 72h, bastan 15s de exposición para obtener dichas diferencias. Podemos decir, por lo tanto, que al aumentar el tiempo de demora (hasta las 72 h) desde la aplicación del agente blanqueador se necesita menos tiempo para que el ácido fosfórico extraiga una cantidad de Ca^{2+} significativamente mayor que en el grupo control y que estos efectos se prolongan, al menos, una semana tras el blanqueamiento, momento en el la cantidad de Ca^{2+} extraída en especímenes blanqueados es significativamente superior a la del grupo control tras 30s de exposición al ácido fosfórico (Tabla 7).

6.2 RESULTADOS CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El ANOVA de tres vías demostró que el tiempo de demora entre el blanqueamiento y la aplicación del ácido, como la duración del contacto con el mismo, influyen significativamente en la cantidad total de Ca^{2+} extraído ($F= 6,054$; $p<0,001$) cuando se aplica peróxido de carbamida al 30% como agente blanqueador. Del mismo modo existen diferencias significativas entre el Ca^{2+} obtenido en los

distintos tiempos de aplicación del ácido ($F=180,831$; $p<0,001$), aunque la interacción entre ambos no es significativa ($0,341$; $p >0.10$).

En el conjunto de la muestra, los grupos experimentales sometidos al blanqueamiento, Obtienen un promedio de Ca^{2+} extraído significativamente mayor a la obtenida en el grupo control. Hemos encontrado diferencias significativas con respecto al grupo control en los grupos de blanqueamiento inmediato ($p<0,05$), así como también en el grupo en que los especímenes fueron blanqueados y después de 24h fueron inmersos en ácido fosfórico al 37% ($p<0,05$). Sin embargo, estas diferencias desaparecieron en los grupos con intervalos de 72h y una semana desde que se realizó el blanqueamiento (Tabla 8).

Al analizar la cinética de la descalcificación en cada uno de los grupos experimentales por separado, observamos que la extracción de Ca^{2+} es progresiva y aumenta significativamente en cada periodo de 30 segundos. Sin embargo, no se obtienen diferencias significativas en el tiempo necesario para que el ácido fosfórico induzca la descalcificación del esmalte entre los grupos experimentales blanqueados con peróxido de hidrógeno al 30% con respecto al grupo control (Figura 24).

Se puede observar en la tabla 6 que la pérdida de Ca^{2+} en el grupo experimental a la semana después del blanqueamiento, presenta valores más bajos, aunque no son estadísticamente significativos. En la figura 14 se observa el Ca^{2+} extraído en cada uno de los grupos experimentales en función del tiempo de aplicación del ácido fosfórico. Los grupos donde los especímenes se sumergieron en

ácido fosfórico, inmediatamente o a las 24h después del tratamiento con peróxido de hidrógeno, fueron donde mayor cantidad de calcio se extrajo.

Tabla 8 - Relación del tratamiento blanqueador con Peróxido de Hidrógeno al 30% y del tiempo de exposición con ácido fosfórico al 37% con respecto a los miligramos de calcio extraídos.

Tratamiento blanqueador	Tiempo de exposición al ácido					
	15s	30s	60s	90s	120s	Total
CONTROL	0,614 (0,282) 1	0,952 (0,287) 2	1,601 (0,456) 3	2,253 (0,569) 4	2,763 (0,712) 5	1,636 (0,932) A/B
BL- I	0,749 (0,388) 1	1,089 (0,351) 1	1,846 (0,740) 2	2,534 (0,953) 3	3,132 (1,101) 4	1,870 (1,740) C
BL- 24 h	0,731 (0,442) 1	1,151 (0,628) 2	1,880 (0,803) 3	2,579 (0,995) 4	3,198 (1,170) 5	1,909 (1,227) C
BL- 72 h	0,665 (0,238) 1	0,997 (0,275) 1	1,889 (0,764) 2	2,729 (1,297) 3	2,964 (0,810) 4	1,849 (1,191) B
BL- 7 days	0,579 (0,167) 1	0,875 (0,238) 2	1,520 (0,353) 3	2,144 (0,446) 4	2,694 (0,592) 5	1,562 (0,874) A
Total	0,668 (0,317) 1	1,013 (0,422) 2	1,749 (0,651) 3	2,448 (0,907) 4	2,950 (0,902) 5	

Diferentes cifras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de grabado en cada grupo experimental en el grupo de B-I ($p < 0,05$) y en el grupo B-24h ($p < 0,05$).

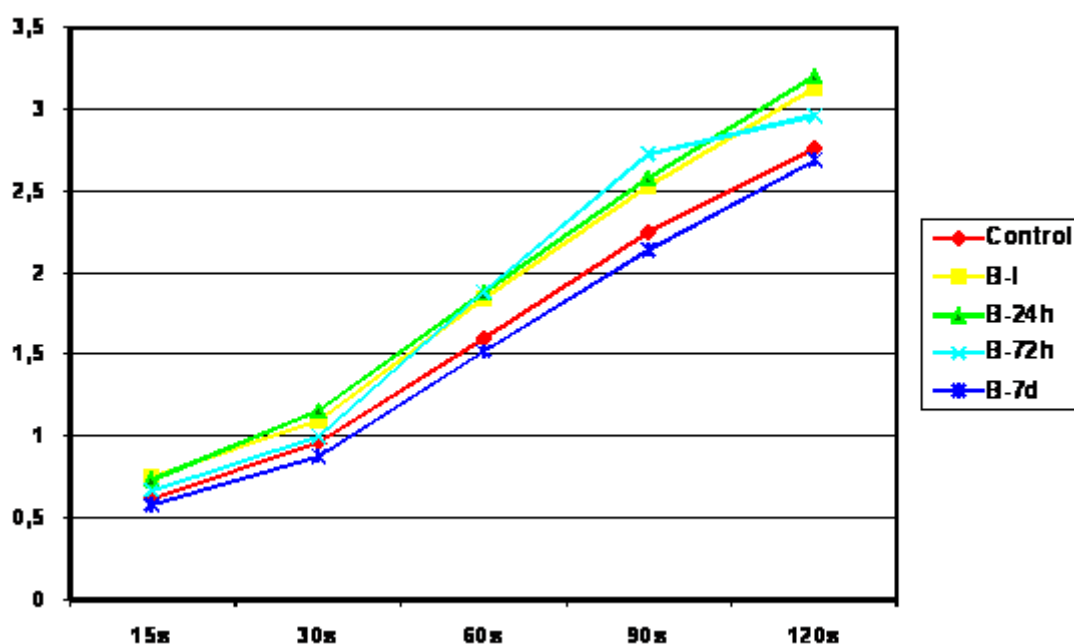


Figura 24 – Ca^{2+} extraído (mg) en cada uno de los grupos experimentales (PH) en función del tiempo de aplicación del ácido.

6.3. COMPARACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE CALCIO ENTRE LOS DOS MATERIALES BLANQUEADORES: PERÓXIDO DE CARBAMIDA Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

En este análisis se han considerado solamente los especímenes sometidos a blanqueamiento, es decir 40 especímenes blanqueados con peróxido de carbamida por cada grupo del estudio y 60 especímenes blanqueados con peróxido de hidrógeno por cada uno de los blanqueadores del estudio.

Se ha comprobado que la cantidad promedio de Ca^{2+} extraída por el ácido fosfórico al aplicar el peróxido de hidrógeno es sólo ligeramente superior a la

extraída por el mismo procedimiento cuando se ha aplicado previamente peróxido de carbamida (Tabla 9).

Tabla 9 – Cantidad promedio de Ca^{2+} calcio extraído por el ácido fosfórico después de la aplicación de PC y PH.

<i>Material</i>	<i>n</i>	<i>Media (dt)</i>	<i>comparación</i>	
			<i>t</i>	<i>Significación</i>
<i>PC</i>	200	1,632 (1,112)	1,615	0,107
<i>PH</i>	300	1,798 (1,128)		

Para conocer si el tiempo de inmersión en ácido fosfórico influye de forma diferente en los especímenes sometidos a blanqueamiento con cada uno de los agentes del estudio, se han comparado las cantidades promedio de Ca^{2+} extraído en cada tiempo de grabado, con independencia del periodo de demora transcurrido desde el blanqueamiento.

En la figura 25 se puede apreciar la evolución de la extracción de Ca^{2+} en los dos materiales blanqueadores en función del tiempo. La tabla 8 resume los resultados de esta comparación. Aunque, a partir de los 30s de grabado ácido la cantidad promedio de Ca^{2+} extraída por el PH fue mayor que la obtenida a partir de las muestras en las que se aplicó PC, puede afirmarse que la susceptibilidad al ácido es similar en los especímenes blanqueados con PH o con PC, ya que las diferencias entre ambos agentes no son significativas en ninguno de los tiempos de exposición ácida. La mayor diferencia entre ambos grupos de tratamiento (PC y PH)

se observa tras 90s de aplicación de ácido fosfórico al 37%, aunque sin alcanzar la significación estadística ($p < 0.10$).

Tabla 10 – Comparación de los valores promedio de Ca^{2+} extraído en los especímenes blanqueados con PC o PH, en función del tiempo de exposición al ácido fosfórico.

<i>T</i>	<i>n</i>		<i>Media (dt)</i>		<i>Comparación</i>	
	<i>n PC</i>	<i>n PH</i>	<i>PC</i>	<i>PH</i>	<i>t</i>	<i>Significac ión</i>
15s	40	60	0,697(0,346)	0,758(0.363)	0,227	0,821
30s	40	60	0,974(0,450)	1,028(0.450)	0,585	0,560
60s	40	60	1,586(0,750)	1,786(0.689)	1,369	0,174
90s	40	60	2,125(0,960)	2,497(0.971)	1,882	0,063
120s	40	60	2,780(1,248)	2,997(1,128)	0,991	0,324

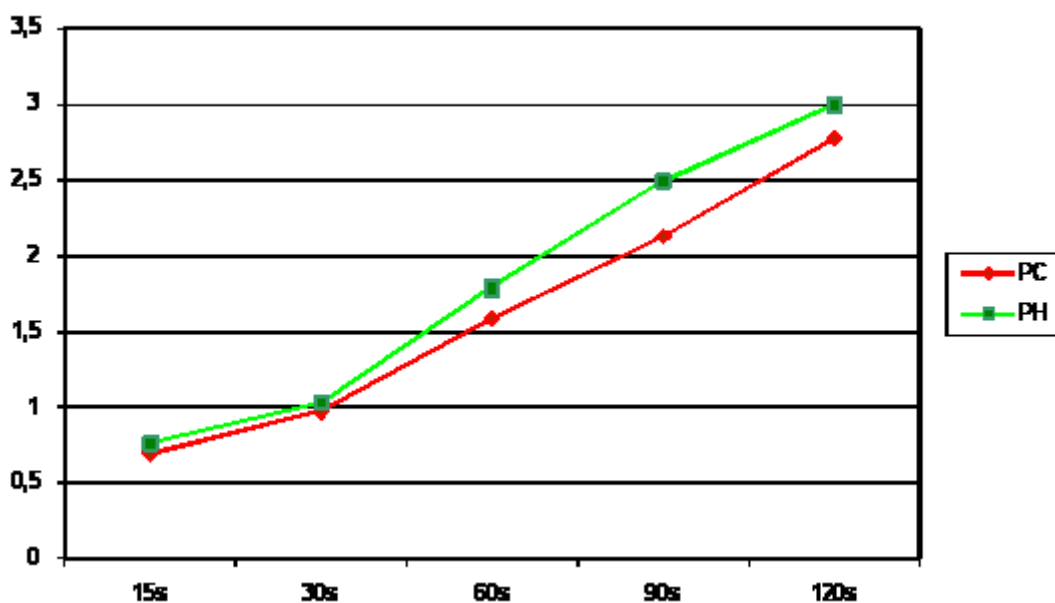


Figura 25 – Representación de los valores promedio de Ca^{2+} extraídos en los especímenes blanqueados con PC o PH, para cada tiempo de exposición al ácido

Tampoco se obtienen cantidades promedio de Ca^{2+} significativamente diferentes entre ambos agentes blanqueadores en cada uno de los periodos de demora considerados en el estudio. En la tabla 9 se han recogido los resultados de comparar, mediante el test t de Student, las cantidades de Ca^{2+} antes mencionadas, así como las extraídas en cada periodo de demora para cada uno de los tiempos de exposición al ácido.

Como puede verse en las figuras 28 y 29, el peróxido de hidrógeno induce respuestas de descalcificación más intensas en los grupos expuestos al ácido inmediatamente (Figura 26) y 24 horas tras el blanqueamiento (Figura 27). Sin embargo, las cantidades de Ca^{2+} extraídas no demuestran diferencias estadísticamente significativas. Además, los perfiles de descalcificación en función del tiempo se van haciendo similares y prácticamente se superponen transcurrida una semana desde el tratamiento blanqueador (Figuras 28 y 29)

Tabla 11 - Comparación entre la cantidad de CA extraído en cada periodo de tiempo de exposición al ácido para cada uno de los grupos de blanqueamiento.

Tratamiento Blanqueador		Tiempo de exposición al ácido					
		15s	30s	60s	90 s	120s	Total
BL- I	t	0,617	0,978	1,398	1,527	1,513	1,901
	Sign.	NS	NS	NS	NS	NS	NS*
BL- 24 h	t	0,399	0,864	0,859	1,035	0,755	1,220
	Sign.	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BL- 72 h	t	0,907	0,269	0,570	1,022	0,072	0,455
	Sign.	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BL- 7d	t	1,021	0,888	0,291	0,021	0,266	0,429
	Sign.	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS * (P < 0.10)

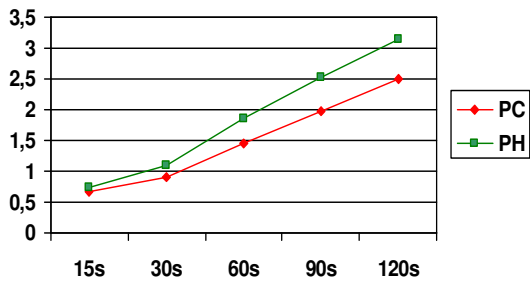


Figura 26 - BL - I

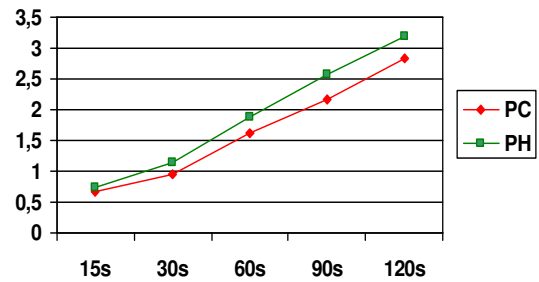


Figura 27 - BL - 24h

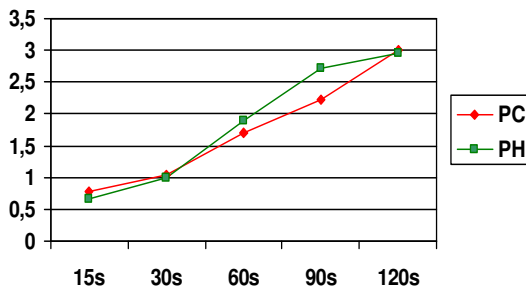


Figura 28 - BL - 72h

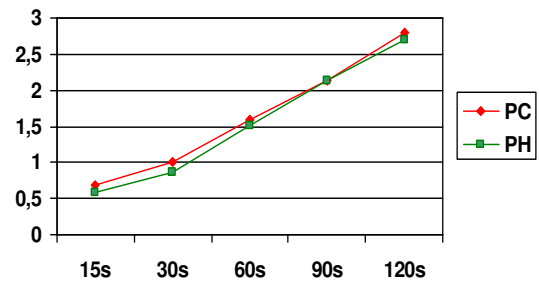


Figura 29- BL - 7d

Figuras 26, 27, 28 y 29 - Perfiles de descalcificación del peróxido de carbamida y peróxido de hidrógeno en función del tiempo en cada grupo experimentales.

6.4 RESULTADOS DEL ESTUDIO EN FASE SÓLIDA

El tratamiento con ácido fosfórico del esmalte finamente pulverizado da lugar a una pérdida de peso aproximadamente de un 15% de la muestra original, siendo dicha pérdida similar cuando se trata la muestra sólo con agua oxigenada.

La mayor pérdida de peso se produce en el tratamiento con peróxido de hidrógeno seguido de ácido fosfórico (aproximadamente se pierde un 25%).

Se ha observado que un incremento en el tiempo de tratamiento con ácido fosfórico no aumenta significativamente la pérdida de peso, por lo que cabe suponer que la mayor pérdida de peso se produce en los primeros minutos de la reacción con ácido; hecho ya constatado en trabajos previos donde la mayor eliminación de calcio se produce en los primeros minutos de tratamiento ácido.

6.4.1 Análisis de los Espectros de Infrarrojo

Los espectros de IR se registraron en el rango de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ a 2 cm^{-1} de resolución y 256 scans. A todos los espectros se le corrigió la línea base y restó el fondo, que fundamentalmente correspondía a dióxido de carbono (CO_2) y Agua (H_2O) como se muestra en la Figura 30.

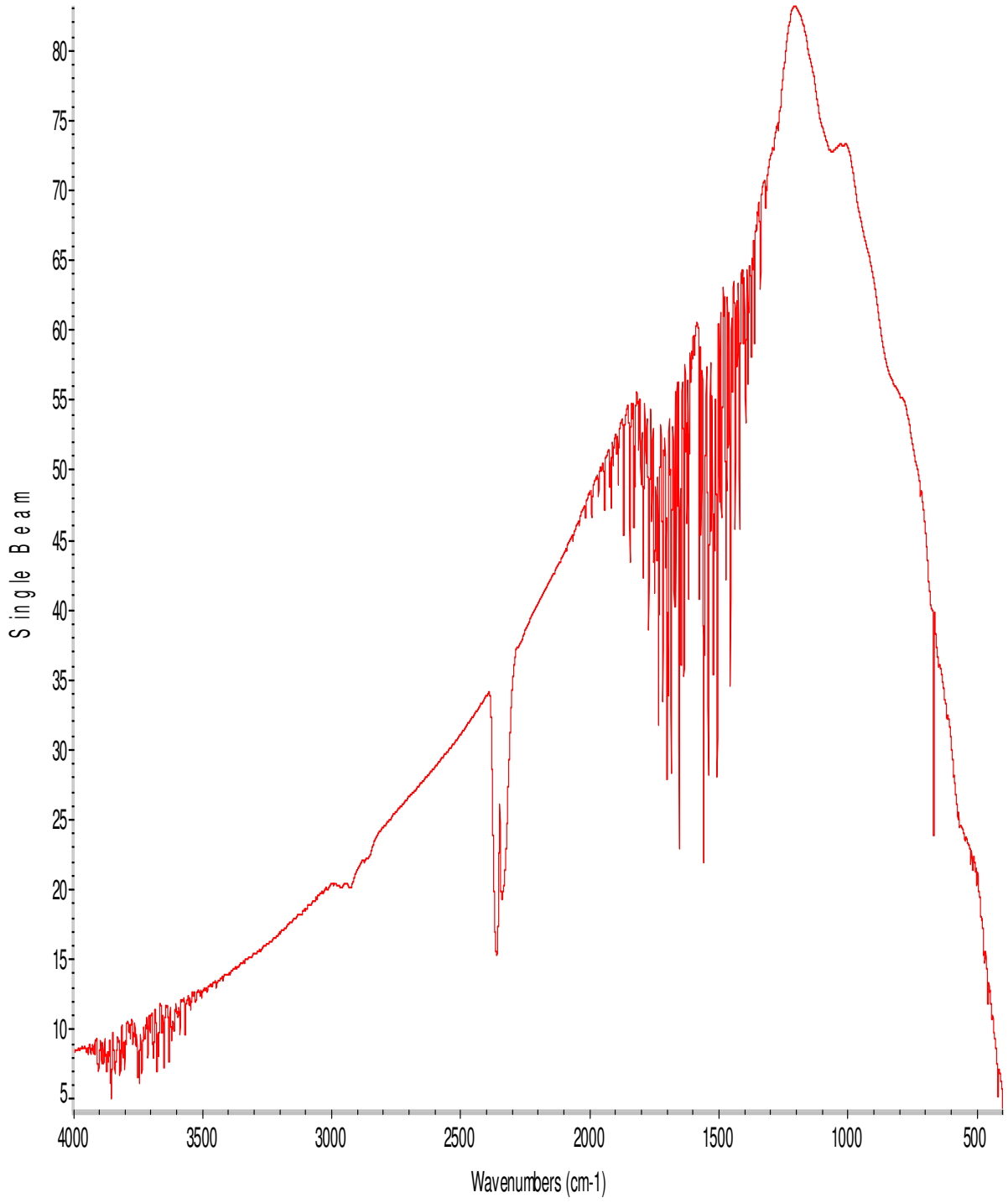


Figura 30 - Espectro IR correspondiente al fondo (CO_2 y H_2O)

El espectro de la muestra de esmalte sin tratamiento se recoge en la figura 31.

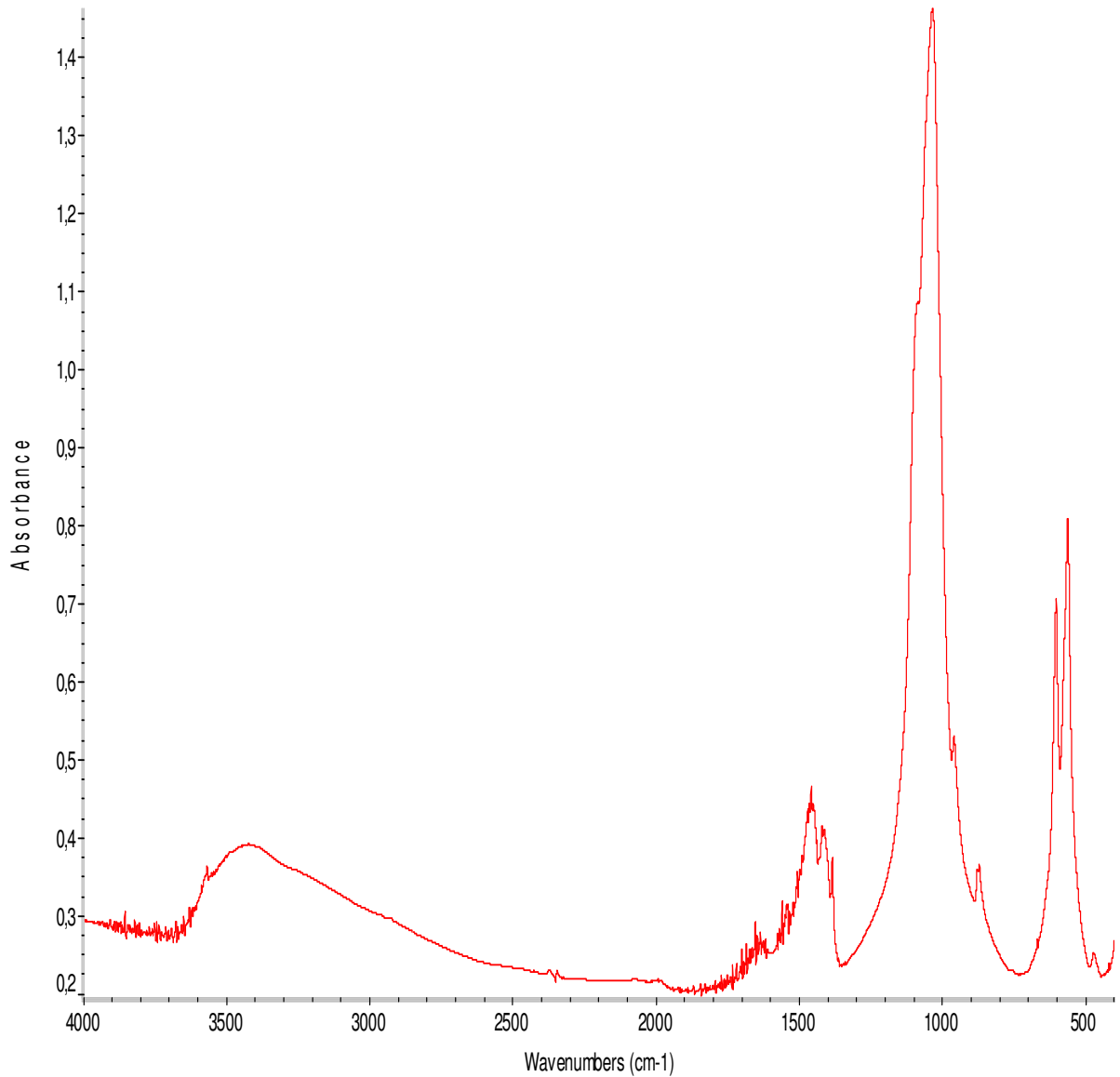


Figura 31- Espectro infrarrojo de la muestra control de esmalte (F-2)

En el espectro de infrarrojo del esmalte sin tratamiento químico (control F-2) se observan diferentes bandas que pueden ser asignadas a los distintos grupos funcionales componentes del esmalte, fundamentalmente hidroxiapatito. Dichas

asignaciones se muestran en la tabla 12, las cuales están en buen acuerdo con las encontradas en la bibliografía^{112, 113, 114.}

En los espectros de IR de las muestras sometidas a los diferentes tratamientos (Figura 32) aparecen las mismas bandas con ligerísimas variaciones, las cuales sólo han podido ser cuantificadas mediante un programa de deconvolución (PeakFit v.11; Systat) que analiza al detalle los espectros IR y cuantifica el área de los diferentes componentes moleculares.

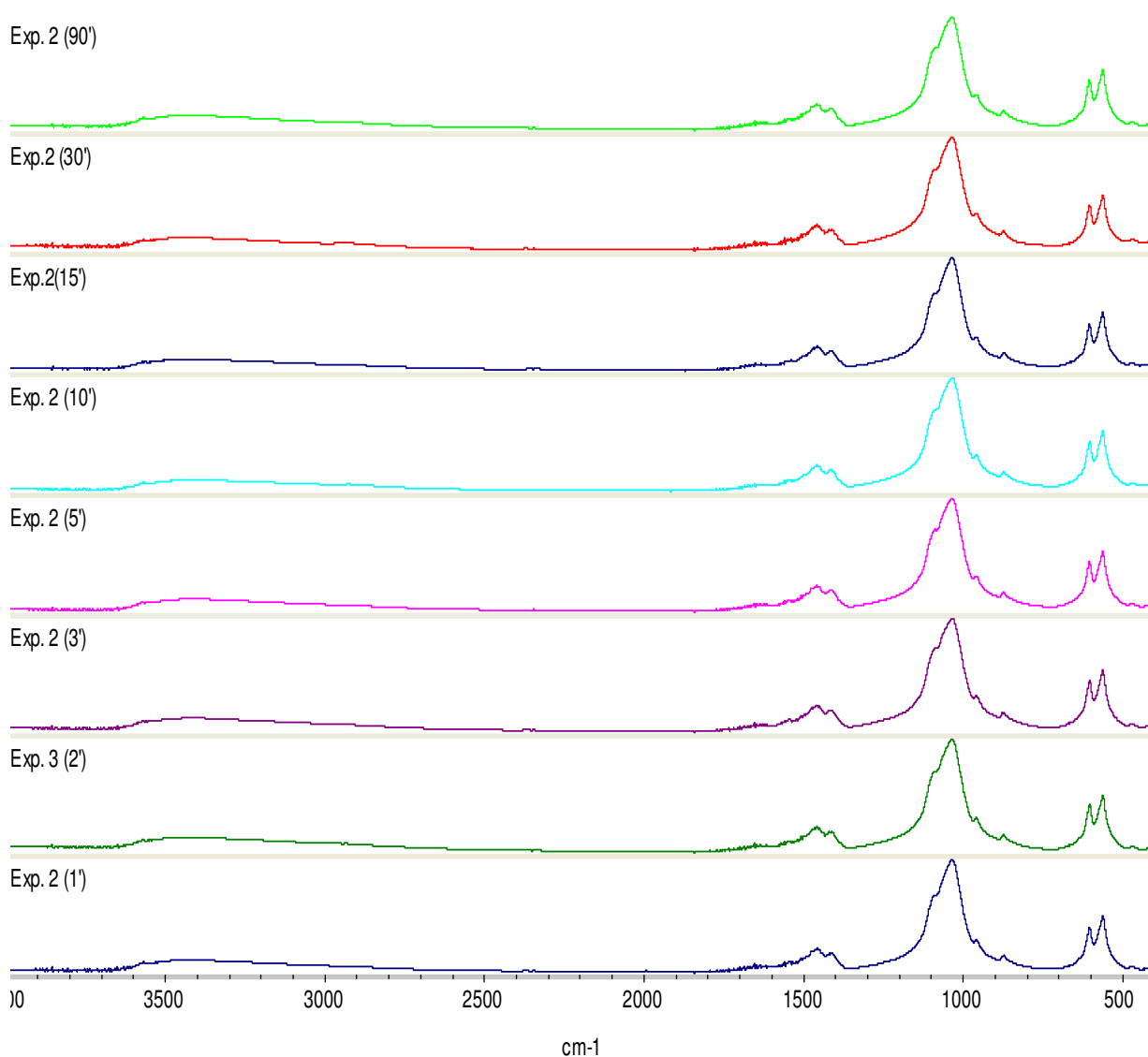


Figura 32 - Espectros infrarrojos de esmalte tratados con ácido fosfórico a 1, 2, 3, 5, 10, 15, 30 y 90 minutos.

Los espectros IR de la muestra tratada con peróxido de hidrógeno y de la muestra tratada posteriormente en ácido fosfórico tampoco presentaron variaciones importantes con los anteriores. (Figura 35).

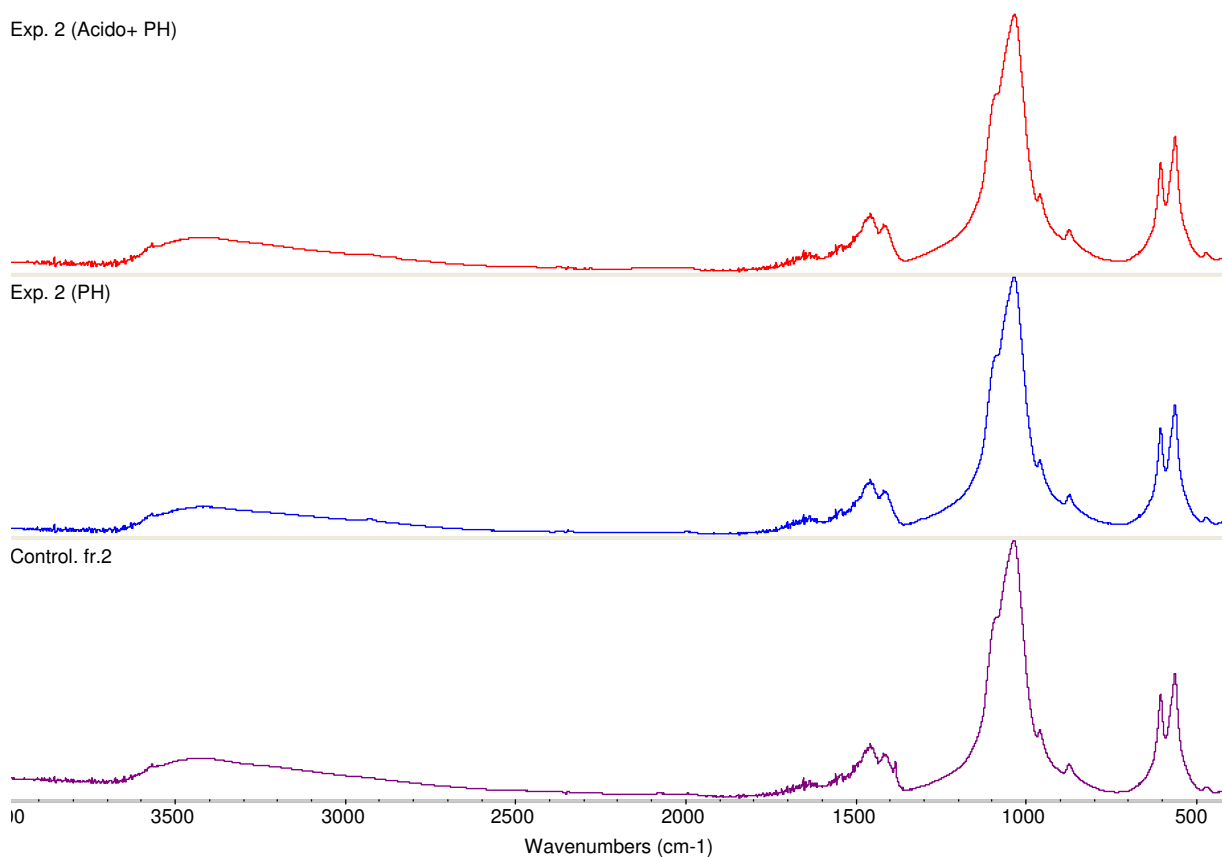


Figura 33 - Espectros de Infrarrojo del control y muestra tratada con peróxido (Exp 2PH) y peróxido más ácido fosfórico (Exp 2 ácido+PH).

Grado de Mineralización y Composición del Tejido Mineralizado a Nivel Molecular

La determinación del contenido en mineral y materia orgánica de los dientes se realizó, como se ha indicado anteriormente, con la técnica de espectrometría de infrarrojos (FTIR). De los espectros de infrarrojos se puede medir el porcentaje de

fosfato, carbonato, lípidos y proteínas a partir de los picos de absorción de los grupos moleculares característicos de estas especies (ver figura 34). Estas técnicas espectrométricas dan una información muy completa de los tejidos mineralizados. Adicionalmente, debido al tamaño nanométrico de los cristales en algunos tejidos mineralizados (huesos, dientes), los espectros de infrarrojos son mucho más informativos sobre la composición del mineral y su cristalinidad que los patrones de difracción de rayos X.

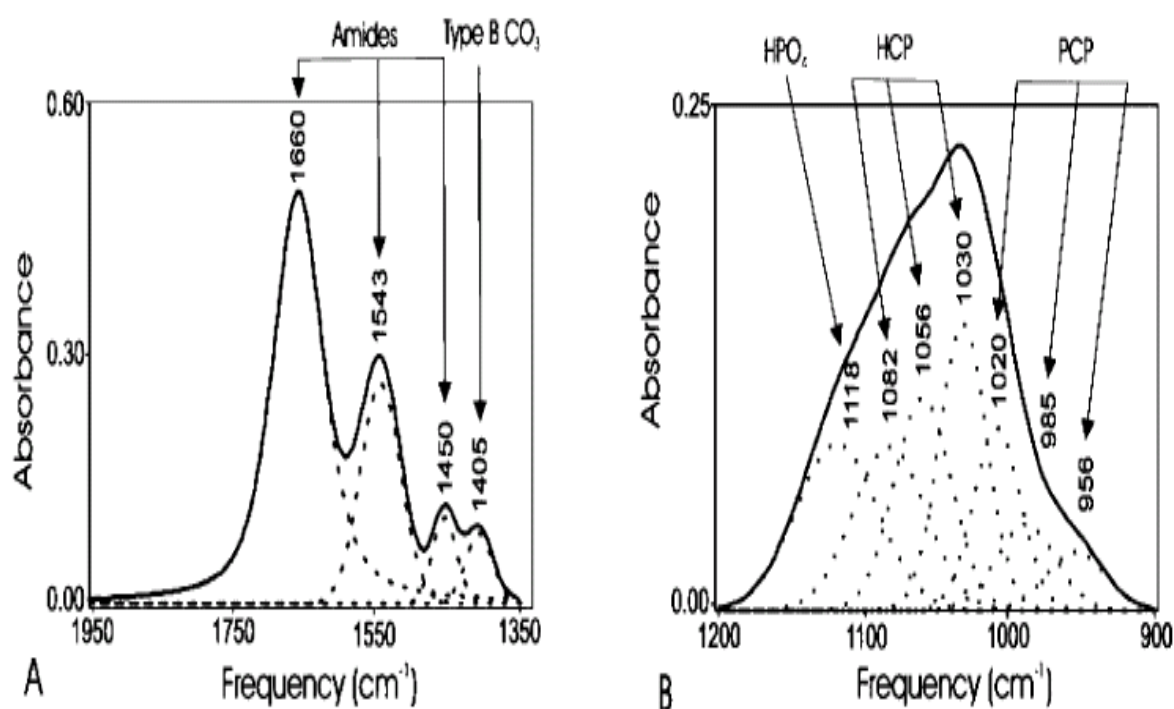


Figura 34 - Espectro de infrarrojos de un hueso donde aparecen los picos de las bandas principales de la parte orgánica y de la parte mineral. (A) La región de 1950-1350 cm^{-1} contiene tres picos asociados a los grupos amida del colágeno del hueso y un cuarto pico asociado a los grupos carbonatos. (B) La banda de 1200-900 cm^{-1} , se compone de siete picos asociados a grupos fosfatos con diferente entorno molecular. Los picos HCP están asociados a apatito altamente cristalino y los PCP a apatito pobremente cristalino. Los picos se pueden resolver usando programas informáticos de deconvolución como PeakFit.

Adicionalmente, a partir de las razones entre áreas de los picos que aparecen en las bandas se pueden determinar una serie de parámetros composicionales que

definen el grado de mineralización, madurez y cristalinidad del tejido óseo ¹¹⁵. Por ejemplo, el grado de mineralización del hueso se puede definir como la razón entre el contenido en mineral y matriz orgánica del hueso estimados como: **%mineral** = $A_{1200-900} / A_{1660}$. Donde $A_{1200-900}$ representa el área de la banda principal de los grupos fosfatos, en esos intervalos de número de ondas (componente principal de la parte mineral) y A_{1660} la banda principal de los grupos amida I (banda principal de la parte orgánica).

Asimismo, se pueden definir otros parámetros como por ejemplo, el **grado de madurez del hueso** (porcentaje de fosfato ácido; mayor en huesos inmaduros) y la **cristalinidad** (razón entre apatito altamente cristalino y pobremente cristalino; tanto mayor cuanto mayor es el tamaño de los cristales y la madurez del mineral). Para ello, como se ha indicado, se utiliza un programa de deconvolución (PeakFit v4.11; Systat).

A partir de estos espectros se cuantificó la composición de muestras de diente en polvo sometidos a diferentes tratamientos. En la figura 35 se muestra el efecto del tratamiento con ácido fosfórico diluido sobre el grado de mineralización a diferentes tiempos.

Se observa un decrecimiento gradual del grado de mineralización con el tiempo, siendo especialmente significativo los primeros 5 minutos de tratamiento.

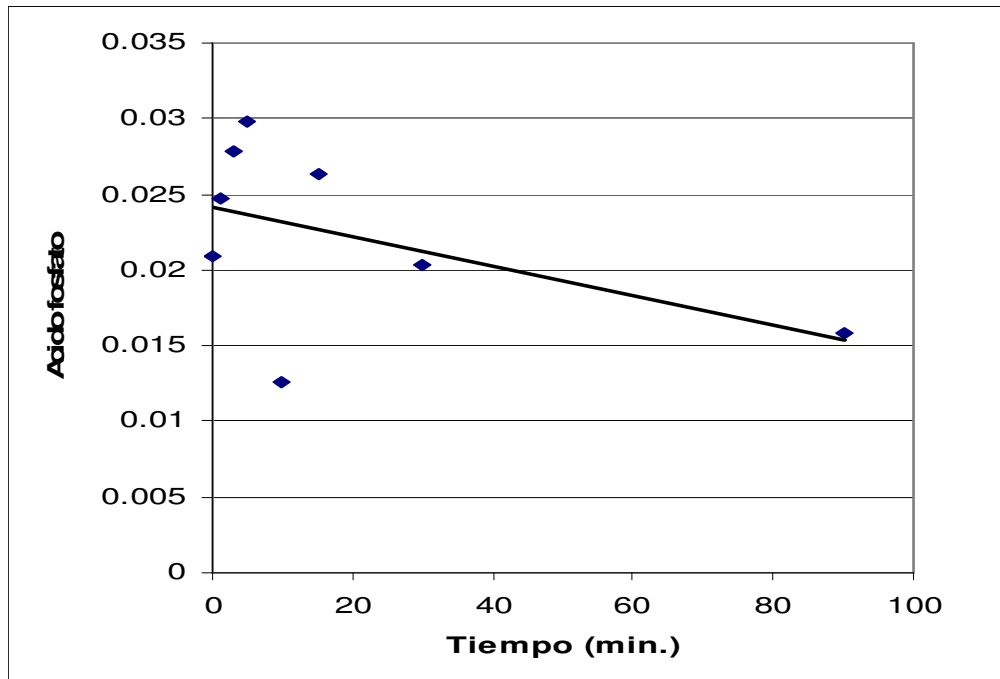
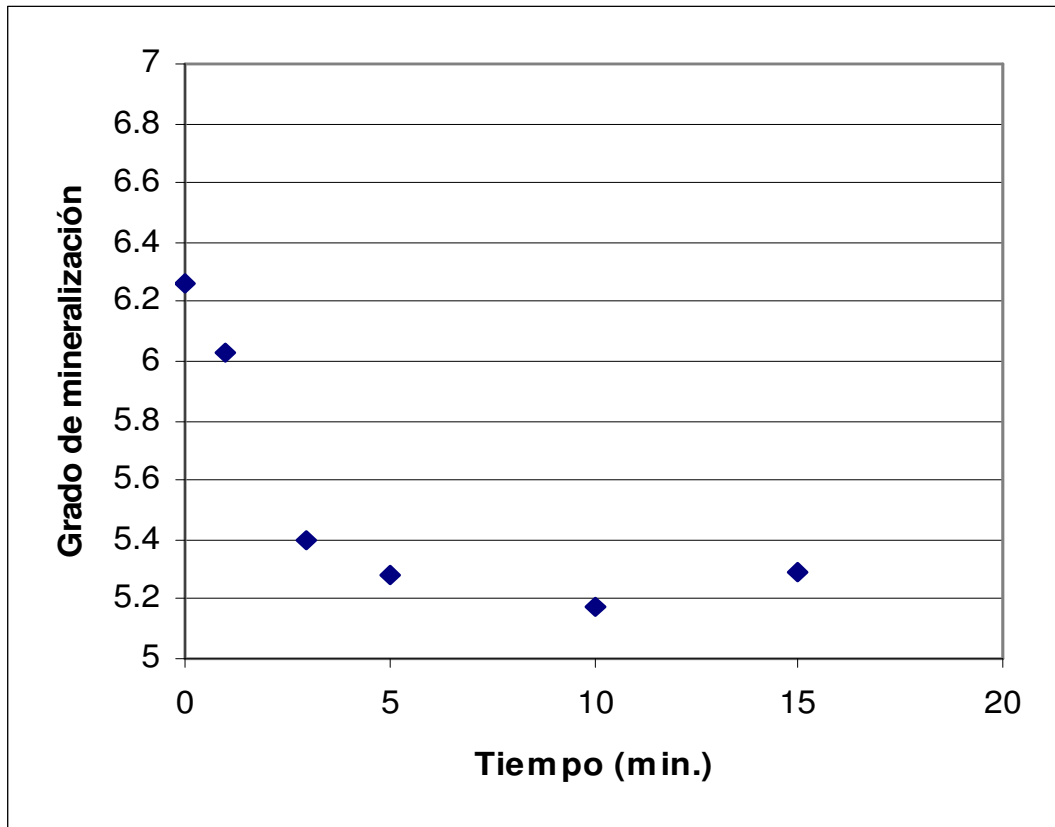


Figura 35 - Efecto del tratamiento con ácido fosfórico diluido sobre el grado de mineralización a diferentes tiempos.

6.4.2. Análisis de los Espectros de IR por ATR

El espectro de ATR de la muestra control se representa en la figura 36. No se observaron cambios significativos con el resto de los espectros de las muestras tratadas al igual que ocurría con los espectros IR anteriormente comentados. Sí se observa, como era de esperar por las características de la técnica, un ligero desplazamiento de las bandas hacia menor número de ondas (ver tabla 12). Si bien esta técnica tiene la ventaja de que permite utilizar la muestra sin dispersantes pudiendo, además, analizarla superficialmente y recuperarla.

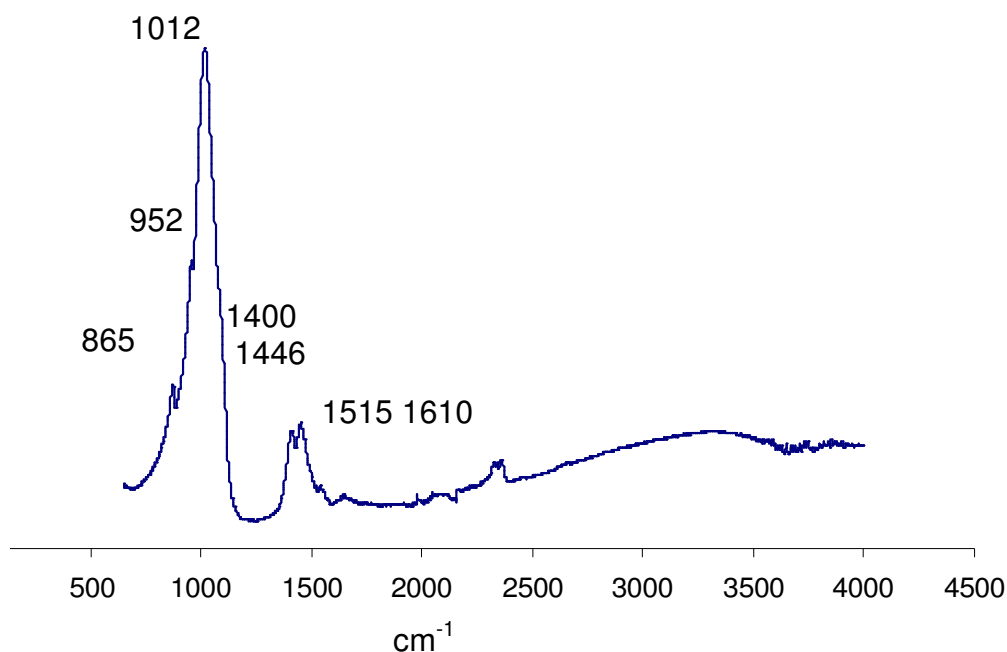


Figura 36 - Espectro de ATR de la muestra control de esmalte donde se indica las energías de los grupos funcionales del esmalte

Tabla 12 - Asignaciones de las bandas de FTIR de esmalte

POSICIÓN DE LA BANDA (cm^{-1})	ASIGNACIÓN
3500-2900	ν (OH ⁻)
1654	δ (OH ⁻), amida I
1560	Amida II
1458-1420	ν (CO ₃ ²⁻)
1280-1380	Amida III
1097, 1035	ν_3 (PO ₄ ³⁻)
960	ν_1 (PO ₄ ³⁻)
605, 563	ν_4 (PO ₄ ³⁻)
470	ν_2 (PO ₄ ³⁻)

6.4.3. Análisis de los Espectros Raman

Las asignaciones realizadas para los grupos funcionales de la muestra patrón mediante espectroscopía Raman (Figura 37) están en buen acuerdo con las encontradas en bibliografía^{60, 116}. Por otro lado, hay que indicar que no se observan variaciones en las mismas para el resto de las muestras después de los tratamientos químicos a los que fueron sometidas.

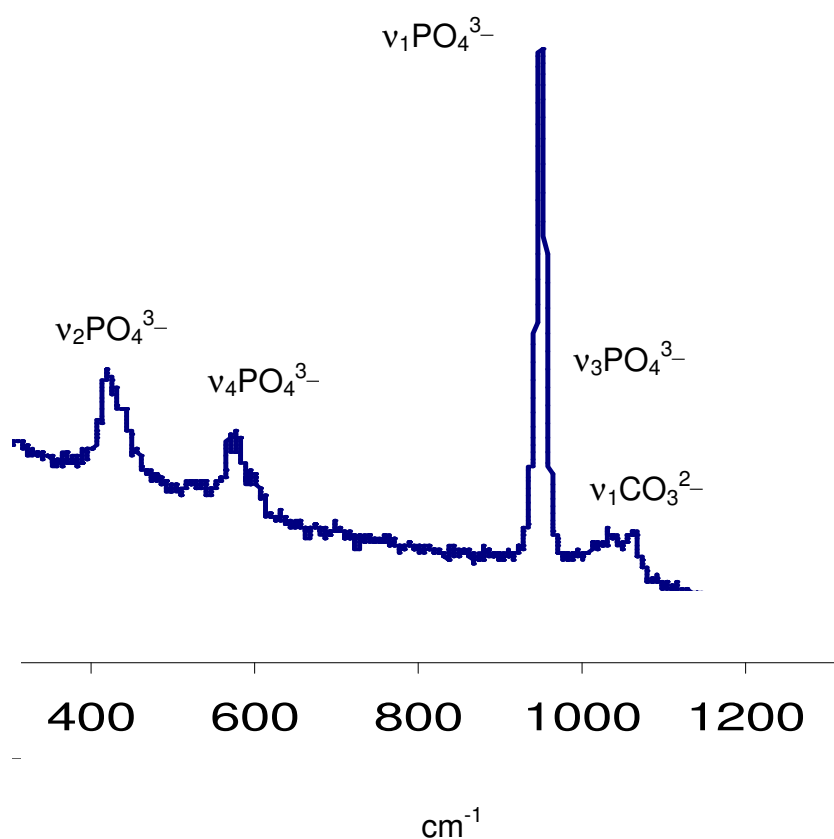


Figura 37 - Espectro Raman de la muestra control de esmalte (F-2)

6.4.4 Difracción de Rayos X

En la figura 38 (A y B) se encuentra el difractograma en polvo por difracción de RX de la muestra control F-2 (A) y su comparación con el patrón de hidroxiapatito cálcico. Como se puede observar hay una concordancia entre los picos de la muestra y el patrón. Lo mismo ocurre con el resto de muestras sometidas a tratamiento ácido.

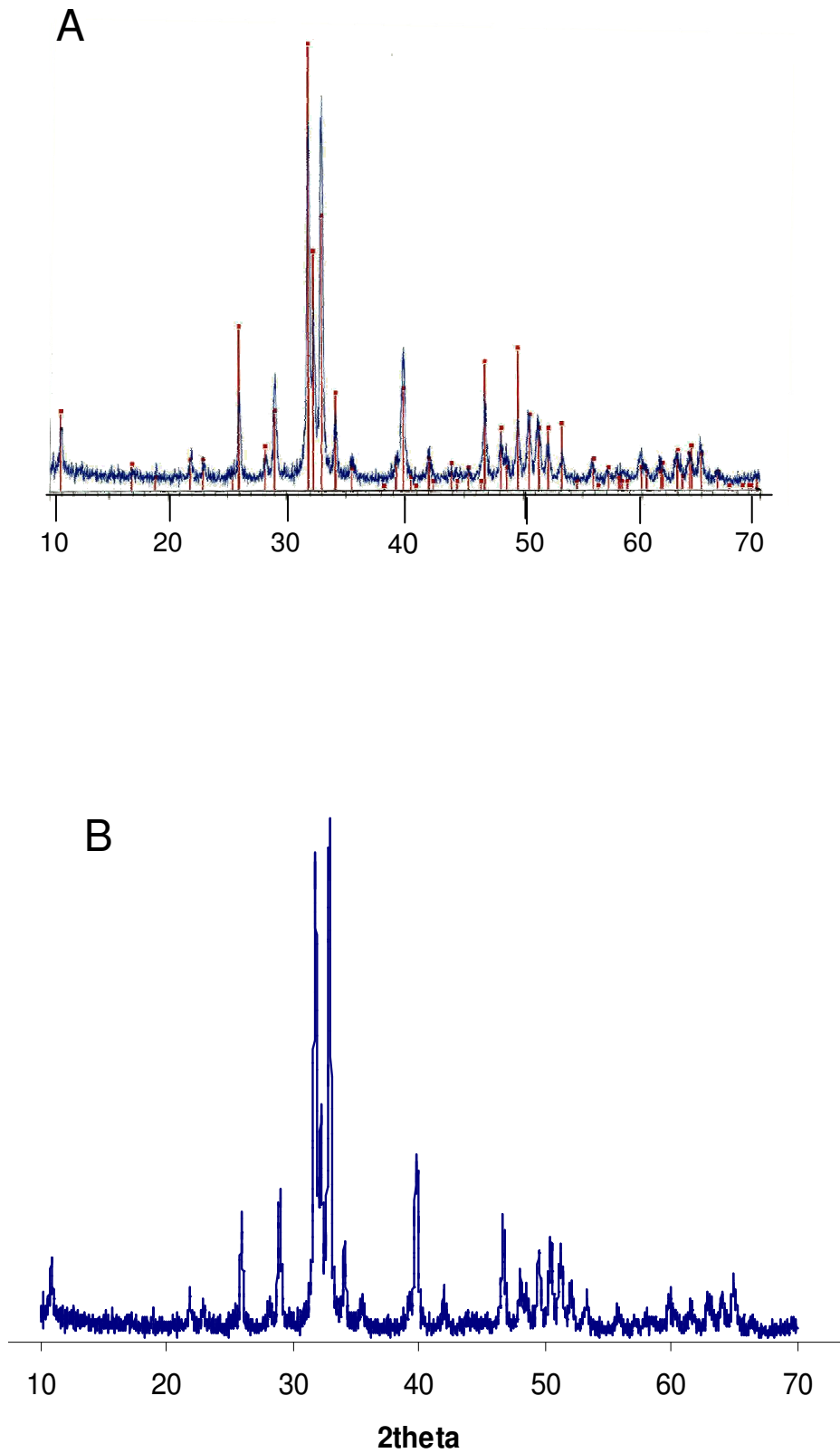


Figura 38 - Difractograma en polvo de rayos X: A) Muestra tratada con ácido 90 minutos; en rojo patrón de hidroxiapatito cálcico. B) Muestra control

Los estudios por difracción de RX no revelaron ningún cambio significativo ni en la composición mineralógica de la muestra ni en su grado de cristalinidad. En todos los casos la única fase que aparece es hidroxiapatito (fosfato cálcico). Las reflexiones que aparecen presentan un gran acuerdo con la posiciones de las reflexiones del patrón de referencia de la base de datos PDF (Powder Diffraction File™ by the International Centre for Diffraction Data (ICDD®) <http://www.icdd.com/>) para ésta fase mineral).

Mineralogía y Microestructura (tamaño y orientación de los cristales) de las Muestras:

Mediante difracción de rayos X de muestras en polvo (Bruker, D-8, Powder diffractometer) se determinó la composición mineralógica y cristalinidad de las muestras de diente ¹¹⁷ Asimismo, para una caracterización más completa del material se utilizó un difractómetro de cristal único (SC-XRD; Smart APEX, Bruker) equipado con un detector bidimensional. Este equipo utiliza un haz de rayos X de muy pequeño tamaño (0.5 mm) que permite hacer análisis en puntos seleccionados de la muestra intacta, utilizando como radiación MoKa. A partir de los patrones de difracción registrados y utilizando un programa informático especializado, XRD2DScan ¹¹⁸ se determinó la composición mineralógica y adicionalmente parámetros que definen la microestructura del material analizado (cristalinidad, tamaño y orientación de los cristales).

Se tomó un corte longitudinal de un incisivo bovino y se realizaron una serie de análisis puntuales mediante difracción de rayos X para determinar la evolución de

la orientación de los cristales de hidroxiapatito en el esmalte. Para ello se utilizó un difractómetro con detector de área (Bruker Smart Apex, Alemania) que permite hacer microanálisis en diferentes puntos del diente. Del estudio realizado se puede concluir que existe una orientación preferencial de los cristales de apatito que se disponen con el eje c del apatito perpendicular a la superficie del esmalte registrado.

A partir de este patrón 2D se calculó el diagrama de polvo equivalente que se muestra en la figura 39 (derecha) que muestra picos muy bien definidos y que indican que el esmalte tiene una alta cristalinidad (comparado con la dentina de más baja cristalinidad y que produce picos más anchos). Asimismo, se muestra el patrón de apatito (fosfato cálcico) superpuesto (en rojo) y con el que hay un gran acuerdo.

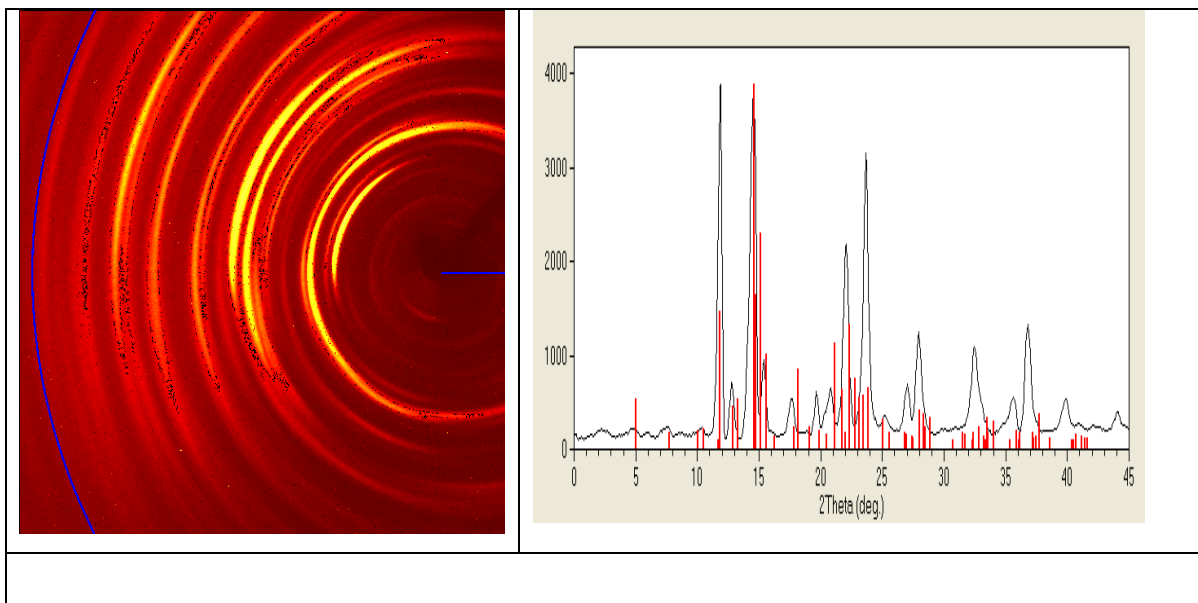


Figura 39 - Análisis puntuales por difracción de rayos X del esmalte del diente usando un difractómetro con detector de área (Smart Apex, Bruker). En el patrón 2D (izq) aparecen arcos indicativos de una orientación preferencial de los cristales de apatito en el esmalte. A partir de este patrón 2D se calculó el diagrama de polvo equivalente (derecha) que muestra picos muy bien definidos y que indican que el esmalte tiene una alta cristalinidad (comparado con la dentina de más baja cristalinidad y que produce picos más anchos).

Asimismo, se muestra el patrón de apatito (fosfato cálcico) superpuesto (en rojo) y con el que hay un gran acuerdo.

6.4.5 Análisis Termogravimétrico

Los diagramas de TG (Figura 40 - A) ponen de manifiesto una ligera pérdida de peso global de la muestra sometida a tratamiento térmico de 7 % (3% hasta 400°C y un 4% hasta 950°C) que correspondería a la eliminación de moléculas de agua débilmente retenidas y eliminación de iones carbonato de la estructura de la hidroxiapatito, como corroboran los análisis de los gases analizados en la combustión de las muestras donde solamente se han detectado vapor de agua y dióxido de carbono.

Por otro lado los diagramas de DSC (Figura 40 - B) correspondientes no manifiestan endotérmicos acusados como cabe esperar para la eliminación de moléculas de agua débilmente retenidas en la muestra.

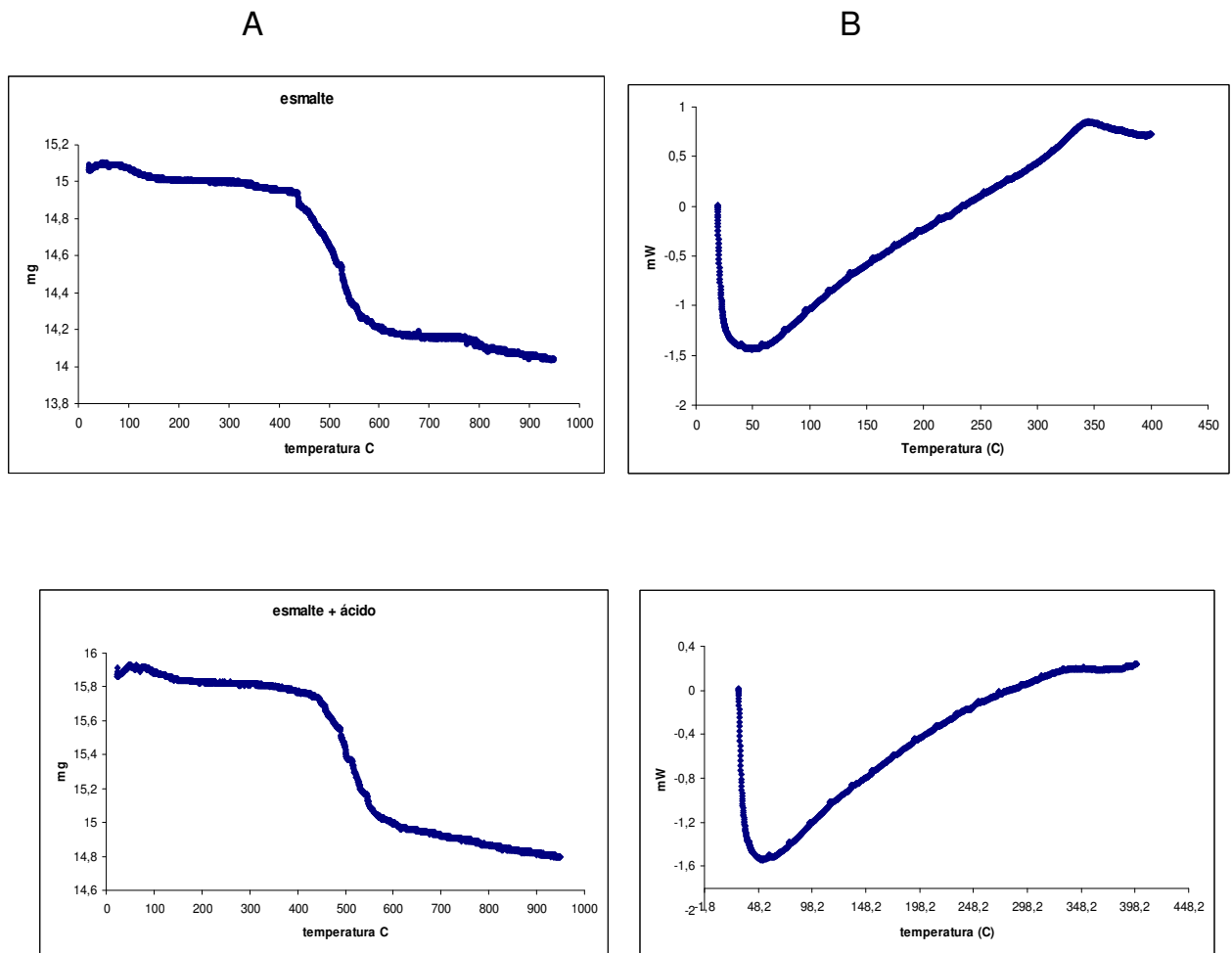


Figura 40 (A y B) - Diagramas de TG (A) y DSC (B) del esmalte sin tratar y tratado con ácido fosfórico durante 90 minutos.

Discusión

7 DISCUSIÓN

En esta investigación hemos usados dientes bovinos debido a la gran dificultad de obtener suficientes dientes humanos. Existen numerosos trabajos científicos que utilizan dientes bovinos, los cuales cuando son acondicionados, manipulados y preparados de manera correcta, los resultados son comparables con los obtenidos en diente humanos⁹⁶. Por este motivo muchos trabajos de investigación utilizan este tipo de dientes ^{12, 18, 49, 53, 73, 96}.

Existen evidencias científicas de que los tratamientos de blanqueamiento dental ocasionan pérdida de calcio en el esmalte, aunque estos trabajos son escasos y están realizados con muy diferentes metodologías. En ese trabajo de investigación los resultados obtenidos coinciden con otras investigaciones realizadas anteriormente y apuntan a la pérdida de calcio después del tratamiento blanqueador ^{1, 5, 6, 17, 21, 26, 35, 37, 45, 49, 51, 80, 84}.

Andrade⁶; McCracken y Haywood¹; Adachi⁵; Machado-Silveiro et al¹⁰¹, Medeiros et al⁶⁹ delimitaron el área de esmalte expuesta que iba a estar en íntimo contacto con el agente blanqueador para estudiar el efecto desmineralizante. En este trabajo de investigación se tuvo la misma preocupación, por eso se confeccionaron especímenes de dientes bovinos con la misma forma, semejante peso y con todas sus superficies en esmalte dental, para asegurar que no hubiera disparidad entre el tamaño y peso de los especímenes. Hecho este de suma

importancia, ya que cuanto mayor peso tenga el espécimen, mayor será la superficie que va a disponer el ácido para captar el calcio.

Utilizamos para el análisis de la pérdida del calcio el Espectrofotómetro de Absorción Atómica (EAA), que es una práctica exacta y extensamente aceptada en estudios ya realizados^{1, 6, 17, 18 37, 76, 84, 101}. Andrade⁶ utilizó en su investigación el Espectrofotómetro de Emisión Atómica por Inducción de Plasma de Argón, para cuantificar la pérdida mineral y concluyó que los agentes blanqueadores ocasionaban pérdida del contenido mineral del esmalte humano.

Los resultados de esta investigación fueron expresados en mg de Ca^{2+} extraídos de cada muestra y no como valores totales en ppm. Teniendo en cuenta que al sacar 5ml de cada período de estudio, no son comparables los resultados sin la corrección correspondiente, añadiendo los mg de Ca^{2+} a la cantidad de solución extraída, utilizando así la misma metodología que Machado-Silveiro et al¹⁰¹. De esta forma, los cálculos de la cantidad de calcio que son quitados de los especímenes, son más complejos, aunque presenta como ventaja la no necesidad de muchas muestras ya que con un solo espécimen evaluamos 5 tiempos sin necesidad de recambiar la solución¹⁰¹.

Algunos estudios han demostrado alteraciones en la morfología del esmalte dental después de la exposición al peróxido de carbamida y peróxido de hidrógeno, sugiriendo la pérdida de minerales. Sin embargo, todos estos estudios fueron conducidos *in vitro*^{22, 18, 56, 60, 62, 64}.

7.1 EFECTO DESCALCIFICANTE DEL PERÓXIDO DE CARBAMIDA

Si observamos el comportamiento de cada uno de los grupos experimentales con respecto al tiempo de exposición al ácido, podemos comprobar que la cinética de la descalcificación es ligeramente diferente entre el grupo control y los grupos sometidos al blanqueamiento. En el grupo control, se observan diferencias significativas entre los 15 y 60 o más segundos de exposición al ácido fosfórico, sin diferencias significativas entre 15 y 30 segundos. A partir de 1 minuto, las cantidades de calcio extraídas son similares en cada período. Los resultados muestran que hay una mayor cantidad de Ca^{2+} que pasa a la solución de ácido fosfórico cuando previamente se han sometido al tratamiento con peróxido de carbamida, en comparación con el grupo control (sin blanqueado previo).

Estos resultados coinciden con los de Andrade⁶; Adachi⁵ y Santos⁹⁶, que comprobaron que las mayores pérdidas del calcio ocurrieron cuando los especímenes fueron grabados en ácido fosfórico al 37%, tras el blanqueamiento. Andrade⁶ en su estudio utilizó el peróxido de carbamida al 10 y 16% y el grabado ácido durante 15 segundos. Adachi⁵ utilizando el peróxido de carbamida al 10% obtuvo resultados similares, que coinciden con los nuestros.

En el presente estudio, el tiempo transcurrido entre el blanqueamiento y la aplicación del ácido fosfórico ha influido en la cantidad de calcio extraído. El esmalte

sometido a blanqueamiento es más susceptible a la desmineralización por el ácido fosfórico, pero esa mayor susceptibilidad no se manifiesta de forma significativa inmediatamente tras el blanqueamiento, sino transcurridas 24 h desde su aplicación y se mantiene en los especímenes analizados tanto a las 72 h como a los 7 días post-blanqueamiento, con un comportamiento similar en estos tres grupos experimentales, que no expresan diferencias significativas entre sí en la cantidad total de calcio extraído (Tabla 5).

Los especímenes de los grupos de blanqueamientos (BL-24; BL-72 y BL-7d) fueron almacenados en saliva artificial en estufa a 37°C, hasta ser usados para la realización del experimento. El objetivo de utilizar la saliva fue promover un ambiente similar a la cavidad bucal y promover la remineralización de los especímenes que ya habían sido blanqueados con peróxido de carbamida al 30% (VivaStyle[®] 30%). Esta metodología ha sido utilizada en muchos trabajos de investigación^{1, 3, 4, 6, 16, 27, 35, 36, 50, 62, 70, 84, 119}. En el estudio de Oltu y Gurgan³, atribuyeron la ausencia de cambios significativos en la estructura del esmalte al hecho de utilizar peróxido de carbamida a baja concentración (10 y 16%) y por haberlos sumergidos en saliva artificial, aún enfatizando que el estudio fue realizado *in vitro* y que en la cavidad bucal existen otros factores importantes que podrían influir en los resultados.

En nuestro estudio, a pesar de los grupos experimentales de 24, 72 horas y 7 días estuvieron almacenados en saliva, no impidió que fueran los que más pérdida de calcio sufrieron. La explicación más coherente para este hecho se basa en el mecanismo químico que ocurre en el proceso de blanqueamiento, que implica esencialmente en una reacción de oxidación, o sea, en el decorrer del

blanqueamiento las cadenas de carbonos son transformados en dióxido de carbono y en agua²⁴. El oxígeno actúan sobre las macromoléculas responsables por las tinciones, transformándolas en moléculas más pequeñas y simples que por su vez son transformadas en cadenas moleculares cada vez más pequeñas, así inicialmente, los compuestos con anillo de carbono fuertemente pigmentados son abiertos y transformadas en cadenas de color más clara. En el punto de saturación, el agente blanqueador empieza a actuar en otros compuestos que presentan cadenas de carbono, como las proteínas de la matriz del esmalte. Es considerado uno punto crítico, pues es el período donde ocurre la pérdida de la estructura dental^{7, 9, 17, 32,72}. Sin embargo aún después del tratamiento blanqueador, el oxígeno residual permanece en la estructura de esmalte dental durante horas tras el proceso de blanqueamiento, promoviendo la pérdida de minerales. El resultado de este estudio es también comparable con la investigación realizada por Efeoglu et al⁸³, Tam et al⁷², donde observaron una importante desmineralización en la superficie de esmalte después del blanqueamiento con peróxido de carbamida al 35%. Por otra parte, explican que uno de los productos de la degradación del peróxido de carbamida es la "urea" y que la misma puede causar efectos perjudiciales sobre el esmalte interprismático, lo cual es una de las causas de la desmineralización. Autores como Oltu et al³, Unlu et al⁷⁶, Portolani Junior et al¹¹⁹ y Araujo Jr¹²⁰ recomiendan el uso de bajas concentraciones de peróxido de carbamida del 10% al 16%, para evitar alteraciones en el esmalte. Unlu et al⁷⁶ surgieron que se recomiende un régimen de blanqueamiento a corto plazo con peróxido de carbamida al 10 o 15%, ya que en estas condiciones no originara daños significativos en la dureza de la superficie del esmalte y dentina. Potocnik et al⁴⁵ utilizando el peróxido de carbamida al 10%, observaron con MEB (microscopio electrónico de barrido) cambios localizados en la

microestructura del esmalte similar a los de caries iniciales. Con microanálisis demostraron bajas concentraciones de calcio y fosfato, concluyendo que las alteraciones microestructurales y químicas ocasionadas por el blanqueamiento con peróxido de carbamida al 10% no tendrían ninguna relevancia clínica. En contradicción Leonard et al¹⁰⁶ y Cavalli et al⁶⁵ afirmaron que las soluciones de peróxido de carbamida al 10% afectan negativamente a la microdureza del esmalte y Tam et al⁷², observaron que el tratamiento blanqueador cuando es aplicado sobre el esmalte intacto no afecta a las propiedades mecánicas de la dentina subyacente, pero cuando se aplica directamente a la dentina, en situaciones clínicas como exposición de la raíz o desgaste oclusal, el blanqueamiento puede causar alteraciones en las propiedades mecánicas de la dentina.

El grupo experimental de 7 días desde el blanqueamiento, también presenta pérdida de Ca, aunque en cantidades menores que los grupos experimentales de 24 y 72 horas (BL-24 y BL-72). Se supone que a partir de ese momento empieza la remineralización y que el proceso de oxidación o la degradación del agente blanqueador en urea, pudo haber impedido la remineralización. Estudios realizados por Albert y Grenoble (1971, Apud, Mondelli, 1987)³³ han demostrado que cuando el esmalte desmineralizado se deja en contacto con la saliva, ocurre la remineralización por precipitación de fosfato y calcio procedente de la saliva. En aproximadamente 96 horas el esmalte estará completamente remineralizado³³.

En todos los grupos de especímenes sometidos al blanqueamiento, la acción del ácido presenta un comportamiento similar al control no tratado. Sin embargo, el grupo de blanqueamiento reciente (BL-I) demuestra una susceptibilidad más

prolongada al ácido ya que la cantidad de calcio extraído a los dos minutos es significativamente superior a la obtenida tras 1 minuto de exposición al ácido. Tanto en este grupo como en el que han transcurridas 24 horas tras el blanqueamiento (BL-24), se obtienen diferencias significativas entre el calcio extraído al cabo de 1 minuto respecto al obtenido a los 15 segundos. Los grupos de especímenes sometidos al blanqueamiento 72h (BL-72) y 7 días (BL-7d) tienen un comportamiento parecido y sólo se obtienen diferencias entre los períodos de 15 segundos respecto a los de 90 y 120 segundos de exposición al ácido.

En el presente trabajo de investigación se ha verificado que la cantidad de calcio extraído de los dientes sometidos a blanqueamiento aumenta en función del tiempo, aunque se estabiliza a partir de los 30 segundos, sin haber diferencias significativas en la cantidad de calcio removida en períodos más prolongados. Con eso, la mayor pérdida de calcio ocurre en los primeros 30 segundos de exposición al ácido.

El resultado de este estudio es también comparable al resultado de Efeoglu et al⁸³, ellos observaron que hubo una reducción significativa en el contenido de minerales del esmalte. Este estudio *in vitro* demostró una importante desmineralización del esmalte que ocurrió después del blanqueamiento con peróxido de carbamida al 35%. En otro estudio similar Cavalli et al⁶⁵ sugieren que altas concentraciones de peróxido de carbamida pueden promover alteraciones sobre la superficie del esmalte y rugosidad superficial.

Según Martínez Bello et al¹⁷ las alteraciones en la estructura física del esmalte deberían ser consideradas por cualquier profesional que utilice las técnicas de blanqueamiento dentario, pues sus evaluaciones revelaron que las muestras tratadas con las sustancias blanqueadoras presentaron alteraciones topográficas en la superficie externa del esmalte. En todos los casos observados se detectó una disolución selectiva de los cristales, la cual afectó preferentemente al centro de los prismas, manteniéndose las periferias del bastón intacto. Según las observaciones efectuadas mediante análisis de microscopia electrónica de barrido (SEM), pudieron concluir que los 3 agentes blanqueadores (Opalescente, Platinum, Receta Magistral de Farmacia) provocaron variadas alteraciones topográficas a nivel de la superficie del esmalte *in vitro*, desde la formación de una capa amorfa, desmineralización tipo I de Silverstone hasta la formación de poros profundos.

Todavía hay cierta controversia en la literatura sobre si el peróxido de carbamida al 10% causa o no desmineralización, Haywood et al¹¹ informó que no hubo cambios en la morfología de la superficie, cuando se utilizó a concentración de 10%. Para otros investigadores como Oltu y Gurgan S³; Portolani Junior y Candido¹²⁰ Lee et al¹⁸; Götz et al⁶⁰; Rodrigues et al¹²²; Mujdeci y Gokay⁸⁹; Tam et al⁷³ observaron leves modificaciones en la superficie de esmalte que no fueron estadísticamente significativas. En cambio Leonard et al¹²² afirmaron que soluciones de peróxido de carbamida al 10% pueden afectar negativamente a la microdureza del esmalte. Rodrigues et al⁶⁷ evaluaron dos blanqueadores: peróxido de carbamida al 37%; peróxido de carbamida al 10% y la combinación de ambas técnicas. Y observaron que hubo reducción de la microdureza de esmalte. Sin embargo, el grado de pérdida mineral era bajo y no era considerado clínicamente significativo. Sin embargo, todos

los investigadores son unánimes en concluir que el uso de peróxido de carbamida resulta en pérdidas de minerales en el esmalte. Efeoglu et al⁸³; Cavalli et al^{65,75}, Castello y Monneral⁵⁴ utilizaron el peróxido de carbamida al 35%, Carrasco et al⁸⁷ utilizó el peróxido de carbamida al 37%, Al Salehi et al⁷⁰ y Pinto et al⁵⁵ usaron el peróxido de carbamida al 30% y observaron que después del blanqueamiento con estas concentraciones, hubo una reducción significativa en el contenido minerales del esmalte y también sugieren que las altas concentraciones de peróxido de carbamida pueden promover alteraciones sobre la superficie del esmalte. Fenómenos similares también fueron encontrados en esto estudio, cuando se utilizó el peróxido de carbamida a alta concentración, resultando en la pérdida de calcio.

7.2 EFECTO DESCALCIFICANTE DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Los grupos experimentales sometidos al blanqueamiento presentan una cantidad promedio de Ca^{2+} extraído por el ácido fosfórico significativamente mayor a la obtenida en el grupo control. Esta pérdida de calcio es acentuadamente mayor, pues el espécimen pasa por dos procesos de desmineralización, que son el blanqueamiento y el grabado ácido. Los resultados de este estudio coinciden con los de de Andrade⁶; Adachi⁵, Santos⁹⁶ y Mccracken y Haywood¹ que encontraron una mayor pérdida del contenido mineral cuando el esmalte fue sometido en ácido fosfórico al 37% tras el blanqueamiento dental.

El tiempo de demora entre el blanqueamiento y la aplicación del ácido, como la duración del contacto con el mismo influyen significativamente en la cantidad total de Ca^{2+} extraído, cuando se aplica el peróxido de hidrógeno al 30% como agente blanqueador.

Encontramos diferencias significativas en el grupo de blanqueamiento inmediato ($p < 0,05$), así como también en el grupo en el que los especímenes fueron blanqueados y después de un período de 24h fueron sumergidos en ácido fosfórico al 37% ($p < 0,05$). En esos grupos, sí hay diferencia significativa en relación al grupo control. Sin embargo, estas diferencias desaparecieron a las 72h y se mantuvieron a la semana después de la realización del blanqueamiento con peróxido de hidrógeno.

La cinética de la descalcificación en cada uno de los grupos experimentales fue similar observándose que la extracción de Ca^{2+} es progresiva, aumentando significativamente en cada periodo de 30 segundos. El peróxido de hidrógeno presenta un alto poder de penetración en esmalte y dentina, debido a su bajo peso molecular^{4, 9, 19, 23, 24, 42, 56, 121, 123,}. Confirmando estos resultados, en la investigación realizada por Rotstein et al⁵¹, donde los niveles del calcio (Ca), fósforo (P) y potasio (K) fueron medidos en el esmalte, dentina y cemento, encontrándose una reducción significativa del calcio y fósforo en el esmalte después del tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%. Por lo tanto, el poder de difusión contribuye a una mayor pérdida de Ca^{2+} y otros minerales. Sin embargo, cuando evaluamos el Ca^{2+} extraído (mg) en cada uno de los grupos experimentales en función del tiempo de aplicación del ácido, no se obtiene diferencias significativas en el tiempo necesario para que el ácido fosfórico induzca la descalcificación del esmalte entre los grupos

experimentales blanqueados con peróxido de hidrógeno al 30% con respecto al grupo control. La pérdida de Ca^{2+} en relación al tiempo de exposición al ácido fosfórico, deja claro que el grupo BL-72h presenta una similitud de comportamiento evolutivo al grupo control y este comportamiento se extiende también al grupo BL-7d.

Los grupos de blanqueamiento donde los especímenes fueron sumergidos inmediatamente en el ácido fosfórico al 37% y también los grupos sumergidos tras 24h del tratamiento blanqueador, en todos los periodos de tiempo, fueron los dos grupos experimentales donde más Ca^{2+} se perdió. Los demás grupos perdieron Ca^{2+} , pero no fueron estadísticamente significativos. Se presume que el hecho de que los especímenes se quedaron en una solución de saliva artificial contribuyó para que la reducción de la pérdida de Ca^{2+} fuera más evidente. Teniendo en consideración el gran poder lesivo del peróxido de hidrógeno, posiblemente la saliva artificial atenuó los efectos negativos de esa sustancia blanqueadora sobre la estructura de esmalte. Esto fue confirmado en trabajos realizados por Joiner et al⁴², Attin et al⁸⁰ y Esberard et al⁵⁶ entre otros, que observaron la disminución de la dureza del esmalte blanqueado puede ser reversible por el proceso de remineralización tras el blanqueamiento y que los defectos microestructurales del esmalte pueden ser reparados por los componentes de la saliva, como el calcio y o fosfato. Attin et al⁸⁰; Joiner et al⁴²; Giannini et al⁷¹; Hannig et al⁴⁹ y Oliveira et al⁵⁰ han formulados agentes blanqueadores a los que se les añade fluoruros, los cuales son fundamentales para el proceso de remineralización.

Las alteraciones en el esmalte sometido al grabado ácido con fosfórico son bien conocidas desde que Buonocorre, 1955 describió la técnica⁶. Estudios como los de Andrade⁶; Mccracken y Haywood¹; Santos⁹⁶ y Adachi⁵, destacan una más evidente cuando se realiza después del blanqueamiento dental. Otras investigaciones como las de Sulieman et al⁴⁶; Al-Salehi et al⁷⁰; Lee et al¹⁸ evaluaron la pérdida de calcio del esmalte después de la aplicación de peróxidos y observaron diferentes grados de descalcificación.

Esta pérdida de calcio es responsable de las alteraciones estructurales en la superficie del esmalte y también en su microdureza. No hay consenso entre la comunidad científica sobre el uso de peróxido de hidrogeno a alta concentración. Aunque, hay algunos estudios que hablan a favor de la seguridad del peróxido de hidrógeno a altas concentraciones^{4, 45, 58, 62, 71, 89,} otros sugieren que a esta alta concentración pueden ocasionar efectos perjudiciales sobre el esmalte^{37, 84}.

Algunos autores relatan en sus estudios que el uso del peróxido de hidrógeno produce alteraciones en el esmalte, como Haywood y Heymann¹¹ encontraron un efecto erosivo no uniforme al blanquear el esmalte con peróxido de hidrógeno al 5.3%. Nizam H et al¹²⁴ no encontraron diferencias significativas en el módulo de Young del esmalte dental. Sin embargo, las características mecánicas del esmalte blanqueado estaban significativamente disminuidas. Spalding M et al⁶² demostraron que el peróxido de hidrógeno al 35% tenía una tendencia a promover un aumento en la densidad de los poros en la superficie, dando un aspecto poroso al esmalte dental. Al-Salehi et al⁷⁰ Informaron de un incremento de la liberación de calcio y fosfato tras el uso de peróxido de hidrógeno con una reducción significativa de los

valores de microdureza, poniendo de manifiesto que las exposiciones prolongadas al peróxido de hidrógeno afecta al contenido mineral del esmalte. La microdureza del esmalte disminuyó significativamente con el blanqueamiento, dejando evidente, por lo tanto, que la prolongada exposición al peróxido de hidrógeno tiene el potencial de afectar el contenido mineral de los dientes bovinos. Jiang et al⁵² confirmaron en estudio realizado que el peróxido de hidrógeno atacó tanto la materia orgánica como al componente mineral de la dentina como componentes de mineral de dentina. Los resultados no sólo suministran pruebas químicas directas para la hipótesis de que el peróxido de hidrógeno podría causar la destrucción de dentina por un mecanismo de la oxidación de proteína. Carrasco et al⁸⁷ demostraron que el peróxido de hidrógeno asociado con el perborato de sodio, presentó un aumento en la permeabilidad del esmalte dental. Castello y Monneral⁵⁴ observaron que a medida que se aumentó el tiempo de exposición al agente blanqueador, el patrón de alteración estructural fue creciendo. La ausencia de alteraciones o alteraciones blanda, observadas en el grupo Whiteness HP FGM® se deben al su pH alcalino. La presencia de alteraciones leves, moderadas, avanzadas en el grupo de realizado con fórmula magistral, puede ser atribuida al pH ácido del agente blanqueador. Pinto et al⁵⁵ relatan en su resultados que el peróxido de hidrógeno al 7,5%(Day White 2Z) y 35%(Whiteness HP), pueden alterar la microdureza, rugosidad y morfología superficial del esmalte dental. Bistey et al⁴³ evaluaron el efecto del peróxido de hidrógeno de 10, 20 y 30% sobre el esmalte humano usando espectroscopia FT-IR La alteración en esmalte era proporcional al tiempo del tratamiento y a la concentración del peróxido de hidrógeno. Una concentración más alta y un tiempo más largo del tratamiento dieron lugar a alteraciones más severas. El análisis numérico de los espectros reveló que al usar soluciones concentradas de peróxido de hidrógeno, los espectros de IR eran

más pronunciados. Los cambios espectrales de la estructura de hidroxiapatita indicaron un cierto grado de destrucción en el esmalte después del almacenaje del espécimen en la solución blanqueadora, sin tendencia a la reversibilidad espontánea. Una concentración más alta y un tiempo más largo del tratamiento dieron lugar a alteraciones más severas.

En cambio, otros autores defienden que el PH no ocasionan ningún tipo de alteración estructural en el esmalte como: Götz et al⁶⁰ que usaron cintas con peróxido de hidrógeno para blanquear y confirmaron que no se originaron cambios en la histomorfología superficial y subsuperficial, microdureza y en la composición química de los dientes. Rotstein et al⁵¹ usando peróxido de hidrógeno del 30%(HP); peróxido del carbamida al 10% (CP), perborato del sodio (SP), Nu-Smile (NS), opalescence (Op), y DentlBright (DB), observaron una reducción significativa en el cociente de Ca/P después del tratamiento con HP, CP, DB, Op y concluyeron que los productos blanqueadores pueden afectar los tejidos duros de los dientes y deben ser utilizados con precaución. Tam et al⁷³ estudiaron el efectos de PC y PH sobre la fuerza de flexión y el módulo flexión del esmalte dental y observaron en los grupos blanqueados con peróxido de hidrógeno que no hubo disminuciones significativas del esmalte dental, Cuando eran expuesto a tiempos cortos de tratamiento por el contrario, Sulieman et al⁴⁶ no encontraron cambios significativos en la dureza del esmalte y dentina después de aplicarle PH al 35%, y tampoco observaron con SEM ninguna alteración topográfica en el esmalte ni en la dentina.

Aunque una comparación directa entre las investigaciones citadas no es posible debido a la diferencia en condiciones experimentales. Lee et al¹⁸ verificaron

que la cantidad de pérdida calcio en el esmalte blanqueado durante 120 horas era similar al total de la pérdida de calcio en dientes expuestos a un refresco o zumo durante unos minutos, concluyendo que la pérdida mineral causada por el proceso de blanqueamiento puede no ser un factor deletéreo o amenazantes para los dientes.

Hegedus et al⁴⁸ observaron por microscopía de fuerza atómica el efecto del peróxido de hidrógeno al 30% aplicado durante 28h y lo compararon con esmalte no blanqueado. En ambos grupos observaron la presencia de grietas en el esmalte, pero eran las profundas en el esmalte blanqueado, y concluyeron que los blanqueadores son capaces de causar alteraciones superficiales del esmalte. Se especula que los agentes blanqueadores que contienen peróxidos afectan la fase orgánica del esmalte. Los peróxidos pueden afectar no sólo la superficie sino también la estructura interna del esmalte, ya que, debido a su poco peso molecular pueden penetrar en el interior del esmalte subsuperficial, donde, los fenómenos de oxidación interna pueden ser más intensos debido a la mayor presencia de material orgánico ^{4, 23, 24, 42, 62, 123}.

Algunos estudios han informado que el peróxido de hidrógeno no sólo daña al esmalte sino que también puede afectar al componente orgánico e inorgánico de la dentina ^{18, 26, 37, 58, 80}. En este sentido Jiang et al⁵² evaluaron el efecto del peróxido de hidrógeno al 30% sobre la dentina humana usando Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR) y Espectroscopia de Reflexión (ATR). Los cambios estructurales fueron determinados fundamentalmente mediante espectros ATR que pusieron de

manifiesto una eliminación superficial del componente orgánico de la dentina. Las bandas mayormente modificados fueron las correspondientes a los grupos amida II y amida III. Bistey et al⁴³ han detectado cambios estructurales severos en esmalte humano superficial después del tratamiento con el peróxido de hidrógeno al 10-30% *in vitro* en el esmalte superficial, usando FT-IR, que eran proporcionales al tiempo del tratamiento y la concentración del peróxido de hidrógeno. Una concentración más alta y un tiempo más largo del tratamiento dieron lugar a alteraciones más severas aunque, se han observados alteraciones incluso con bajas concentraciones como al 10%. Pudiéndose afirmar que el peróxido de hidrógeno causa una alteración irreversible en el esmalte después de 120 minutos de aplicación, aunque eso no se observa clínicamente. Según Bistey y colaboradores⁴³ recomendaron usar peróxidos a bajo concentración y por un tiempo no superior a una hora.

7.3 - COMPARACIÓN ENTRE PERÓXIDO DE CARBAMIDA Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Se ha comprobado que la cantidad promedio de Ca^{2+} extraída por el ácido fosfórico al 37% al aplicar el peróxido de hidrógeno al 30% es sólo ligeramente superior a la extraída por el mismo procedimiento cuando se ha aplicado previamente peróxido de carbamida al 30%. Creemos que ambos blanqueadores predisponen al esmalte a una pérdida similar de Ca^{2+} cuando es grabado con ácido fosfórico. No obstante, a partir de los 30s de exposición al ácido se observa que los

especímenes blanqueados con peróxido de hidrógeno al 30% presentan una mayor pérdida de calcio que cuando los comparamos con los blanqueados con peróxido de carbamida al 30%, pero estas diferencias en general, no fueron estadísticamente significativas, a excepción del periodo de exposición al ácido de 90 segundos.

Las muestras blanqueadas con peróxido de hidrógeno presentaron una descalcificación más intensa al ácido en los grupos inmediatamente y a las 24 horas después del blanqueamiento. En los demás grupos, las tasas de descalcificación en función del tiempo se hicieron prácticamente similares, superponiéndose a partir de una semana desde la aplicación del blanqueador. Por lo que podemos afirmar que los especímenes blanqueados con PH presentan una mayor susceptibilidad al efecto descalcificante del ácido fosfórico hasta las 24h, en comparación con el peróxido de carbamida. Creemos que esto se puede explicar por el hecho de que el peróxido de carbamida al 30% rompe en peróxido de hidrógeno al 11% y 19% y urea, que el peróxido de hidrógeno usado, aunque viene etiquetado como peróxido de hidrógeno al 30%, al mezclar los dos componentes la concentración resultante es un gel al 15%, por lo que en realidad la concentración final de peróxido de hidrógeno en ambos productos comerciales es muy similar, por que es de esperar que tengan efectos descalcificantes similares.

Además, los especímenes estuvieron expuestos a procesos de remineralización al estar inmersos en saliva artificial que de cierta forma disminuyó o neutralizó la acción ácida sobre la estructura superficial del esmalte. Attin et al⁷⁹ y Devlin et al⁵⁸ en experimentos separados estudiaron la dureza del esmalte antes y después de la aplicación Coca-Cola durante la noche y después del uso de la saliva

artificial. La Coca-Cola redujo la dureza del esmalte, pero se recuperó parcialmente en un 18%, después de la inmersión en saliva artificial.

El tratamiento blanqueador continúa siendo bastante cuestionado en cuanto a sus efectos perjudiciales, en parte es verdad, los dientes que pasan por tratamientos de blanqueamiento sufren cambios en la estructura del esmalte dental y pérdida mineral, todavía los estudios nos sugiere que esas alteraciones no son clínicamente significantes^{22,63}. Por otra parte, investigadores defienden firmemente que la adición del fluoruro y calcio en la composición de la sustancia blanqueadora podría inhibir el proceso de desmineralización. Según Oliveira et al⁵⁰ es probable que la presencia de los iones de fluoruro reduzca el proceso de desmineralización. Así, el propósito de la formulación blanqueadores con la adición de fluoruro y calcio sería aumentar la saturación del gel, reducir la pérdida mineral y de aumentar la resistencia del esmalte a la desmineralización causado por los peróxidos. Bizhang et al⁵³ en este estudio aplicaron un barniz de flúor después de someter los especímenes a blanqueamiento, el barniz redujo la desmineralización y se pudo observar que se disminuyó la pérdida mineral. Oliveira et al⁵⁰ abogan la inclusión del fluoruro o calcio a los agentes blanqueadores, pues los mismos podían ser un alternativa posible para superar los efectos adversos del peróxido del carbamida en la superficie de esmalte, todavía es necesario más investigaciones para evaluar clínicamente su aplicación después del blanqueamiento y quizá sea de gran valía en el proceso de remineralización.

En nuestro estudio cuando comparamos los dos agentes blanqueadores no hubo diferencia estadísticamente significativa, en cuanto a la pérdida de calcio. Los

resultados de este estudio son comparables a los obtenidos por Gultz et al¹²⁵, que no encontraron diferencias entre el peróxido de carbamida 35% y peróxido hidrógeno al 35% tampoco observaron diferencias morfológicas apreciables en el esmalte grabado con ácido fosfórico al 35% cuando lo observaron con SEM¹²⁵.

Tiempo en cuenta el comportamiento de los especímenes con el tiempo, se puede decir que clínicamente el blanqueamiento realizado en las consultas, va a modificar el poder descalcificante del ácido fosfórico al 37% rutinariamente utilizado en el esmalte dental, por tanto la hipótesis planteada en ese estudio se rechaza, ya que el proceso de descalcificación aumenta cuando se utiliza el blanqueamiento y el grabado ácido. Santos⁹⁶ expuso en su investigación que los dientes sometido al blanqueamiento y grabado ácido presenta un grabado extensivo, con pérdidas del límite prismático sugiriendo la reducción del tiempo de aplicación del ácido fosfórico o la utilización de ácidos más débiles. Es aconsejable esperar al menos una semana para dar lugar a que ocurra la remineralización, dejando el diente en contacto con la saliva antes del procedimiento restaurador, evitando de esa forma el sobregrabado del esmalte. Por lo tanto es conveniente no realizar ninguno tratamiento restaurador estético hasta que los efectos del agente blanqueador sean totalmente neutralizados y no se agrave aún más la desmineralización. También hay investigaciones *in vitro* utilizando el peróxido de carbamida al 10% que muestran desmineralización pero sin significación, pues los especímenes se mantuvieron sumergidos en saliva después del uso del blanqueador y es un hecho demostrado que el esmalte desmineralizado es más receptivo a la remineralización que es esmalte intacto^{55, 56, 124}.

Además del efecto desmineralizante ocasionado por los agentes blanqueadores sobre el esmalte ^{1, 122}, hay estudios que informan sobre las alteraciones en la textura superficial del esmalte. Carrasco et al⁷⁰ demostraron que el peróxido del carbamida al 37% incrementó la permeabilidad del esmalte dental, seguida por una mezcla de perborato del sodio más peróxido de hidrógeno al 20% y el peróxido del carbamida al 27% proporcionó los resultados más bajos.

Es importa enfatizar que el uso de agente blanqueador debe ser minuciosamente evaluado por el dentista en cuanto a sus reacciones adversas. No hay en este momento un consenso entre los investigadores sobre que agente blanqueador y a que concentración causa menos daños a las estructuras dentales.

Es preocupante el efecto desmineralizante que el uso de los agentes blanqueadores origina sobre el esmalte, ya que muchas veces es necesario realizar procedimientos restaurados que requieren el uso del grabado ácido del esmalte después de finalizar un tratamiento blanqueador. Son necesarias más investigaciones para ver que blanqueador, a que concentración y durante que tiempo debemos utilizar los agentes blanqueadores ⁵⁶. No obstante más trabajos de investigación deben ser realizados, para aclarar todas las dudas con respecto a que agente blanqueador debe elegir y en que concentración es menos agresiva a las estructuras dentales.

Conclusiones

8 CONCLUSIONES

El análisis de los resultados conduce a las siguientes conclusiones:

1 - La cantidad de calcio extraído por el ácido fosfórico inmediatamente después de la aplicación del peróxido de carbamida al 30% es igual al obtenido sin su aplicación.

2 – En los grupos sometidos a blanqueamientos con peróxido de carbamida al 30%, la pérdida de calcio se incrementa en función del tiempo de aplicación de ácido.

3 - El tiempo de demora entre la aplicación del peróxido de carbamida y del grabado ácido influye en la cantidad de calcio extraído, que es mayor a las 24 horas disminuyendo a los siete días después del blanqueamiento.

4 – La cinética de la descalcificación es ligeramente diferente entre los grupos controles y los grupos sometidos al blanqueamiento. La cantidad de calcio extraído por el ácido fosfórico está influenciada por el blanqueamiento con peróxido de carbamida al 30%.

5- La cantidad promedio de Ca^{2+} extraída por el ácido al aplicar el peróxido de hidrógeno al 30% es sólo ligeramente superior a la extraída por el peróxido de carbamida al 30%.

6- Las cantidades promedio de Ca^{2+} extraído en cada tiempo de grabado, con independencia del periodo de demora transcurrido desde el blanqueamiento se ha comprobado que a partir de los 30s de grabado ácido la cantidad promedio de Ca^{2+} extraída por el Peróxido de Hidrógeno al 30% es mayor que la obtenida a partir de las muestras en las que se aplicó Peróxido de Carbamida al 30%, y aun puede afirmarse que la susceptibilidad al ácido es similar en los especímenes blanqueados con los dos agentes, ya que las diferencias entre ambos no son significativas en ninguno de los tiempos de exposición ácida.

7- El tratamiento con ácido fosfórico diluido sobre muestras de esmalte finamente pulverizado produce un decrecimiento gradual del grado de mineralización, siendo especialmente significativo en los primeros cinco minutos de su tratamiento. La composición mineralógica y cristalinidad de las muestras se ajusta a un patrón de hidroxiapatito cálcico existiendo una orientación preferencial de los cristales que se disponen con el eje c del apatito perpendicular a la superficie del esmalte registrado.

Bibliografías

BIBLIOGRAFIAS

1- Mccracken MS; Haywood.VB. Demineralization effects of 10 percent carbamide peroxide. Journal of Dentistry 1996; 24(6): 395-398.

2- Hairul Nizam BR, Lim CT, Chng HK, Yap AUJ. Nanoindentation study of human premolars subjected to bleaching agent. Journal of Biomechanics 2005; 38: 2204–2211.

3- Oltu U; Gurgan S. Effects of three concentrations of carbamide peroxide on the structure of enamel. Internacional Endodontic Journal 2000; 27: 332-340.

4- Basting RT. Effects of a 10% carbamide peroxide bleaching agent on roughness and microhardness of packable composite resins. Journal Esthetic and Restorative Dentistry 2005; 17: 256-263.

5- Adachi EM. Estudo "*in vitro*" da perda de massa dental humana com o uso de agente clareador caseiro à base de peróxido de carbamida a 10 por cento, comparado ao condicionamento com ácido fosfórico a 37 por cento, utilizando o método radiométrico. [Tese de doutorado]. Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2001; 107p.

6- Andrade AP. Efeito da técnica de clareamento no conteúdo mineral do esmalte humano. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005; 92p.

7- Miranda MM; Reis NA, Miranda JR. Blanqueamiento dental interno y externo. /En: Cardoso RJA; Gonçalves EAN. Estética odontológica-nueva generación. Ed. artes médicas: 2003. 343-362p

8- Cimilli H, Pameijer CH. Effect s of carbamide peroxide bleaching agents on the physical propertie and chemical composition of enamel. American Journal of dentistry, 2001; 14(2): 63-66.

9- Baratieri NL, Monteiro Junior S, Andrada MAC, Vieira LCC. Odontología Reparadora fundamentos e Posibilidades. Sao Paulo. Ed. Santos; 2001.

10- Goldstein RE. Odontología estética – principios, comunicación y métodos terapéuticos. Madrid. Ars. Medica, 2002.

11- Haywood VB, Haymann HO. Nightguard vital bleaching. Quintessence Int 1989; 20(3): 173-6.

12- Goia T. Avaliação de quatro técnicas de clareamento para dentes não vitalizados:Hi-lite ativado por luz halogena, peróxido de hidrogênio ativado por lazer de argônio, peróxido de hidrogenio ativado por espátula aquecida e “walking bleach” – estudo in Vitro, em dentes bovinos. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia de São Paulo, 2000, 163f.

13- Tumenas I, Ishikiama SM. Planeamiento estético integrado en periodoncia y prostodoncia./ En: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. Estética Odontológica-Nueva Generación. Ed. Artes médicas: 2003. 251-282p.

14- Zanin F, Jamos AB, Zanin S, Moran L. Novos sistemas de clareamento laser light2 e lampada zoom. Revista Dental Gaucho. p.16-21

15- Aldecoa EA, Mayordomo FG. Soluciones estéticas en dientes con descoloraciones. Madrid, 1992; 170p.

16- Greenwall L. Técnica de blanqueamiento en odontología restauradora- Guia ilustrada. Ars. medica, Barcelona. Es; 2002.

17- Martínez Belo A; Morales Figueroa R; Brethauer Meier U. Efecto del peróxido de carbamida al 10% sobre el esmalte dentario. Avances en Estomatología 2002; 18 (2): 111-115.

18- Lee KH, Kim HI, Kim KH, kwon YH. Mineral loss from bovine enamel by a 30% hydrogen peroxide solution. Journal of Oral Rehabilitation.2006; 33: 229-233.

19- Tornelli MJ. Clareamento dental. Voce ainda tem dúvidas de seu funcionamento. Disponible en <www.arquivodentalgaucho.com.br/estetica> acceso en 23/ 08/ 2005.

20- Cefaly DFG, Navarro MFL, Mondelli RFL. Riscos com o clareamento dental. Livro do 2º congresso internacional de odontologia de SP: São Paulo 2002; p.394-418.

21- Sung EC, Chan SM; Mito BR, Caputo AA. Effect of carbamide peroxide bleaching on the shear bond strength of composite to dental bonding agent enhanced enamel. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1999; 82 (5): 595-599

22- Lebramanti DB. Resistencia adesiva à dentina após clareamento dental. [Dissertação de Mestrado] Sao Paulo. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2005. 127f.

23- Ferlin JP, Nuti Sobrino A, Lima SN. O uso do jato de bicarbonato de sódio na prevenção da mudança da cor nos dentes anteriores e clareamento dental: uma técnica alternativa. *Revista Paulista de Odontologia* 1990; 2 (3): 31-34.

24- Baratieri LN, Monteiro Junior S, Andrada MAC, Vieira LCC. Clareamento dental. Chicago: Quintessence Int.; 1994. 176p.

25- Andrade AKM, Ruiz PA, Medeiros MCS. Clareamento de dentes não vitais. Disponível em: <www.endodontia.org/clareamento.htm> acceso en 3 de marzo de 2006.

26- Mota ACF, Machado BS, Amorin BR, Montenegro G. Clareamento de dentes não vitais: peróxido de carbamida x perborato de sodio. Disponível em :< www.ibemol.com.br/ciaolf2001/337.asp> acceso en 11 de noviembre de 2007.

27- Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence Int* 1991; 22: 515-23.

28- Freinman RA, Godstein RE, Garber DA. Blanqueamiento dental. Barcelona. Ed. doyma, 1990.

29- Agentes clareadores. Disponible en: < www.clareamentodental.com.br> acceso 6 de marzo de 2006.

30- Goldstein, RE; Haywood, VB. Odontología estética VII./ En: Haywood VB, Caughman F, Goldstein RE. Es. Manchas y tinciones. Ars Médica, Cap. 16; 2002. Barcelona, p. 491-621.

31- Henostroza, GH et al. Estética odontología restauradora. Ripano S.A; D-L; Madrid 2006; 416 p.

32- Baratieri LN et al. Procedimientos preventivos e restauradores. Ed. Santos; 1993. 509p.

33- Mondelli J, Galan Jr J, Ishikiriama A, Coradazzi JL, Navarro MFL, Pereira JC. Restaurações Estéticas. Ed. Sarvier. São Paulo; 1987. 190p.

34- Nagem Filho H.; Nagem HD, Dias A R, Fiuza CT. Efeito do Condicionamiento ácido en la morfología do esmalte. Rev. FOB 2000; 8 (1/2): 79-85.

35- Rodrigues JA, Basting RT, Serra MC, Rodrigues Jr AL. Effects of 10% carbamide peroxide bleaching materials on enamel microhardness. *American Journal of Dentistry*, 2001; 14(2): 67-71.

36- Zalkind M, Arwaz JR, Goldman A, Rotstein I. Surface morphology changes in human enamel, dentin and cementum following bleaching: a scanning electron microscopy study. *Endodontic & Dental Traumatologic*, 1996; 12: 82-88.

37- Perdigao J, Francci C, Swift EJ, Ambrose ww, Lopes M. Ultra-morphological study of the interaction of dental adhesives with carbamide peroxide-bleached enamel. *American Journal of Dentistry*, 1998; 11(6): 291-300.

38- Carrilho EVP, Paula A, Tomaz J. Nova Técnica de Branqueamento: Expectativas e Resultados. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac* 2006; 47: 211-218.

39- Atance JAR. *Bioquímica bucodental*. Madrid. Ed. Síntesis, 1996. 334p.

40- Davis, W L. *Histología y Embriología Bucal*. México. Interamericana, 1986. 238p

41- Ferraris, M E G; Campos Muñoz, A. *Histología y embriología bucodental- bases estructurales de la patología, el diagnóstico, la terapéutica y la prevención odontológica*. Madrid, España; Ed. médica panamericana, 2º edición. 2002; p. 467.

42- Joiner A, Thakker G, Cooper Y. Evaluation of a 6% hydrogen peroxide tooth whitening gel on enamel and dentine microhardness in vitro. *Journal of Dentistry*, 2004; 32: 27–34.

43- Bistey T, Nagy IP, Simo A, Hegedus C. In vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel. *Journal of Dentistry*, 2007; 35: 325-330.

44- Worschech CC, Rodrigues JA, Martins LRM, Ambrosano GMB. In vitro evaluation of human dental enamel surface roughness bleached with 35% carbamide peroxide and submitted to abrasive dentifrice brushing. *Pesquisa Odontologica Brasileira*, 2003;17:342–8.

45- Potocnik I; Kosec L; Gaspersic D. Effect of 10% Carbamide Peroxide bleaching Gel on Enamel Microhardness, Microstructure, and Mineral Content. *Journal of Endodontics*, 2000; 26 (4): 203-251.

46- Sulieman M, Addy M, Macdonald E, Rees JS. A safety study in vitro for the effects of an in-office bleaching system on the integrity of enamel and dentine. *Journal of Dentistry*, 2004; 32: 581-590.

47- Shey Z, Brandt S. Enamel loss due to acid treatment for bonding. *Journal Clin Orthodontic*, 1982; 16(5): 338-40.

48- Hegedus C, Bistey T, Flora-Nagy E, Keszthelyi G, Jenei A. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *Journal of Dentistry*, 1999; 27: p 509 –515.

49- Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T. Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. *Archives of Oral Biology*, 2005: 541-552.

50- Oliveira R; Paes Leme AF, Giannini M. Effect of a carbamide peroxide bleaching gel containing calcium or fluoride on human enamel surface microhardness. *Brazilian Dental Journal*, 2005; 16(2): May/Aug. Riberao Preto.

51- Rotstein I, dankner E, Godman A, heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histo chemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *Journal of Endodontic*, 1996; 22(1): 23- 25.

52- Jiang T, Ma X, Wang Y, Tong H, Zhu Z. Effects of Hydrogen Peroxide on Human Dentin Structure. *Journal of Dental Research*, 2007; 86(11): 1040-1046.

53- Bizhang M, Seemann R, Duve G, Römhild G, Altenburger MJ, Jahn KR, Zimmer S. Demineralization Effects of 2 Bleaching Procedures on Enamel Surfaces With and Without Post-treatment Fluoride Application. *Operative Dentistry*, 2006; 31(6): 705-709.

54- Castelo RR, Monnerat AF. Avaliação das alterações estruturais em esmalte submetido ao clareamento com peróxido de hidrogênio a 35%: Rev. Brasileira Odontológica, 2004; 61(3/4): 160-164.

55- Pinto CF, Oliveira R, Cavalli V, Giannini M. Peroxide bleaching agent effects on enamel surface microhardness, roughness and morphology. Brazilian Oral Research. 2004; 18(4): São Paulo Oct. /Dec.

56- Esberard RR, Consolaro A, Esberard RM, Bonetti Filho I, Esberard RR. Efeitos das técnicas e dos agentes clareadores externos na morfologia da junção amelocementária e nos tecidos dentários que a compõem. Revista Dental Press Estética, 2004; 1(1): 58-72, out./nov./dec.

57- Josey AL, Meyers IA, Romaniuk K, Symons AL. The effect of a vital bleaching technique on enamel surface morphology and the bonding of composite resin to enamel. Journal of Oral Rehabilitation, 1996 ;23:244–250.

58- Devlin H, Bassiouny MA, Boston D. Hardness of enamel exposed to Coca-Cola and artificial saliva. Journal of Oral Rehabilitation, 2006; 33: 26–30.

59- Joiner A: Review of the effects of peroxide on enamel and dentine Journal of Dentistry, 2007; 3 (5): 889 – 896.

60- Götz H, Duschner H, White DJ, Klukowska MA. Effects of elevated hydrogen peroxide 'strip' bleaching on surface and subsurface enamel including subsurface histomorphology. Journal of Dentistry, 2007; 35: 457-466.

61- Haywood VB, Leech T, Heymann HO, Crumpler D, Bruggers K. Nightguard vital bleaching: effects on enamel surface, textura and diffusion. Quintessence Int. 1990 21 (10):801-4.

62- Spalding M. Estudo "*in Vitro*" do aspecto morfológico da superfície do esmalte e alteração na permeabilidade dentaria apos clareação. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, 2000, 156f.

63- Bitter NC A scanning electron microscope study of the long-term effect of bleaching agents on the enamel surface in vivo. Gen Dent. 1998 ; 46(1): 84-8.

64- McGuckin JF, Babin BJ, Meyer J. Alterations in human enamel surface morphology following bleaching. J. Prosth. 1992; 68(5):754-60, Nov 1992.

65- Cavalli V, Carvalho RM, Giannini M: Influence of carbamide peroxide-based bleaching agents on the bond strength of resin-enamel-dentin interfaces. Brazilian Oral Research, 2005; 19(1): 23-9.

66- Namen FM, Galan Jr J, Cabreira RD. Clareamento Vital. Efeito do peróxido de carbamida sobre o esmalte dental. Disponible en: <http://www.editorasantos.com.br/canalcientifico/artigo013.php?xvar=ultimosartigos.php>. Publicado en 05/2005.

67- Perez Vargas ET AL. Efecto Del peróxido de carbamida sobre el esmalte dentario a diferentes concentraciones y tiempos de exposición (estudio in vitro). Odontol. sanmarquina, 2004; 8(1): 25-29.

68- Shannon H, Spencer P, Gross K, tira D. Characterization of enamel exposed to 10% carbamide peroxide bleaching agents. *Quintessence Int.* 1993; 24(1):39-44.

69- De Medeiros CLSG, González-Lopéz S, Bolaños.Carmona MV, Sanchez-Sanchez P, Bolaños-Carmona J. Effects of phosphoric acid on bovine enamel bleached with carbamide peroxide. *European Journal Oral Science* , 2008; 116: 66-71.

70- Al-Salehi SK, Wood DJ, Hatton PV. The effect of 24 h non-stop hydrogen peroxide concentration on bovine enamel and dentine mineral content and microhardness. *Journal of Dentistry*, 2007; 35(11): 845-50.

71- Giannini M, Silva AP, Cavalli V, Paes Leme AF. Effect of Carbamide peroxide-based bleaching agents containing fluoride or calcium on tensile strength of human enamel. *Journal of Applied Oral Science.* 2006;14(2):82-87.

72- Tam E, Abdool R, El-Badrawy W. Flexural strength and modulus properties of carbamide peroxide – Treated bovine dentin. *Journal Esthetic and Restorative Dentistry*, 2005; 17(6): 359-368.

73- Tam LE, Lim M, Khanna S. Effect of direct peroxide bleach application to bovine dentin on flexural strength and modulus in vitro. *Journal of Dentistry*, 2005; 33: 451–458.

74- Tong LSM, Pang MKM, Mok NYC, King NM, Wei SHI. Effects of etching microabrasion, and bleaching on suface enamel. *Journal of Dental Research*, 1993; 72(1): 67-71.

75- Pinheiro Junior, EC. Ação dos géis clareadores que contêm peróxido de carbamida sobre a microdureza do esmalte humano. USP, 1996: 103p.

76- Unlu N, Obankara FKC, Altino CZ, Zer FO. Effect of home bleaching agents on the microhardness of human enamel and dentin. *Journal of Oral Rehabilitation*, 2004; 31; 57–61.

77- Cavalli V, Giannini M, Carvalho RM. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on tensile strength of human enamel. *Journal of Dentistry*, 2004; 32: 27-34.

78- Attin T, Kielbassa AM, Schwanenberg M, Hellwig E. Effect of fluoride treatment on remineralization of bleached enamel. *Journal Oral Rehabilitation*, 1997 Apr;24(4):282-6

79- Attin T, Vollmer D, Wiegand A, Attin R, Betke H. Subsurfaces microhardness of enamel and dentin after different external bleaching procedures. *American Journal Dentistry*, 2005; 18: 8–12.

80- Attin T, Betke H, Schippan F, Wiegand A. Potential of fluoridated carbamide peroxide gels to support post-bleaching enamel re-hardening. *Journal of Dentistry*, 2007; 35: 755 – 759

81- Basting RT, Rodrigues AL Jr, Serra MC. The effects of seven carbamide peroxide bleaching agents on enamel microhardness over time. *Journal American Dental Association*, 2003; 134(10): 1335-42.

82- Rodrigues JA, Oliveira GPFO, Amaral CM. Effect of thickener agents on dental enamel microhardness submitted to at-home bleaching. *Brazilian Oral Research*, 2007;21(2):170-5.

83- Efeoglu N; Wood D; Efeoglu C. Microcomputerised tomography evaluation of carbamide peroxide 10% applied to enamel. *Journal of Dentistry*.2005; 33: 561–567

84- Efeoglu N, Word DJ, Efeoglu C. Thirty-five percent carbamide peroxide application causes in vitro demineralization of enamel. *Dental Materials*, 2007; 2(3): 900–904.

85- Da Silva AP, Oliviera R, Cavalli V, Arrais CAG, Giannini M, Carvalho RM. Effect of peroxide-based bleaching agents on enamel ultimate tensile strength. *Operative Dentistry* 2005;30:318–24.

86- Zanter C et al. Surface microhardness of enamel after different home bleaching. *Procedures. Dent Mat* 2007; 23: 243-250.

87- Carrasco LD, Fröner IC, Corona SAM, Pecora JD. Effect of internal bleaching agents on dentinal permeability of non-vital teeth: quantitative assessment. *Dental Traumatologic*, 2003; 19: 85-89.

88- Basting RT, Fernandez CF, Ambrosano GMB, Campos IT. Effects of a 10 microhardness of packable c carbamide peroxide bleaching agent on roughness and microhardness of packable composite resins. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 2005; 17 (4): 256-263.

- 89- Mujdeci A, Gokay O. Effect of bleaching agents on the microhardness of tooth-colored restorative materials. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 2006; 95(4): 286-289.
- 90- Kaya AD, Turkun M. Reversal of dentin bonding to bleached teeth. *Operative Dentistry*, 2003;28(6):825-9.
- 91- Garcia-Godoy F, Dodge WW, Donohue M. O'Quinn JA. Composite resin bond strength after enamel bleaching. *Operative Dentistry*, 1993; 18:144-7.
- 92- Bulut H, Turkum M, Kaya AD. Effect o an antioxidizing agent on the shear bond strenth of brackets bonded to bleached human enamel. *American Journal Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2006; 1(29):266-72.
- 93- Türkkahraman H, Adanir N, Günör Y. Bleaching and desensitizer application effects on shear bond strengths of orthodontic brackets. *Angle Orthodontist*, 2007;77(3):489-93
- 94- Turkun S. Clinical evaluation of self-etching and one-bottle adhesive system at two years. *Journal of Dentistry*, 1994; 31(8): 527-534.
- 95- Cavalli V, Reis AF, Giannini M, Ambrosano GM. The effect of elapsed time following bleaching on enamel bond strength of resin composite. *Operative Dentistry*, 2001; 26: 597–602.

96- Santos MG. Avaliação da força de adesão de resina composta sobre esmalte dental bovino previamente clareado com gel de peróxido de carbamida em diferentes concentrações, por meio de teste de microcissalhamento. [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, 2004, 116f.

97- Adibfar A, Steele A, Torneck CD, Tikley KC, Ruse D. Leaching of hydrogen peroxide from bleached bovine enamel. *Journal Endodontic*, 1992; 18(10): 488-91.

98- Dishman MV, Covey DA, Baughan LW. The effect of peroxide bleaching on composite to enamel bond strength. *Dental Materials*, 1994; 10: 33–36.

99- Titley KC, Torneck CD, Ruse ND. The effect of carbamideperoxide gel on the shear bond strength of a microfil resin to bovine enamel. *Journal Dentistry Ressearch*, 1992; 17: 20–24.

100- Cadenaro M, Breschi L, Antonioli F, Mazzoni A, Di Lenarda R. Influence of whitening on the degree of conversion of dental adhesives on dentin. *European Journal Oral Science* 2006; 114:257–262.

101- Machado-Silverio LF, González-López S, González-Rodrigues MP. Descalcification of root canal dentine by citric acid, EDTA and sodium citrate. *Internacional Endodontic Journal*, 2004, 37:365-367.

102- Machado JDS, et al. The influence or time interval between bleaching and enamel bonding. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2007;19(2):111-119.

103- Kum KY, Lim KR, Lee CY, Park KH, Safavi KE, Fouad AF, Spangberg LS. Effects of removing residual peroxide and other oxygen radicals on the shear bond strength and failure modes at resin-tooth interface after tooth bleaching. American Journal Dentistry, 2004;17(4):267-70.

104- Turkey M, Kaya AD. Effect of 10% sodium ascorbate on the shear Bond strength of composite resin to bleached bovine enamel. Journal of Oral Rehabilitation, 2004; 31: 1184-1191.

105-:Faraldos M, Goberna C. Técnicas de Análisis y Caracterización de Materiales. Consejo superior de Investigaciones Científicas. Madrid , 2002; p.844.

106- Izquierdo, MF. Análisis químico: espectroscopia de absorción y emisión atómica / En: Análisis químico: espectroscopia de absorción atómica. Preparación de muestras. Análisis elemental. p. 329-393.

107- _____. Espectrometría de emisión atómica / En: Skoog D, Holles F, Nieman T. Análisis instrumenta. Mexico. Interamericana 1985; p. 245-268.

108- Lacey AL, Álvarez CM. Espectroscopía Infrarroja/ En: Técnicas de Análisis y Caracterización de Materiales. Consejo superior de Investigaciones Científicas. Ed. M Faraldos -C Goberna. Madrid 2002; p.153-187.

109- Servicio de Instrumentación Tecnológica Espectrofotometría Infrarroja. Disponible en http://www.upct.es/~sait/sit/html/recursos_espectrofotometria.htm acceso en 30 de mayo de 2008.

110- Servicios técnicos de Investigación. Espectrometría de Infrarrojo. Disponible en: <http://www.ua.es/es/investigacion/sti/servicios/analisis_instrumental/rayosx_monocristales/infrarroja.html> acceso en 02 de junio de 2008.

111- Microbeam-BWTEK. Espectrómetros y miniespectrómetros Raman. Disponible en: <<http://www.microbeam.es/bwtek/raman.pdf>> Acceso en 02 de junio de 2008.

112- Baddiel CB y col. *Spectrochimica Acta*, 1996; 22: 1407.

113- Chang MCH y col. *Biomaterials*, 2002; 23: 4811.

114- Gopi D y col. *Spectrochimica Acta*, 2008. I

115- Rodriguez- Navarro AB, Romanek CS, Alvarez-Lloret P, Gaines KF. Effect of in ovo exposure to PCBs and Hg on bone chemistry of Clapper Rail from a contaminated salt marsh in coastal Georgia. *Environmental Science and Technology* 40, 4936- 4942 (2006).

116- Kubisz L y col. *Spectrochimica Acta*, 2007; 66, 616.

117- Cullity BD. *Elements of X-ray Diffraction*. Ed. Addison-Wesley. New York, 1977: 555p.

118- Rodriguez Navarro AB. XRD2DScan a new software for polycrystalline materials characterization using two-dimensional X-ray diffraction. *Journal of Applied Crystallography* 2006; 39, 905- 909.

119- Sulieman M, Addy M,* , Macdonald E, Rees JS. The bleaching depth of a 35% hydrogen peroxide based in-office product: a study in vitro. *Journal of Dentistry*, 2005; 33–40.

120- Portolani Jr MV, Candido MSM. Efeito dos agentes clareadores sobre as estruturas dentais. *Revista de Odontologia da UNESP*, 2005; 34(2): 91-94.

121- Araujo JR, Baratierra LM, Vieira LC, Riltter AV. In situ effect of 10% carbamide peroxide on microhardness of human enamel: function of time. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* , 2003; 15(3); 166-174.

122- Leonard H, Teixeira ECN, Garland GE, Ritter AV. Effect on enamel microhardness of two consumer-Available bleaching when compared with a dentist-prescribed, home applied bleaching solution and a control. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 2005; 17(6): 343-350.

123- Rodrigues JA, Marchi GMa, Ambrosano GMB, Heymann HO, Pimenta LA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. *Dental Materials* 2005; 21:1059–1067.

124- Nizam BRH, Lim CT, Chng HK, Yap AUJ. Nanoindentation study of human premolars subjected to bleaching agent. *Journal of Biomechanics* , 2005; 38: 2204–2211.

125- Gultz J, Kaim J, Scherer W, Gupta H. Two in-office systems: a scanning electron microscope study. *Compend Contin Educ Dent*, 1999; 20(10): 965-972.

Anexo

Effects of phosphoric acid on bovine enamel bleached with carbamide peroxide

de Medeiros CLSG, González-López S, Bolaños-Carmona MV, Sanchez-Sanchez P, Bolaños-Carmona J. Effects of phosphoric acid on bovine enamel bleached with carbamide peroxide. *Eur J Oral Sci* 2008; 116: 66–71. © 2008 The Authors. Journal compilation © 2008 Eur J Oral Sci

The aim of this study was to measure the demineralization capacity of 37% phosphoric acid on bovine enamel at different time-points after bleaching with 30% carbamide peroxide. Five, 4 × 4-mm sections were obtained from the enamel of 10 bovine incisors. After applying 30% carbamide peroxide (Vivastyle) for 90 min, specimens were stored in artificial saliva for 0, 24, 72 h, or 7 d and then immersed in 37% phosphoric solution. At 15, 30, 60, 90, and 120 s, 5-ml aliquots were extracted. A control group of specimens was not bleached. Ca²⁺ concentrations were measured by atomic absorption spectrophotometry. A larger amount of Ca²⁺ was extracted from enamel by phosphoric acid after the application of 30% carbamide peroxide. Twenty-four hours after bleaching, significantly more Ca²⁺ was extracted from bleached than from control specimens at all time-points, and this greater susceptibility to the action of the acid persisted for at least 1 wk after bleaching.

Carmen L. S. G. de Medeiros¹, Santiago González-López², María V. Bolaños-Carmona³, Purificación Sanchez-Sanchez⁴, Jorge Bolaños-Carmona⁵

¹Department of Restorative Dentistry, University of Paraíba, Campina Grande, Brasil; ²Department of Pathology and Dental Therapeutics, University of Granada, Granada, Spain; ³Department of Integrated Pediatric Dentistry, University of Granada, Granada, Spain; ⁴Department of Inorganic Chemistry, University of Granada, Granada, Spain; ⁵Department of Statistics and Operational Research, University of Granada, Granada, Spain

Dr Santiago González López, Department of Pathology and Dental Therapeutics, Faculty of Dentistry, University of Granada, Campus de Cartuja, E, 18071, Granada, Spain

Telefax: +34-958-240908
 E-mail: sgllopez@ugr.es

Key words: 30% carbamide peroxide; decalcifying; enamel acid etching; phosphoric acid; spectrophotometry

Accepted for publication September 2007

Bleaching treatment is considered as a safe and non-destructive treatment for the removal of tooth discolorations. However, despite its widespread use, there is no general agreement about the effect of bleaching agents on enamel. Some researchers observed no evidence of deleterious effects on enamel or dentine after the longest applications of the highest concentrations of hydrogen peroxide that are used in tooth bleaching procedures (35% for 30 min) (1). However, numerous *in vitro* studies have reported that bleaching therapies have a negative effect on the physical properties, marginal integrity, enamel and dentin bond strength, and color of restorative materials (2).

Carbamide peroxide may cause demineralization in enamel. The Ca²⁺ loss derives from demineralization to a depth of 50 µm below the enamel surface, with no damage to deeper enamel surfaces (3). Local changes in enamel microstructure (similar to observations in initial caries), and a lower Ca:P ratio in bleached vs. non-bleached enamel, were observed after treatment with carbamide peroxide (4).

Bleaching-induced structural changes to surface enamel have been reported to be proportionally more severe with longer treatment times and higher hydrogen peroxide concentrations (5). POTOČNIK *et al.* (4) considered that 10% carbamide peroxide probably does not cause sufficient loss to affect the microhardness of the enamel. Nevertheless, most authors agree that bleaching-induced loss of mineral content from the outer tooth structure significantly reduces enamel microhardness (6, 7).

There have been reports of a reduction in the bond strength of adhesive restorations and resin-bonded brackets after tooth bleaching (8, 9), with a greater reduction occurring at higher concentrations of the bleaching agent (10). Spectral changes in the hydroxy-apatite structure indicated a certain degree of enamel destruction after storage of enamel specimens in sterile isotonic salt solution, with no tendency to spontaneous reversibility (5). On the other hand, weakening of the composite-resin bond on freshly bleached enamel has been shown to be transient (9, 11, 12). Moreover, anti-oxidant treatment and artificial saliva immersion were shown to be effective in recovering shear bond strength (9). Nevertheless, the most frequent recommendation is for a minimum interval of 1–3 wk between bleaching and bonding (2).

Many patients need conservative or esthetic treatments that require a combination of tooth bleaching and enamel acid etching. It has been reported that acid etching of a bleached enamel surface produces loss of prismatic shape and gives the surface an overetched appearance (13).

The decalcifying power of phosphoric acid in adhesive dentistry might be affected by the decreased Ca²⁺ and phosphate contents of the enamel and by the morphological changes induced by hydrogen peroxide or hydrogen peroxide-releasing agents. The null hypothesis of the present study was that bleaching treatment with 30% carbamide peroxide does not modify the decalcifying ability of phosphoric acid in enamel acid etching.

Atomic absorption spectrophotometry was used to evaluate the influence of 30% carbamide peroxide on the decalcifying effects of 37% phosphoric acid immediately after etching and at 24 h, 72 h, and 7 d thereafter.

Material and methods

Ten bovine incisors extracted from jaws supplied by an industrial slaughterhouse were stored in distilled water containing thymol crystals until use. The roots of all teeth were cut off at the cemento-enamel junction using an Accutom-50 diamond cutter (Accutom Hard Tissue Microtome; Struers, Ballerup, Denmark). Crowns were polished with silicon carbide paper discs on a polisher (Exakt-Apparatebau D-2000; Vertriebs GMBH, Norderstedt, Germany) to obtain a flat vestibular surface, and each crown was then cut into five equally-sized 4 × 4 mm sections (sample specimens) using a preprogrammed Accutom 50 microtome (Struers). After polishing the inner surface to remove the dentin, sample specimens were weighed on a Sartorius BL60S precision balance (accuracy of ± 0.1 mg; Sartorius, Mugió, Italy). Maximum weight equality among specimens was achieved by reducing weight, when necessary, with silicon carbide paper discs of 600 grit (WS 18-B; Struers), always removing from the inner surface of the section to avoid modifying its geometry. By this means, each crown yielded five sections with the same calcification, geometry, and weight. An Olympus stereoscopic microscope (Olympus Optical España, Barcelona, Spain) was used to verify that all exposed surfaces were enamel.

One sample specimen from each crown was assigned to each of five groups: group 1, no bleaching agent (control group); and groups 2, 3, 4, and 5, bleached with 30% carbamide peroxide for 90 min. Groups 3–5 were stored in artificial saliva for 24 h, 72 h, or 7 d, respectively.

Specimens were immersed in 30% carbamide peroxide (30% Vivastyle) (JL-1014 Exp05-2008) for 90 min, changing all of the gel every 30 min as per the manufacturer's instructions. Specimens were abundantly washed with water, dried with absorbent paper and kept in artificial saliva (Table 1) within an oven at 37°C for the specified time-period (24 h, 72 h or 7 d). Group 2 specimens were not kept in artificial saliva and were immersed in 37% phosphoric acid solution immediately after bleaching. The 37% phosphoric acid solution was prepared by dissolving 311 ml of 85% orthophosphoric acid (Scharlan Cemise SA, Barcelona, Spain) at a concentration of 1.71 g ml⁻¹ in 689 ml of distilled water to obtain 1,000 ml of 37% acid solution with a pH of 0.14, measured by means of a Micro pH 2000 pH meter (Crisol, Alella, Spain).

Table 1

Artificial saliva formula used in the study

Composition	Amount
Calcium chloride	0.21 g
Potassium chloride	4.8 g
Sodium chloride	3.4 g
Magnesium chloride	0.27 g
Potassium phosphate	1.32 g
Sodium benzoate	1 g
Sodium carboxymethylcellulose	25 g
Sorbitol	120 g
Distilled water	4,850 ml

A blank 30 ml sample of phosphoric acid solution was first prepared to determine the Ca²⁺ levels in the absence of specimen. All control and experimental specimens underwent the same experimental procedure [i.e. immersion in the acid phosphoric solution and constant agitation using a magnetic multi-stirrer (A-09 series C, SBS; Barcelona, Spain) to homogenize the Ca²⁺ extracted into the solution. At 15, 30, 60, 90, and 120 s, 5 ml aliquots were extracted using a calibrated micropipette that was replaced after each extraction. These extracts were placed in hermetically sealed and labeled glass tubes. By this means, five extracts were obtained for each specimen.

The Ca²⁺ concentration in solutions was determined by atomic absorption spectrophotometry (Perkin Elmer mod. 5100ZL, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) using the flame technique (14). Extract readings were expressed in p.p.m. and subsequently transformed into mg of Ca²⁺ lost per g by applying the following formula, as described previously (14):

$$\text{mg Ca}^{2+} = [(\text{p.p.m. Ca}^{2+}) \cdot 10^{-3} / \text{ml} \cdot \text{V}] / \text{W}$$

V = volume; W = weight.

Statistical analysis

A three-way analysis of variance (ANOVA) was used to explore the relationships among bleaching treatment, acid exposure, and extracted calcium, followed by a two-way ANOVA and post-hoc Tukey's test. A *P*-value of < 0.05 was considered to represent statistical significance.

Results

Table 2 shows the cumulative amounts of Ca²⁺ extracted after subtracting the amount of Ca²⁺ in the study solution without specimen (blank = 0.38 p.p.m.). The three-way ANOVA (bleaching, acid exposure time, and sample) showed significance for differences among experimental groups (*F* = 6.36, *P* < 0.001) and acid exposure times (*F* = 60.58, *P* < 0.001).

Because the interactions were significant, the behavior with each treatment was studied as a function of the etching time. Using the same procedure, it was also observed that the amount of Ca²⁺ extracted for each acid application time varied among experimental groups, but the differences were not significant.

Enamel specimens bleached with 30% carbamide peroxide lost more Ca²⁺ during etching with 37% phosphoric acid compared with non-bleached specimens for all etching time-periods studied (Fig. 1). The amount of Ca²⁺ extracted from bleached specimens increased with longer etching time. The highest rate of Ca²⁺ extraction was observed during the first 30 s. Ca²⁺ was extracted at a constant rate during subsequent 30 s periods. The amount of Ca²⁺ extracted differed significantly among all etching time-periods studied.

Observation of the behavior of each experimental group in relation to the length of their exposure to 37% phosphoric acid showed similar demineralization kinetics between control and bleached groups. In the control group, significant differences were observed between

Table 2

Description and comparison of the accumulated amount of calcium extracted in each treatment group as a function of acid exposure time

Bleaching treatment	Acid exposure time				
	15 s	30 s	60 s	90 s	120 s
Control	0.519 (0.309) A	0.648 (0.359) A	1.007 (0.506) B	1.360 (0.598) C	1.810 (0.751) D
B-E: 0 h	0.659 (0.297) A	0.898 (0.384) A	1.443 (0.684) B	1.977 (0.793) C	2.496 (0.907) D
B-E: 24 h	0.663 (0.365) A	0.954 (0.425) A	1.620 (0.696) B	2.166 (0.952) C	2.825 (1.269) D
B-E: 72 h	0.788 (0.439) A	1.041 (0.549) A	1.694 (0.943) B	2.220 (1.091) B	2.998 (1.515) C
B-E: 7 d	0.675 (0.303) A	1.004 (0.484) A/B	1.586 (0.781) B/C	2.138 (1.110) C	2.799 (1.370) D

Rows show the comparison among median values of calcium extracted during different exposure times in each group, and the results are expressed as mean (standard deviation). Values with the same upper case letters belong to homogeneous groups. Values with different upper case letters differ significantly ($P < 0.05$). B-E, bleaching-etching.

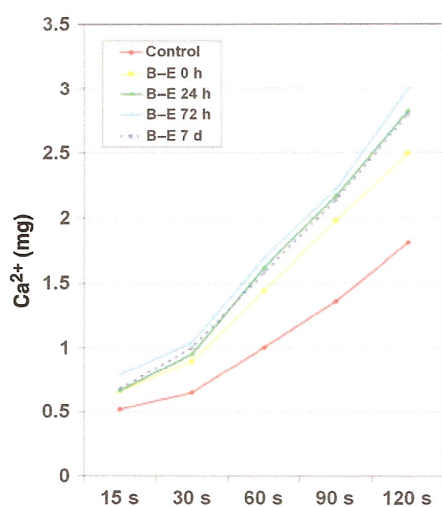


Fig. 1. Plot of mean accumulative extracted Ca^{2+} (mg) against acid exposure time in experimental bleaching groups. B-E, bleaching-etching group.

exposure for 15 and for ≥ 60 s. After 60 s, a similar increase in extracted Ca^{2+} was observed for each time-period.

Analyses were conducted of the etching time required for significant differences to be found in the amount of Ca^{2+} extracted between bleached and non-bleached specimens (Table 3). The group etched immediately after bleaching showed a greater susceptibility to a 90 s etching period, with a significantly larger amount of extracted Ca^{2+} vs. unbleached specimens. In the group etched 24 h after bleaching, the amount of extracted Ca^{2+} was already significantly higher vs. controls after 30 s of immersion, and in the group etched 72 h after bleaching, only 15 s of immersion was required for this difference to be observed. This greater susceptibility to the action of the acid was still evident 1 wk after bleaching.

Discussion

Although tooth bleaching is considered by some researchers to be comparatively safe (15), microstruc-

Table 3
Comparison of calcium extracted in bleaching groups as a function of acid exposure time

Bleaching treatment	Acid exposure time				
	15 s	30 s	60 s	90 s	120 s
Control					
B-E: 0 h	NS	NS	NS	*	NS
B-E: 24 h	NS	*	**	**	**
B-E: 72 h	**	**	**	**	***
B-E: 7 d	NS	**	*	**	**

NS, not significant.

Columns show the significance of differences in extracted calcium between the bleaching-etching (B-E) treatment group and unbleached controls for each acid exposure time.

* $P < 0.05$; ** ≤ 0.01 ; *** < 0.001 .

Mean (standard deviation) values are given in Table 2.

tural changes to dental hard tissue have been observed in numerous studies after the application of high concentrations of bleaching agents (16).

Published studies have supported the use of bovine teeth as a reliable substitute for human teeth in microleakage (17) and adhesion tests on enamel and dentin (18–21), in which comparable bond strength measurements were obtained using bovine or human teeth. Observations using scanning electron microscopy (SEM) revealed the similar morphology of bovine and human teeth, and of their enamel, after etching with 35% H_3PO_4 (21). Although bovine enamel undergoes faster demineralization than human enamel (22) and suffers greater erosion and erosion-abrasion (23), it has been described as a suitable substitute for using to evaluate enamel demineralization (24). Bovine enamel was used in the present study because a histologically similar group of teeth can be more readily obtained and five equal-sized enamel sections can be cut from a single bovine tooth, unlike in human teeth, enhancing comparison conditions.

Different techniques have been applied to assess the effect of bleaching agents on enamel, for example microhardness tests (4, 6), transversal microradiography (25), electron probe microanalysis (4), microcomputed tomography (3), infrared spectrophotometry (IR), and

physiological range (41). The artificial saliva used in this study contained levels of electrolytes similar to those found in human saliva for remineralization of enamel and its pH was neutral to prevent demineralization. It also contained sodium carboxymethylcellulose as a thickener and stabilizer, and sodium benzoate as an antiseptic.

In the present study, all bleached groups, except for group 2, were stored in artificial saliva at 37°C before etching in order to promote remineralization of the specimens. However, the postetching calcium losses were not lower in saliva-stored than in non-saliva-stored groups. The null hypothesis of our study must be rejected; it appears advisable not to perform any aesthetic conservative treatment until the effects of the bleaching agent are fully neutralized.

Within the limitations of our *in vitro* study, we can conclude, from the results obtained, that previous bleaching with 30% carbamide peroxide increases the amount of Ca²⁺ extracted from enamel by etching with phosphoric acid. The highest amount is lost at 24 h of bleaching. This greater susceptibility to the action of the acid persists for at least 1 wk after bleaching.

References

- SULIEMAN M, ADDY M, MACDONALD E, REES JS. A safety study in vitro for the effects of an in-office bleaching system on the integrity of enamel and dentine. *J Dent* 2004; **32**: 581–590.
- ATTIN T, HANNIG C, WIEGAND A, ATTIN R. Effect of bleaching on restorative materials and restorations – a systematic review. *Dent Mater* 2004; **20**: 852–861.
- EFOGLU N, WOOD D, EFOGLU C. Microcomputerized tomography evaluation of 10% carbamide peroxide applied to enamel. *J Dent* 2005; **33**: 561–567.
- POTOČNIK I, KOSEK L, GAŠPERŠIČ D. Effect of 10% carbamide peroxide bleaching gel on enamel microhardness, microstructure, and mineral content. *J Endod* 2000; **26**: 203–206.
- BISTEY T, NAGY IP, SIMÓ A, HEGEDUS C. In vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel. *J Dent* 2007; **35**: 325–330.
- ZANTNER C, BEHEIM-SCHWARZBACH N, NEUMANN K, KIELBASSA AM. Surface microhardness of enamel after different home bleaching procedures. *J Dent Res* 2007; **23**: 243–250.
- ATTIN T, VOLLMER D, WIEGAND A, ATTIN R, BETKE H. Sub-surfaces microhardness of enamel and dentin after different external bleaching procedures. *Am J Dent* 2005; **18**: 8–12.
- GARCIA-GODOY F, DODGE WW, DONOHUE M, O'QUINN JA. Composite resin bond strength after enamel bleaching. *Oper Dent* 1993; **18**: 144–147.
- BULUT H, TURKUM M, KAYA AD. Effect of an antioxidizing agent on the shear bond strength of brackets bonded to bleached human enamel. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006; **129**: 266–272.
- TURKUN M, KAYA AD. Effect of 10% sodium ascorbate on the shear bond strength of composite resin to bleached bovine enamel. *J Oral Rehabil* 2004; **31**: 1184–1191.
- MILES PG, PONTIER J, BAHIRAEA D, CLOSE J. The effect of carbamide peroxide bleach on the tensile bond strength of ceramic brackets: an in vitro study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1994; **106**: 371–375.
- MCGUCKIN RS, THURMOND BA, OSOVITZ S. Enamel shear bond strengths after vital bleaching. *Am J Dent* 1992; **5**: 216–222.
- JOSEY AL, MEYERS IA, ROMANIUK K, SYMONS AL. The effect of a vital bleaching technique on enamel surface morphology and the bonding of composite resin to enamel. *J Oral Rehabil* 1996; **23**: 244–250.
- GONZÁLEZ-LÓPEZ S, CAMEJO-AGUILAR D, SANCHEZ-SANCHEZ P, BOLAÑOS CARMONA V. Effect of CHX on the decalcifying effect of 10% citric acid, 20% citric acid, or 17% EDTA. *J Endod* 2006; **32**: 781–784.
- DADOUN MP, BARTLETT DW. Safety issues when using carbamide peroxide to bleach vital teeth – a review of the literature. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 2003; **11**: 9–13.
- DAHL JE, PALLESEN U. Tooth bleaching – a critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; **14**: 292–304.
- REEVES GW, FITCHIE JG, HEMBREE JH JR, PUCKETT AD. Microleakage of new dentin bonding systems using human and bovine teeth. *Oper Dent* 1995; **20**: 230–235.
- SALEH F, TAYMOUR N. Validity of using bovine teeth as a substitute for human counterparts in adhesive tests. *East Mediterr Health J* 2003; **9**: 201–207.
- FOWLER CS, SWARTZ ML, MOORE BK, RHODES BF. Influence of selected variables on adhesion testing. *Dent Mater* 1992; **8**: 265–269.
- SCHILKE R, BAUSS O, LISSON JA, SCHUCKAR M, GEURTSSEN W. Bovine dentin as substitute for human dentin in shear bond strength measurements. *Am J Dent* 1999; **12**: 92–96.
- REIS AF, GIANNINI M, KAVAGUCHI A, SOARES CJ, LINE SR. Comparison of microtensile bond strength to enamel and dentin of human, bovine, and porcine teeth. *J Adhes Dent* 2004; **6**: 117–121.
- FEATHERSTONE JD, MELLBERG JR. Relative rates of progress of artificial carious lesion in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res* 1981; **15**: 109–114.
- ATTIN T, WEGEHAUPT F, GRIES D, WIEGAND A. The potential of deciduous and permanent bovine enamel as substitute for deciduous and permanent human enamel: erosion-abrasion experiments. *J Dent* 2007; **35**: 773–777.
- MELLBERG JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Dent Res* 1992; **71**: 913–919.
- BIZHANG M, SEEMANN R, DUVE G, RÖMHILD G, ALTENBURGER MJ, JAHN KR, ZIMMER S. Demineralization effects of 2 bleaching procedures on enamel surfaces with and without post-treatment fluoride application. *Oper Dent* 2006; **31**: 705–709.
- CIMILLA H, PAMEIJER CH. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on the physical properties and chemical composition of enamel. *Am J Dent* 2001; **14**: 63–66.
- ROSTSTEIN I, DANKNER E, GOLDMAN A, HELING I, STABHOLZ A, ZALKIND M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *J Endod* 1996; **22**: 23–25.
- HANNIG C, HAMKENS A, BECKER K, ATTIN R, ATTIN T. Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. *Arch Oral Biol* 2005; **50**: 541–552.
- BUCHALLA W, ATTIN T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser. A systematic review. *Dent Mater* 2007; **23**: 586–596.
- PINHEIRO JUNIOR EC, FIDEL RA, DA CRUZ FILHO AM, SILVA RG, PECORA JD. In vitro action of various carbamide peroxide gel bleaching agents on the microhardness of human enamel. *Braz Dent J* 1996; **7**: 75–79.
- MCCRACKEN MS, HAYWOOD VB. Demineralization effects of 10 percent carbamide peroxide. *J Dent* 1996; **24**: 395–398.
- GÖTZ H, DUSCHNER H, WHITE DJ, KLUKOWSKA MA. Effects of elevated hydrogen peroxide 'strip' bleaching on surface and subsurface enamel including subsurface histomorphology. *J Dent* 2007; **35**: 457–466.
- LAI SCN, TAY FR, CHEUNG GSP, MAK YF, CARVALHO RM, WEI SHY, TOLEDANO M, OSORIO R, PASHLEY DH. Reversal of compromised bonding in bleached enamel. *J Dent Res* 2002; **81**: 477–481.
- PASHLEY DH, TAY FR. Aggressiveness of contemporary self-etching adhesives. Part II. Etching effects on unground enamel. *Dent Mater* 2001; **17**: 430–444.
- WATTANAPAYUNGKUL P, YAP AU. Effects of in-office bleaching products on surface finish of tooth-colored restorations. *Oper Dent* 2003; **28**: 15–19.

36. TITLEY KC, TORNECK CD, RUSE ND. The effect of carbamide-peroxide gel on the shear bond strength of a microfil resin to bovine enamel. *J Dent Res* 1992; **17**: 20–24.
37. DISHMAN MV, COVEY DA, BAUGHAN LW. The effect of peroxide bleaching on composite to enamel bond strength. *Dent Mater* 1994; **10**: 33–36.
38. SUNDFELD RH, BRISO ALF, DE SÁ PM, SUNDFELD MLMM, BEDRAN-RUSSO AKB. Effect of time interval between bleaching and bonding on tag formation. *Bull Tokyo Dent Coll* 2005; **46**: 1–6.
39. ATTIN T, KIELBASSA AM, SCHWANENBERG M, HELLWING E. Effect of fluoride treatment on remineralization of bleached enamel. *J Oral Rehabil* 1997; **24**: 282–286.
40. DE FREITAS PM, BASTING RT, RODRIGUEZ AL, SERRA MC. Effect of 10% carbamide peroxide bleaching agents on dentin microhardness at different time intervals. *Quintessence Int* 2002; **33**: 370–375.
41. LEUNG VW, DARVELL BW. Artificial salivas for in vitro studies of dental material. *J Dent* 1997; **25**: 475–484.

