



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA

TESIS DOCTORAL
Efectos microquímicos del peróxido de hidrógeno
de alta concentración y el ácido fosfórico sobre la
capa superficial y subsuperficial del esmalte bovino

Carolina Torres Rodríguez
Granada
2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Carolina Torres Rodríguez
D.L.: GR 2928-2010
ISBN: 978-84-693-2534-6

**Efectos microquímicos del peróxido de hidrógeno de
alta concentración y del ácido fosfórico sobre la
capa superficial y subsuperficial del esmalte bovino**

Carolina Torres Rodríguez
**Memoria de Tesis Doctoral para optar al Grado de
Doctor**

Directores

Santiago González López
Profesor Titular Departamento de Patología y Terapéutica Dental
Facultad de Odontología
Universidad de Granada

María Purificación Sánchez Sánchez
Profesora Titular Departamento de Química Inorgánica
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

Alejandro Rodríguez Navarro
Profesor Titular Departamento de Mineralogía y Petrología
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

Efectos microquímicos del peróxido de hidrógeno de alta concentración y del ácido fosfórico sobre la capa superficial y subsuperficial del esmalte bovino

Miembros del Tribunal

Presidente

María Domingo García

Catedrática

Departamento de Química Inorgánica

Facultad de Ciencias

Universidad de Granada

Secretario

Pedro Álvarez Lloret

Contratado Posdoctoral

Departamento de Mineralogía y Petrología

Facultad de Ciencias

Universidad de Granada

Vocales

Annette Wiegand

Professor Assistant

Department for Preventive Dentistry, Periodontology and Cariology

Center for Dental Oral Medicine and Maxillofacial Surgery

University of Zürich

Laura Ceballos García

Profesora Titular

Departamento de Estomatología

Facultad de Odontología

Universidad Rey Juan Carlos I Madrid

Benjamín Martín Biedma

Profesor Titular

Departamento de Patología y Terapéutica Dental

Facultad de Odontología

Universidad Santiago de Compostela

*Con toda
mi gratitud a Dios y a mi familia*

Tesis revisada y corregida por:

Giuseppe Falini

Alma Mater Studiorum Università di Bologna (Italy)

Paulo João B. T de Durão Mauricio

Instituto Superior de Ciências da Saude (Portugal)

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	9
RESUMEN/SUMMARY	13
LISTA DE TABLAS	27
LISTA DE FIGURAS.....	31
LISTA DE ANEXOS	37
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....	39
1. INTRODUCCION.....	41
1.1 Esmalte.....	41
1.1.1 Definición.....	41
1.1.2 Amelogénesis	41
1.1.3 Composición y organización estructural	43
1.1.3.1 Fase inorgánica	43
1.1.3.2 Fase orgánica	46
1.1.4 Mineralización del esmalte.....	48
1.2 Blanqueamiento dental	52
1.2.1 Agentes blanqueadores.....	52
1.2.1.1 Peróxido de hidrógeno.....	52
1.2.1.2 Peróxido de carbamida	53
1.2.1.3 Perborato sodio.....	54
1.2.1.4 Clorito de sodio	54
1.2.1.5 Otros agentes.....	55
1.2.2 Tipos de blanqueamiento.....	56
1.2.2.1 Blanqueamiento de dientes vitales.....	56
1.2.2.2 Blanqueamiento de dientes no vitales	56
1.2.3 Protocolos de blanqueamiento	56
1.2.3.1 Blanqueamiento en consultorio	57
1.2.3.2 Blanqueamiento domiciliario	57
1.2.3.3 Blanqueamiento combinado	57
1.2.4 Efectos de los agentes blanqueadores sobre los tejidos.....	58
1.2.4.1 Esmalte	58
1.2.4.2 Dentina.....	61
1.2.4.3 Pulpa.....	62
1.2.5 Efectos de los agentes blanqueadores sobre la resistencia de unión a los materiales restaurativos	63

1.2.5.1	Al Esmalte.....	64
1.2.5.2	A la Dentina	66
1.3	Desmineralización del esmalte	67
1.3.1	Desmineralización por ácido fosfórico.....	67
1.3.2	Desmineralización por agentes blanqueadores.....	68
1.4	Remineralización.....	69
2.	OBJETIVOS	75
2.1	General.....	75
2.1	Específicos	75
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	79
3.1	Selección de la muestra.....	79
3.2	Obtención de la muestra.....	79
3.3	Tratamiento de la muestra	81
3.3.1	Ensayo 1: Efecto del peróxido de hidrógeno y el ácido fosfórico de alta concentración sobre la capa superficial y subsuperficial de esmalte bovino	83
3.3.1.1	Parte I	83
3.3.1.2	Parte II.....	87
3.3.2	Ensayo 2: Análisis microquímico del efecto del ácido fosfórico sobre esmalte bovino	88
3.3.3	Ensayo 3: Análisis microquímico del efecto del peróxido de hidrógeno sobre esmalte bovino.....	89
3.3.4	Ensayo 3: Análisis microquímico del efecto del peróxido de hidrógeno y el ácido fosfórico sobre esmalte bovino.....	90
3.4	Técnicas analíticas empleadas	92
3.4.1	Espectrometría de absorción atómica (EAA)	92
3.4.2	Espectroscopia infrarroja (IR)	96
3.4.3	Espectroscopia Raman	109
3.4.4	Área superficial, textura y distribución porosa ..	116
3.5	Análisis estadístico.....	122
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	125
4.1	Ensayo 1: Efecto del peróxido de hidrógeno y el ácido fosfórico de alta concentración sobre la capa superficial y subsuperficial de esmalte bovino	127
4.1.1	Parte I.....	127
4.1.2	Parte II.....	133

4.2 Ensayo 2: Análisis microquímico del efecto del ácido fosfórico sobre esmalte bovino	141
4.2.1 Análisis por Absorción atómica.....	141
4.2.2 Análisis por IR.....	142
4.2.3 Análisis por Raman.....	147
4.2.4 Análisis por adsorción de N ₂ y CO ₂	148
4.2.5 Análisis por SEM	151
4.3. Ensayo 3: Análisis microquímico del efecto del peróxido de hidrógeno sobre esmalte bovino	155
4.3.1 Análisis por absorción atómica.....	155
4.3.2 Análisis por IR.....	156
4.3.3 Análisis por adsorción de N ₂ y CO ₂	161
4.3.4 Análisis por SEM	163
4.4 Ensayo 4: Análisis microquímico del efecto del peróxido de hidrógeno y el ácido fosfórico sobre esmalte bovino	169
4.4.1 Análisis por absorción atómica.....	169
4.4.2 Análisis por IR.....	171
4.4.3 Análisis por adsorción de N ₂ y CO ₂	179
4.4.5 Análisis por SEM	181
5. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS.....	191
APLICACIONES CLÍNICAS.....	199
PROYECTOS FUTUROS	203
BIBLIOGRAFÍA	207
ANEXOS.....	225

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su presencia viva en cada momento de mi vida.

A mi familia, mi madre, mi padre, mi hermano y su familia, mis tías, por su amor, su presencia a pesar de la distancia y su apoyo incondicional en todo momento.

A mis directores, Dra. María Purificación Sánchez Sánchez una de mis mejores "Maestras", todo mi reconocimiento, admiración, respeto y cariño. Dr. Santiago González López, mi más sincero agradecimiento por su apoyo y por creer en mí y creer en mi tierra Colombia. Dr. Alejandro Rodríguez Navarro, por su colaboración desinteresada, su disposición, su generosidad, sus valiosas enseñanzas y aportes.

A mis asesores, Dra. María Victoria Bolaños Carmona, por su valiosa colaboración y asesoría estadística, por su alegría y buen humor. Dr. Pedro Álvarez Lloret, por su disposición, su gran espíritu de cooperación y dinamismo. Dra. María Domingo García por su colaboración, paciencia y sus didácticas reuniones y enseñanzas.

A mis asesores en la Universidad de Zürich, Dr. Thomas Attin, por su atención, paciencia, disposición, colaboración y sus valiosos aportes. Dra. Annette Wiegand, por su participación en el proyecto, sus aportes y colaboración.

A los técnicos, Yudi Gómez (Responsable Laboratorio de Investigación Facultad de Odontología UGR), Bendición Funes (T.S Absorción atómica y Granulometría, Centro de Instrumentación Científica UGR), Alicia González Segura (T.S Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo UGR) muchas gracias por su colaboración.

Beatrice Sener, Willi Bucher, Denisa, Susi, Priska, Claudia y a todos los compañeros del Laboratorio de Investigación

Departamento PPK Facultad de Odontología Universidad de Zürich. Mil gracias por sus enseñanzas y su buena disposición.

José López Porras (Técnico Especialista Biblioteca, Archivo y Museos), Encarnación Garrido (Técnico Especialista en Biblioteca), María Sol Garrido (Técnico Especialista en Biblioteca), Rafael Jesús Olivares (Bibliotecario Jefe del Servicio) Biblioteca Colegio Máximo Universidad de Granada, por su generosa ayuda en la adquisición del material bibliográfico, por su capacidad de servicio y por las tertulias alrededor de un buen café.

A mis compañeros del Laboratorio de Investigación de Química Inorgánica, Antonio Mota por su aporte gráfico de la molécula de hidroxapatito, José Ruiz, Juan Manuel Herrera, Natividad Gálvez, Antonio Rodríguez, Ana Belén, Belén, María Ángeles y Elsa, mil gracias por todo, porque me hicieron sentir una más de ustedes.

A mis buenos amigos, que siempre estuvieron a mi lado, por su compañía, su gran apoyo, su afecto, su colaboración, su alegría, su lealtad y su amor fraternal. Por aquellos que siempre creyeron y siguen creyendo en mí. Muchas gracias.

Hago un especial reconocimiento a Juan Manuel Arias, por su desinteresada colaboración en el diseño de la portada y la edición de este documento.

A los miembros del Consejo de la Facultad de Odontología la Universidad Nacional de Colombia, período 2006-2010, por toda su colaboración durante este proceso, por la tramitación de todos los documentos que necesité para la aprobación y renovación de mi "Comisión Especial de Estudios". No los defraudé

A la Universidad Nacional de Colombia, Institución a la que le debo mi formación profesional, docente e investigadora. Gracias por concederme esta gran oportunidad.

A la Universidad de Granada, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios doctorales.

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue estudiar los efectos sobre el esmalte dental que tienen diferentes agentes químicos usados en la práctica dental para tratamientos restaurativos y cosméticos. Se han diseñado una serie de protocolos experimentales, usando esmalte bovino en polvo y fraccionado como material de estudio y soluciones de ácido fosfórico y peróxido de hidrógeno como agentes químicos. Se han evaluado la acción de estos agentes químicos sobre el esmalte a través del análisis de la composición y las alteraciones de superficie a través de diferentes técnicas analíticas.

Los objetivos específicos de este estudio fueron: 1) Cuantificar por espectroscopia de absorción atómica (EAA), la cantidad de calcio extraído de la superficie y subsuperficie de esmalte bovino (a diferentes profundidades: 0, 25, 50, 100 μ), tratado primero con peróxido de hidrógeno (PH) seguido de ácido fosfórico (AF) a diferentes concentraciones y tiempos de aplicación. 2) Estudiar el efecto del tratamiento del esmalte con peróxido de hidrógeno, ácido fosfórico, o ambos secuencialmente sobre la composición y microestructura de la superficie, usando diferentes técnicas analíticas. Específicamente, se usaron espectroscopia de absorción atómica (EAA) y transformada con Fourier (FTIR), isotermas de nitrógeno y dióxido de carbono y microscopía electrónica de barrido (SEM).

El primer objetivo se desarrolló en dos ensayos experimentales. En el primero se usaron tres fracciones iguales de superficie de esmalte (16 mm²) extraídas de cada diente bovino. Un espécimen de cada corona fue asignado a uno de los tres grupos experimentales (n=10): Grupo 1 (grupo control) no expuesto a ningún agente blanqueador. Grupo 2, blanqueado con solución de peróxido de hidrógeno al 38% durante 20 minutos y grupo 3, peróxido de hidrógeno al 30% durante 60 minutos. Después de 24 horas de tratamiento, los especímenes fueron medidos en su espesor y sumergidos en solución de ácido fosfórico al 37%. Posteriormente se tomaron alícuotas a los 30 y 60 segundos.

Luego fueron desgastados 25 micras en profundidad e inmersos nuevamente en solución de ácido fosfórico al 37%. Este mismo procedimiento fue repetido a las profundidades de 50 y 100 micras. Las concentraciones de calcio recogidas en las alícuotas fueron determinadas por espectroscopia de absorción atómica. En el segundo ensayo experimental, se realizaron los mismos procedimientos con diferentes grupos: Grupo I (control) sin agente blanqueador; Grupo II, blanqueado con PH durante 72 horas continuas y Grupo III, PH 38.5% durante 72 horas continuas.

Para desarrollar el segundo objetivo se usaron, tanto muestras fragmentadas como en polvo. Se llevaron a cabo tres tipos de experimentos, en los cuales las muestras de esmalte fueron expuestas a peróxido de hidrógeno (a); ácido fosfórico (b) o ambos secuencialmente (c). Tratamiento a: a1) Esmalte fragmentado tratado con AF (37%) y a2) polvo de esmalte (150-200 μ) tratado con AF (0,1%). Ambos tipos de muestras se trataron con disolución ácida incrementando los intervalos de tiempo entre 1 a 1440 minutos. Tratamiento b: las muestras de esmalte fueron tratadas con PH (30%) a diferentes intervalos de tiempo 5, 20, 60, 90 y 120 minutos. Tratamiento c: las muestras de esmalte fueron primero expuestas al PH (30%) durante los mismos intervalos de tiempo y posteriormente fueron expuestas al AF durante 30 segundos y 5 minutos. Los cambios químicos que ocurrieron al progresar los experimentos fueron analizados por AAS y FTIR. Las modificaciones de la superficie fueron estudiadas mediante SEM e isothermas de N₂ y CO₂ a 77 y 273 K respectivamente.

A continuación, se resumen los resultados principales de los diferentes ensayos experimentales:

ENSAYO 1 EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO DE ALTA CONCENTRACIÓN Y ÁCIDO FOSFÓRICO SOBRE LA SUPERFICIE Y SUBSUPERFICIE DE ESMALTE BOVINO

Experimentos a corto tiempo de exposición (20 y 60 minutos)

No se encontraron diferencias significativas en las cantidades de calcio total extraído entre los especímenes blanqueados y no blanqueados ($F= 0,142$; $p=0.869$). La cantidad de calcio extraído fue similar a lo largo de los cuatro niveles de profundidad en tanto los especímenes no blanqueados y blanqueados con PH al 30%. La mayor cantidad de calcio fue movilizada de la subsuperficie del esmalte (25 μm de profundidad) más que en otras profundidades en los especímenes tratados con PH 38%.

Experimentos a largo tiempo de exposición (72 horas)

Se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de calcio total extraída entre los especímenes blanqueados y no blanqueados ($F=1464$ $p=<0,001$). La cantidad de calcio extraído fue diferente a lo largo de los cuatro niveles de profundidad para especímenes blanqueados y no blanqueados con PH 38 y 38,5%. La mayor cantidad de calcio fue movilizado en la superficie (0 μm de profundidad) en especímenes tratados con PH al 38% a los 60 segundos.

ENSAYO 2 ANÁLISIS MICROQUÍMICO DE LOS EFECTOS DEL ÁCIDO FOSFÓRICO SOBRE EL ESMALTE BOVINO

Los datos por EAA mostraron que la cantidad de calcio movilizado a la solución en las muestras de esmalte tratadas con AF fue mayor a cortos tiempos de exposición. Sin embargo los datos de FTIR revelaron que el grado de mineralización del esmalte (determinado como la proporción fosfato sobre amidas) permaneció constante durante el tratamiento, indicando que los componentes orgánicos y minerales se perdieron en la misma

proporción. Por otro lado, los fosfatos pobremente cristalinos y los carbonatos ricos del componente mineral, fueron preferencialmente eliminados y probablemente fue la causa principal de la liberación de calcio por la exposición al ácido. Los resultados de FTIR también demostraron que los componentes orgánicos ricos en grupos hidrofóbicos (ej. las amelogéninas) fueron principalmente eliminados durante el tratamiento ácido. Mediante isotermas de N₂, se observó una disminución del área de superficie específica (S_{BET}) a medida que aumenta el tiempo de tratamiento. Las microfotografías por SEM revelaron que la superficie externa de las muestras tratadas, mostraron una mayor delimitación de los cristales de hidroxiapatito y un aumento del espacio intercrystalino. En general las muestras tratadas revelaron más daños y una superficie más irregular y rugosa.

ENSAYO 3 ANÁLISIS MICROQUÍMICO DE LOS EFECTOS DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO SOBRE EL ESMALTE BOVINO

La cantidad de calcio movilizado por PH fue mayor a cortos tiempos de exposición, cómo se ha observado en los datos de EAA. Adicionalmente los parámetros composicionales determinados por FTIR mostraron que el grado de mineralización permanece constante y la cantidad de fosfatos no cambia significativamente. Por otra parte, los componentes minerales ricos en carbonatos fueron específicamente eliminados junto con los componentes orgánicos ricos en amida I. Se determinó mediante las isotermas de N₂, una modificación adicional y una disminución del área de superficie específica (S_{BET}) al aumentar el tiempo de tratamiento. El análisis de superficie por SEM reveló también que la superficie externa fue más irregular y de apariencia rugosa, con mayor delimitación de los cristales y un aumento del espacio intercrystalino. Estas alteraciones indicaron que a medida que aumentó el tiempo de tratamiento, aumentaron los daños en la superficie.

ENSAYO 4 ANÁLISIS MICROQUÍMICO DE LOS EFECTOS DEL PH Y EL AF SOBRE EL ESMALTE BOVINO

El tratamiento secuencial en el cual los especímenes de esmalte fueron primero expuestos al PH al 30% y después a AF al 0,1% presentó la mayor pérdida de calcio que los expuestos a soluciones únicas de PH ó AF. En este tratamiento, no hubo una variación significativa en la cantidad de calcio movilizado a medida que aumentó el tiempo de tratamiento con PH o AF durante (30 segundos ó 5 minutos). Los datos de FTIR mostraron que el tratamiento secuencial de esmalte en polvo, con PH al 30% y AF durante 30 segundos, no mostraron cambios significativos en la composición del esmalte. Ninguno de los parámetros composicionales determinados por el espectro infrarrojo presentó una relación definida con el tiempo de exposición al peróxido. Sin embargo, en el caso del tratamiento combinado usando un tiempo de exposición mayor del AF (5 minutos), sí existió una relación bien definida entre los cambios de composición del esmalte y el tiempo de exposición a la solución de PH. En particular se observó una pérdida gradual del componente mineral rico en carbonatos y fosfatos altamente cristalinos a medida que aumenta el tiempo de tratamiento con la solución de PH. Adicionalmente los tratamientos secuenciales esmalte fragmentado, causaron una gran reducción de la superficie específica del sólido más que los tratamientos individuales por separado y un gran daño estructural de la superficie y una mayor pérdida de la sustancia interprismática.

En resumen, se puede concluir de los resultados de los diferentes tratamientos que el preblanqueamiento con PH al 38% aumenta significativamente el efecto descalcificante del AF (60s) en la superficie y subsuperficie del esmalte. Los tratamientos con AF y/ó PH producen una desmineralización no homogénea y afectan la composición química del esmalte bovino (orgánica e inorgánica). Las características texturales y el área de la superficie del esmalte son modificadas por los tratamientos, como lo muestran las observaciones por SEM y las medidas de isoterma de N₂.

SUMMARY

The aim of this thesis was to study the effects on dental enamel that have different chemical agents used in the dental practice for cosmetic and restorative treatments. We have designed a series of experimental protocols, using powder and bulk of bovine enamel as study's material, and phosphoric acid and hydrogen peroxide solutions as chemical agents. We evaluated the action of those chemical agents on the enamel, by analyzing the composition and surface alterations through different analytical techniques.

The specific objectives of this study were: 1) Quantify, by atomic absorption spectroscopy (AAS), the amount of calcium extracted from the surface and subsurface of bovine enamel (at different depths: 0, 25, 50 and 100 μ), treated first hydrogen peroxide (HP) and then phosphoric acid (PA) at different concentrations and application times. 2) To study the effect of the enamel treatment with hydrogen peroxide, phosphoric acid, both sequentially on the composition and surface microstructure of the enamel, using different analytical techniques. Specifically, we used atomic absorption (AAS) and Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR) spectroscopies, isotherms of N₂ y CO₂ and scanning electron microscopy (SEM).

The first objective was developed in two tests. In the first one, we used three equally sized sections of enamel surface (16 mm²), cut out from the enamel of ten bovine incisors. One specimen sample from each crown was assigned to one of three experimental groups (n=10): Group I (control group), not exposed to any bleaching agent; Group II, bleached with 38% HP solution for 20 min; and Group III, 30% HP for 60 min. After 24 hours of treatment, the thickness of specimens was measured, and they were immersed in 37% phosphoric acid solution. Subsequently, 5 mL aliquots were collected at 30 s and 60 s. Specimens were then ground to a depth of 25 μ m and again immersed in 37% phosphoric acid solution. This procedure was repeated for enamel depths of 50 and 100 μ m. Ca²⁺ concentrations in the

collected aliquots were determined by atomic absorption spectroscopy. In the second test, the same procedures were performed with different experiment groups: Group I, no bleaching agent; Group II, bleached with 38% HP for 72 hours continued and Group III, 38.5% HP for 72 hours continued.

To complete the second objective, both, bulk and powder enamel samples were used. Three types of experiment were performed in which the enamel samples were exposed to hydrogen peroxide (a); phosphoric acid (b) or both (c). Treatment a: a1) bulk enamel was treated with concentrated PA (37 %) and a2) powder enamel (150 to 200 μm in size) was treated with a diluted PA solution (0.1%). Both types of samples were exposed to the acid solutions for increasing time intervals ranging from 1 to 1440 minutes. Treatment b: Enamel samples were exposed to HP (30%) for different time intervals, i.e. 5, 20, 60, 90 and 120 minutes. Treatment c: Enamel samples were first exposed to HP (30%) for the same time intervals and subsequently exposed to PA (37%) for 30 seconds and 5 minutes. The chemical changes occurring during the progress of the experiments were analyzed by AAS and FTIR. The surface modifications were studied by SEM and by nitrogen and carbon dioxide isotherms at 77 and 273 K, respectively.

Hereafter the main results of the different experimental treatments are summarized

TEST 1 EFFECT OF HIGHLY CONCENTRATED HYDROGEN PEROXIDE AND PHOSPHORIC ACID ON SURFACE AND SUBSURFACE OF BOVINE ENAMEL

Short time exposure experiments (20 y 60 minutes)

No significant differences were found in the total amounts of extracted Ca^{2+} between bleached and unbleached specimens ($F=0,142$; $p=0.869$). The amount of Ca^{2+} extracted was similar among the four depth levels studied in both set of experiments: unbleached and 30% HP bleached specimens. A significantly larger amount of Ca^{2+} was mobilized from the enamel subsurface (25 μm depth) than for other depths for specimens treated with 38% HP.

Long time exposure experiments (72 hours)

Significant differences were found in the total amounts of extracted Ca^{2+} between bleached and unbleached specimens ($F=1464$ $p<0,001$). The amount of Ca^{2+} extracted was different among the four depth levels studied for the unbleached and for the 38,5 and 38% HP bleached specimens ($F=7,53$ $p<0,005$). A notably larger amount of Ca^{2+} was mobilized at the surface ($0 \mu\text{m}$ depth) in specimens treated with 38% HP to 60 seconds.

TEST 2 MICROCHEMICAL ANALYSES OF THE EFFECTS OF PA ON BOVINE ENAMEL

AAS data revealed that the amount of calcium mobilized to solution in enamel samples treated with PA was higher at shorter exposure times. However, FTIR data showed that the degree of mineralization of the enamel (determined as the phosphate to amides ratio) remained constant during the treatment, indicating that the mineral and organic components were lost at the same rate. Interestingly, poorly crystalline phosphate and carbonate-rich mineral components were preferentially removed and were presumably the main source of calcium released by the acid exposure. FTIR results also demonstrated that organic components rich in hydrophobic groups (i.e., amelogenins) were preferentially removed during acid treatment. A decrease of the specific surface area (S_{BET}) as the time of treatment is larger is deduced from the N_2 isotherms. The SEM micrographs reveal that the external surface of treated enamel samples shows protruding apatite nanocrystal and larger intercrystalline spaces. In general, treated samples showed a more defective, rougher and irregular surface.

TEST 3 MICROCHEMICAL ANALYSES OF THE EFFECTS OF HP ON BOVINE ENAMEL

The amount of calcium mobilized by HP is larger for shorter time exposures, as seen from the AAS data. Additional compositional parameters determined from FTIR spectra show that the degree of mineralization remains constant, and the amount of phosphates does not change significantly. On the other hand, mineral components rich in carbonates are specifically removed together with organic components rich in amide I. Additionally a modification and a decrease of the specific surface area (S_{BET}) as the time of treatment increases was detected by N_2 isotherms. Analysis of the surface by SEM revealed that the external surface became rougher and more irregular with further exposure of the apatite nanocrystal and have large intercrystalline spaces. These alterations indicated that the surface damage increase with the duration of treatment.

TEST 4 MICROCHEMICAL ANALYSES OF THE EFFECTS OF HP AND PA ON BOVINE ENAMEL

The sequentially treatment in which samples enamel was first exposed to HP at 30% and after that treated with PA at 0.1% produced a greater loss of calcium than the individual treatments in which enamel was exposed to either HP or PA solutions. In the combined treatment, there was not any significant variation in the amount of calcium mobilized as the time of treatment with HP increased irrespectively of the duration of the subsequent PA etching (30 seconds or 5 minutes). The FTIR data showed that the combined treatment of enamel powder, with HP at 30% and PA for 30 seconds, produced no significant changes in the composition of the enamel. That is, none of the compositional parameters determined from the infrared spectra showed a defined relationship with the duration of the treatment with peroxide. However, in the case of the combined treatment using larger time of exposure of PA (5 minutes), there were well defined changes in the composition of enamel as function of the

time of exposure to the HP solution. In particular, we observed that there was a gradual loss of mineral component rich in carbonates and highly crystalline phosphates as the time of exposure to the peroxide solution increased. Additionally, the combined treatments with bulk enamel produced a greater reduction in specific surface of the solid than any of the individual treatments separately and a greater structural disruption of the surface and a greater loss of interprismatic material.

In summary, we can conclude from the results of the different treatments that re-bleaching with 38% HP significantly increases the decalcifying effect of PA (for 60 seconds) on surface and subsurface of enamel. The PA and/o HP treatments produce a non homogeneous demineralization and affect the chemical composition, organic and inorganic, of bovine enamel. The textural characteristics of the enamel surface are modified by the treatments as reveal by SEM and N₂ isotherms.

Key-words: phosphoric acid, hydrogen peroxide, surface and subsurface enamel, demineralization, atomic absorption spectroscopy (AAS), infrared spectroscopy (FTIR), adsorption isotherms, scanning electron microscopy (SEM).

LISTA DE TABLAS

	Pág
1. INTRODUCCIÓN	41
1.1 Propiedades cristalográficas del hidroxiapatito	43
1.2 Elementos de sustitución de hidroxiapatito de esmalte	44
2. OBJETIVOS	
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Resumen de los ensayos realizados	82
3.2 Ficha técnica de los materiales utilizados parte I.....	84
3.3 Ficha técnica de los materiales utilizados parte II	87
3.4 Asignación de bandas FTIR de esmalte	103
3.5 Asignación de regiones y grupos moleculares en espectroscopia infrarroja	108
3.6 Asignación de regiones y grupos moleculares en espectroscopia Raman	108
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Calcio extraído en función del tiempo de esmalte tratado con peróxido de hidrógeno y grabado ácido con ácido fosfórico a diferentes niveles de profundidad ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) parte I.....	128
4.2 Calcio extraído en función del tiempo de esmalte tratado con peróxido de hidrógeno y grabado ácido con ácido fosfórico a diferentes niveles de profundidad ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) parte II.....	134
4.3 Calcio liberado en función del tiempo de tratamiento con ácido fosfórico	141
4.4 Análisis de correlación de los diferentes parámetros composicionales del esmalte determinados a partir del	

espectro de FTIR y tiempo de tratamiento con ácido fosfórico.....	143
4.5 Análisis de las isotermas de adsorción mediante el método BET y punto B de la muestra control y la tratada con ácido fosfórico al 37%	150
4.6 Calcio liberado en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%	155
4.7 Análisis de correlación de los diferentes parámetros composicionales del esmalte determinados a partir del espectro de FTIR y tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%	157
4.8 Análisis de las isotermas de adsorción mediante el método BET y punto B de la muestra control y la tratada con peróxido de hidrógeno al 30% durante 20 minutos	162
4.9 Calcio liberado en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno y ácido fosfórico 30 segundos	170
4.10 Calcio liberado en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno y ácido fosfórico 5 minutos	170
4.11 Análisis de correlación de los diferentes parámetros composicionales del esmalte determinados a partir del espectro de FTIR y tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% y ácido fosfórico 30 segundos	172
4.12 Análisis de correlación de los diferentes parámetros composicionales del esmalte determinados a partir del espectro de FTIR y tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% y ácido fosfórico 30 segundos	173
4.13 Análisis de las isotermas de adsorción mediante el método BET y punto B de la muestra control y las tratadas con peróxido de hidrógeno al 30% durante 5,	

20 y 60 minutos y ácido fosfórico al 37% durante 30 segundos.....	180
4.14 Tabla comparativa de la variación de la composición del esmalte sometido a diferentes tratamientos. 1) con ácido fosfórico. 2) peróxido de hidrógeno3) tratamiento secuencial con peróxido y ácido fosfórico.....	185
4.15 Análisis comparativo de las isotermas de adsorción mediante el método de BET y punto B para los tratamientos individuales y el tratamiento secuencial	185

LISTA DE FIGURAS

	Pág
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Esquema de un diente y sus componentes secuencial	41
1.2 Amelogenesis	42
1.3 Estructura molecular del hidroxiapatito	43
1.4 Difractograma de Rx de polvo de hidroxiapatito..	44
1.5 Microfotografías por SEM de esmalte dental a diferentes magnificaciones	45
1.6 Ilustración esquemática del ensamblaje ordenado de la estructura del esmalte desde la escala de nm a mm	46
1.7 Proceso de biomineralización	51
1.8 Resultado clínico de un procedimiento de blanqueamiento dental	52
1.9 Microfotografía por SEM de esmalte dental grabado con ácido fosfórico	57
2. OBJETIVOS	
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Selección de la muestra de diente bovino	79
3.2 Proceso de obtención de la muestra fragmentada	80
3.3 Proceso de obtención de la muestra pulverizada	80
3.4 Montaje de muestras sólidas en discos de resina	83
3.5 Aplicación del agente blanqueador	84

3.6	Preparación del ácido fosfórico al 37%.....	85
3.7	Tratamiento con ácido fosfórico de los especímenes y recolección de la alícuota	85
3.8	Resumen de los procedimientos	86
3.9	Esquema del trayecto seguido por el haz óptico en la espectrometría de absorción atómica	94
3.10	Equipo para análisis por espectroscopia de absorción atómica	95
3.11	Espectro electromagnético	96
3.12	Interferómetro de Michelson	98
3.13	Método de obtención de pastillas para análisis por FTIR componentes	100
3.14	Equipo para análisis por espectroscopia infrarroja	101
3.15	Espectro infrarrojo del fondo CO ₂ y H ₂ O	102
3.16	Espectro infrarrojo de esmalte sin tratamiento.	103
3.17	Fragmento del espectro infrarrojo (800-1600 cm ⁻¹) de esmalte sin tratamiento	103
3.18	Banda 500- 650 cm ⁻¹ ν ₄ PO ₃ ⁻	104
3.19	Banda 900-1200 cm ⁻¹ ν ₃ PO ₃ ⁻	106
3.20	Banda 1350-1950 cm ⁻¹ amidas y carbonatos	107
3.21	Diagrama energético	113
3.22	Bandas Rayleigh, Raman Stokes y Raman anti-Stokes	107
3.23	Espectro Raman habitual, compuesto por las bandas Raman Stokes.....	113
3.24	Equipo para análisis por espectroscopia Raman	115
3.25	Subdivisión de las isotermas de adsorción de gases I, II y IV	117
3.26	Equipo para análisis por isotermas de adsorción	120

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Valores significativos de calcio extraído ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) por nivel de profundidad I	130
4.2	Valores significativos de calcio extraído ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) a diferentes niveles de profundidad a los 30 y 60 segundos de grabado ácido I.....	130
4.3	Valores significativos de calcio extraído ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) por nivel de profundidad II	137
4.4	Valores significativos de calcio extraído ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) a diferentes niveles de profundidad a los 30 y 60 segundos de grabado ácido	137
4.5	Cantidad de Ca^{2+} (ppm) extraído del esmalte en polvo tratado con ácido fosfórico en función del tiempo	142
4.6	Grado de mineralización (gradmin) en función del tiempo con de tratamiento con ácido fosfórico	144
4.7	Área relativa del pico a 954cm^{-1} asociado al fosfato pobremente cristalino en función del tiempo de tratamiento con ácido fosfórico	145
4.8	Contenido de carbonato en la parte mineral en función del tiempo de tratamiento con ácido fosfórico	145
4.9	Área relativa del pico a 1460cm^{-1} asociada a grupos CN y CH en función del tiempo de tratamiento con ácido fosfórico	146
4.10	Índice de cristalinidad FWHM para la banda correspondiente a 961cm^{-1} $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$	147
4.11	Relación A_{961}/A_{1071} $\text{PO}_4^{3-}/\text{CO}_3^{2-}$ tipo B	148
4.12	Isotermas de adsorción de N_2 de la muestra blanco	149
4.13	Isotermas de adsorción de N_2 de la muestra blanco y la tratada con ácido fosfórico al 37%	149
4.14	Isotermas de adsorción de CO_2 de la muestra control y la tratada con ácido fosfórico al 37% .	151
4.15	Microfotografías por SEM a 10.000X	151

4.16	Cantidad de Ca^{2+} (ppm) extraído del esmalte en polvo tratado con peróxido de hidrógeno al 30% en función del tiempo	156
4.17	Grado de mineralización (gradmin) vs tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%	158
4.18	Contenido de carbonato en la parte mineral en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%	158
4.19	Área relativa del pico a 1330 cm^{-1} asociada al fosfato altamente cristalino en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%	159
4.20	Área relativa del pico a 1660 cm^{-1} asociada al componente orgánico amida I en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%	160
4.21	Área relativa del pico asociado con el índice de cristalinidad (IC) en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%	160
4.22	Isotermas de adsorción de N_2 de la muestra control y la tratada con peróxido de hidrógeno al 30% durante 20 minutos	161
4.23	Isotermas de adsorción de CO_2 de la muestra control y la tratada con peróxido de hidrógeno al 30% durante 20 minutos	162
4.24	Microfotografías por SEM de esmalte bovino a 10.000 X y 50.000 X	163
4.25	ppm de calcio liberado en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% y ácido fosfórico durante 30 segundos	171
4.26	ppm de calcio liberado en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% y ácido fosfórico durante 5 minutos	171
4.27	Grado de mineralización (Gradmin) en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno	

	al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 30 segundos	174
4.28	Grado de mineralización (Gradmin) en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico al 37% durante 5 minutos	174
4.29	Contenido de carbonato en la parte mineral en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico al 37% durante 30 segundos .	175
4.30	Contenido de carbonato en la parte mineral en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico al 37% durante 5 minutos	175
4.31	Área relativa del pico a1550 cm ⁻¹ asociado al componente orgánico amida II en función del logaritmo del tiempo	176
4.32	Área relativa del pico a1550 cm ⁻¹ asociado al componente orgánico amida II en función del logaritmo del tiempo	176
4.33	Área relativa del pico a1030 cm ⁻¹ asociado al fosfato altamente cristalino en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 30 segundos	177
4.34	Área relativa del pico a1030 cm ⁻¹ asociado al fosfato altamente cristalino en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico al 37% durante 5 minutos	177
4.35	Área relativa del pico asociado con el índice de cristalinidad (IC) en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 30	178

4.36	Área relativa del pico asociado con el índice de cristalinidad (IC) en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 5 minutos	179
4.37	Isotermas de adsorción de N ₂ de la muestra blanco y las tratadas con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 30 segundos	180
4.38	Isotermas de adsorción de CO ₂ de la muestra blanco y las tratadas con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 30 segundos	181
4.39	Microfotografías por SEM de esmalte bovino a 10.000 X y 50.000 X	182
4.40	Espectroscopia IR de la muestra control y las tratadas con peróxido de hidrógeno al 30%, ácido fosfórico y tratamiento secuencial	183
4.41	Modelo propuesto para explicar el proceso de alteración del esmalte debido a los diferentes tratamientos aplicados durante los ensayos con ácido fosfórico, peróxido de hidrógeno y tratamiento con peróxido y fosfórico	184
4.42	Isotermas de adsorción de N ₂ de la muestra blanco y las tratadas con peróxido de hidrógeno al 30%, ácido fosfórico y ambos secuencialmente	186

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A

1. Artículo: Demineralization effects of Phosphoric acid on surface and subsurface bovine enamel bleached with in-office hydrogen peroxide (Journal Adhesive Dentistry). 225
2. Artículo: Selective demineralization of bovine enamel by phosphoric acid 245

ANEXO B

1. Resumen de estancia en el Laboratorio de Investigación del Departamento de Preventiva, Periodontología y Cariología, Facultad de Odontología. Universidad de Zürich (Suiza) 261

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

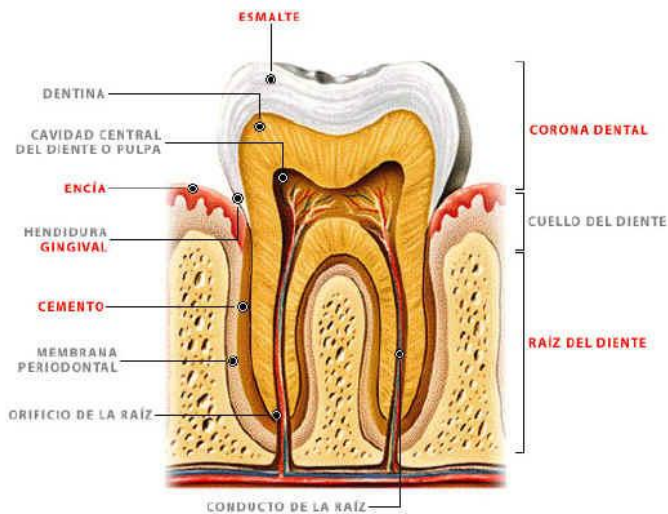
A	Absorbancia.
AA	Espectroscopia de absorción atómica.
AF	Ácido fosfórico.
BET	Modelo de Brunauer, Emmett y Teller.
BDDT	Clasificación de Brunauer, Demina, Demina, Teller.
CPP-ACP	Casein phosphopeptide - amorphous calcium phosphate
EPMA	Microsonda electrónica de barrido.
FCA	Fosfato cálcico amorfo.
FTIR	Infrarrojo por transformada de Fourier.
Gradmin	Grado de mineralización.
HP	Hydrogen Peroxide.
IC	Índice de cristalinidad.
IR	Infrarrojo.
PH	Peróxido de hidrógeno.
PA	Phosphoric acid.
RPE	Resonancia paramagnética electrónica.
SEM	Microscopía electrónica de barrido.
T	Transmitancia.
TMR	Microradiografía transversal
TXRF	Fluorescencia de rayos X por reflexión total.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ESMALTE

1.1.1 Definición

Figura 1.1 Esquema de un diente y sus componentes.



El esmalte dental es un tejido duro, altamente mineralizado, acelular que cubre la superficie de la corona del diente. Contiene una de las matrices extracelulares más altamente mineralizada, constituida por un 96 % de sustancia mineral, un 4 % de materia orgánica y agua.

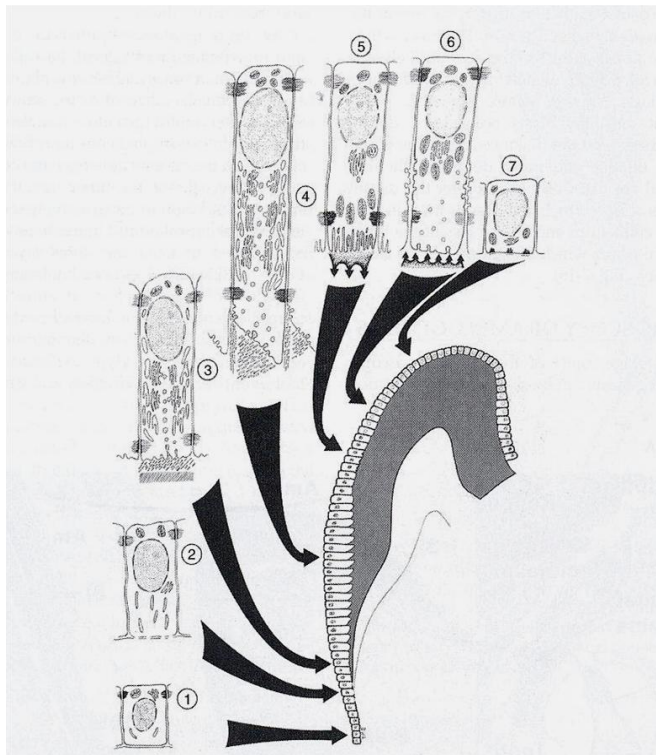
1.1.2 Amelogenesis

La amelogenesis es el proceso por el cual se forma esmalte a partir del tejido ectodérmico. El proceso se da en dos fases. En la primera fase, se produce aproximadamente el 90% del esmalte mineralizado. En la segunda, se produce la incorporación

adicional de iones, la eliminación de la fase orgánica y del agua (1).

Los ameloblastos son las células que regulan el proceso de mineralización. En este proceso se pueden describir 3 etapas: 1) presecretoria, 2) secretoria y 3) de maduración figura 1.2. En la primera etapa, los ameloblastos se diferencian, adquieren el fenotipo, cambian la polaridad, desarrollan el mecanismo de síntesis de proteínas y se preparan para secretar la matriz orgánica. En la segunda etapa, la secretoria los ameloblastos elaboran y organizan un tejido altamente ordenado del espesor total del esmalte. Por último, durante la etapa de maduración, los ameloblastos transportan y modulan los iones específicos para el depósito de minerales (1).

Figura 1.2 Amelogenesis. Tomada del libro de Nanci (1).



1.1.3 Composición y organización estructural

1.1.3.1 Fase Inorgánica

La parte mineral del esmalte está constituida por cristales de fosfato cálcico (hidroxiapatito carbonatado) (2). La composición química del hidroxiapatito puro es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Figura 1.3 Estructura molecular del hidroxiapatito.

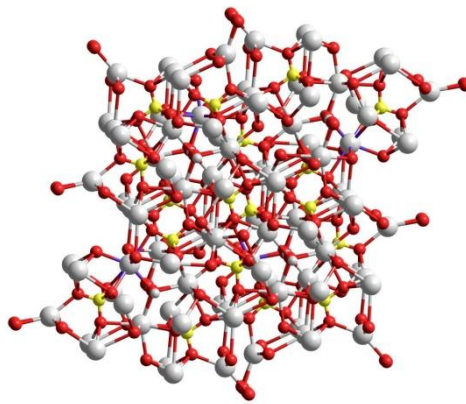
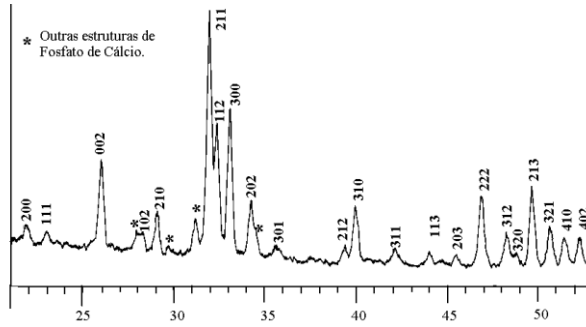


Tabla 1.1 Propiedades cristalográficas de la hidroxiapatito (www.mindat.org).

Sistema Cristalino	Hexagonal
Grupo Espacial	P63/m
Parámetro de celdilla	$a=.41, c=6,88$
Razón	$a:c=1:0.731$

Figura 1.4 Difractograma de rayos X de polvo de hidroxiapatito.



La fórmula más común, permite varias sustituciones, el Ca^{2+} por Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y los iones fosfato e hidroxilo por CO_3^{2-} , F^- , HPO_4^{2-} , Cl^- y H_2O (2). Estas sustituciones se dan en un ambiente no homogéneo, modificando la red cristalina propia del apatito, lo que conlleva a una alteración del tamaño cristalino, la tasa de disolución y otras propiedades de diferente naturaleza (dureza, estabilidad térmica).

Tabla 1.2 Elementos de sustitución del hidroxiapatito de esmalte. Tomada del artículo de Bachmann y col (2).

Enamel apatite	Apatite type
Na^+ ; CO_3^{2-} ; F^- ; K^+ ; HPO_4^{2-} ; Cl^- ; Mg^{2+} ; H_2O	Substitution elements
1.61–1.64	Ca/P ratio
0.9441	a-axis (nm)
0.6882	c-axis (nm)

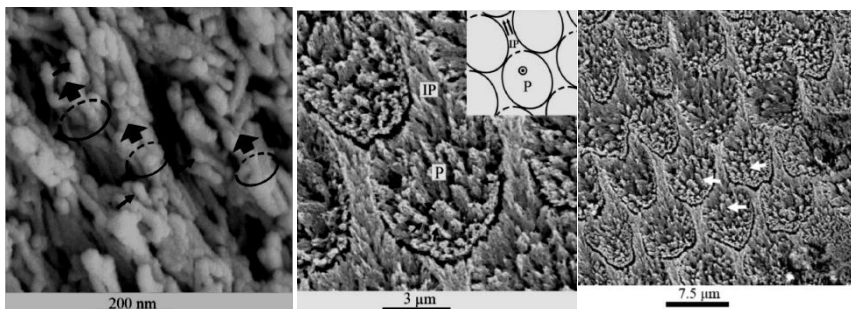
El apatito dental tiene numerosas impurezas (carbonato, magnesio, fosfato ácido) y vacantes (ausencia de OH^-). Estas pequeñas imperfecciones junto con un menor tamaño cristalino, hacen que el apatito sea más soluble, permitiendo ser depósito y fuente de iones de calcio, fosfato y magnesio (Glimcher, 1998). El carbonato aumenta la disolución del mineral (Blitz & Pellegrino, 1977; Arends & Jongebloed, 1981) y desempeña un papel fundamental en numerosos procesos biológicos como el progreso de la caries dental en el esmalte. (Hallsworth y col, 1973). El

carbonato (CO_3^{2-}), constituyente principal de los fluidos corporales, puede sustituir a los iones OH^- y PO_4^{3-} a medida que es adsorbido en la superficie de los cristales, por el contrario la incorporación de fósforo incrementa el tamaño y consecuentemente reduce la solubilidad de los cristales de apatita en el medio.

La unidad básica estructural del esmalte son las nanofibrillas de 30-40 nm de espesor formadas por cristales de hidroxiapatito hexagonales. Las nanofibrillas se adhieren unas a otras constituyendo una unidad densa cristalina. El cristal (fosfato de calcio), tiene una simetría hexagonal, una longitud de 60 - 70 nm y un ancho de 25 - 30 nm (1). Los cristales se agrupan ordenadamente en bandas longitudinales formando los llamados prismas (P) y la sustancia interprismática (IP) (3).

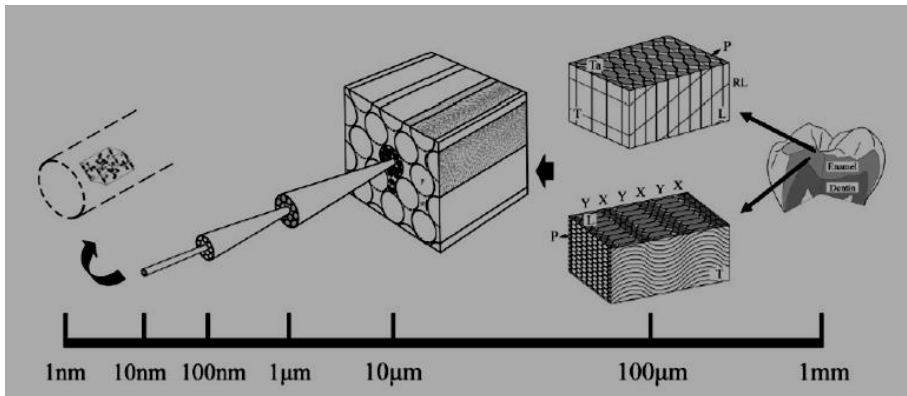
Figura 1.5 muestra la organización del esmalte a diferentes escalas: En la primera microfotografía (a mayor magnificación) se observan las nanofibrillas mineralizadas indicadas por las flechas negras, los agregados de nanofibrillas que conforman los cristales y la orientación de los cristales. En la segunda microfotografía se observa la conformación de la sustancia interprismática por las fibras. En la tercera microfotografía se observa la alineación de los prismas paralelos unos a otros para componer la capa del esmalte.

Figura 1.5 Microfotografías por SEM de esmalte dental a diferentes magnificaciones. Tomada del Artículo de Fû-Zhai Cui y Jun Ge. (3).



Posteriormente los prismas y la sustancia interprismática continúan alineándose y se organizan en forma ondulada, para conformar la totalidad de la capa del esmalte (3). Esto se puede observar más claramente en la figura 1.6.

Figura 1.6 Ilustración esquemática del ensamblaje ordenado de la estructura del esmalte desde la escala de nm a mm. Esquema Tomado del artículo de Fu-Zhai Cui y Jun Ge. (3).



La alta organización de la estructura del esmalte, a diferentes escalas, determina sus propiedades físicas, mecánicas (dureza, módulo elástico y la anisotropía) y químicas.

1.1.3.2 Fase Orgánica

La matriz orgánica del esmalte está compuesta por agua, proteínas y lípidos (4). Las proteínas, principal componente de la matriz, se pueden clasificar en dos categorías. 1. las amelogeninas, que constituyen el 90% de la matriz (5) (6). 2. Las no amelogeninas como la ameloblastina, enamulina, tuftelina, proteínas sulfatadas, proteinasas, albúmina que constituyen el 10% restante (6).

Las amelogeninas son segregadas por los ameloblastos y odontoblastos (7) y constituyen la entidad estructural primaria, necesaria para el desarrollo de la matriz del esmalte. (7) Son

proteínas hidrofóbicas, ricas en prolina (5), histidina, glutamina (5) y leucina (8), que presentan pequeñas modificaciones postransicionales y tienen pesos moleculares entre 5 - 45 KDa (1). La formación de la matrix orgánica del esmalte ocurre de forma simultánea al crecimiento y la maduración de los cristalitos de apatita y se ha propuesto que la maduración de las amelogeninas es uno de los factores claves en el control del crecimiento cristalino (7). Esto sugiere que la amelogenina es esencial para controlar la morfología (9), organización de los cristales (soporte físico) (1) (9) (10) y en la regulación del espesor del esmalte. Las otras proteínas del esmalte se piensa que participan en la formación inicial del esmalte y la diferenciación de los ameloblastos (7).

La ameloblastina es la glicoproteína específica más abundante de las no amelogeninas. Su más alta expresión se produce en los estados secretorios de los ameloblastos y empieza a disminuir en los estados de maduración, por lo que se considera una molécula fundamental para la adhesión celular (6) y la diferenciación de los ameloblastos en estado secretorio (7). Se cree que forma agregados supramoleculares llamados nanoesferas que rodean a los cristales a lo largo de su eje axial y que son visibles en secciones del esmalte examinadas bajo microscopía electrónica (1). Tienen la función de organizar la microestructura de la matriz, creando espacios iniciales de 20 nm entre los cristalitos e impidiendo que se fusionen lateralmente (6).

Basados en las características bioquímicas y la distribución diferencial de las proteínas del esmalte, se cree que miembros de la familia de las proteínas no amelogeninas promueven y guían la formación de los cristales del esmalte, mientras que las amelogeninas regulan el crecimiento en espesor y ancho de los cristales (1).

Las enamelinas del grupo de proteínas no amelogeninas, se caracterizan por su naturaleza ácida al ser ricas en ácido glutámico, ácido aspártico y glicina (8). Están fuertemente absorbidas a los cristales del esmalte y no se liberan de la matriz hasta que los cristalitos se disuelven. Se expresan durante el desarrollo del esmalte, específicamente en el estadio secretorio,

de la unión amelodentinal hacia la superficie y rápidamente desaparecen en el estadio de maduración (6).

La tuftelina es una proteína que juega un papel en la nucleación de los cristalitos del esmalte durante el proceso de biomineralización (6). Las proteínas "tuft" son histológicamente fallas que forman bandas sinuosas de fibras en la unión amelodentinal, en grandes secciones del esmalte maduro.

Aunque algunos autores mencionan que las proteínas constituyen una parte mínima de la estructura del esmalte y se ubican únicamente entre los espacios cristalinos actuando como un sistema de pegamento (11). Otros autores como Britk y col (12), proponen un modelo donde el componente orgánico del esmalte está organizado en dos subsistemas, orgánico 1 y orgánico 2. El primer subsistema llena los espacios entre los prismas del esmalte y es de un espesor de 10 – 20 nm, el segundo recubre los nanocristales de hidroxiapatito y es de un espesor de 2 – 5 nm. El porcentaje del subsistema 1 es mayor que el porcentaje del subsistema 2 (13).

Otros autores proponen que los componentes proteicos y minerales de los tejidos calcificados no deben ser considerados en fases separadas, porque es un ensamblaje donde las proteínas y los cristales minerales están químicamente unidos. Ellos mencionan que el esmalte puede ser modelado como una estructura compuesta por tres fases, una fase mineral, una fase orgánica y una interfase proteica-mineral. En esta última fase, se ha hipotetizado que comparten moléculas, como el carbonato que está presente tanto en el hidroxiapatito como en los aminoácidos (13).

1.1.4 Mineralización del esmalte

La mineralización del esmalte es un proceso complejo y controlado de formación de minerales dentro y fuera de la célula, que dan lugar a una fase cristalina (cristales con morfología y

tamaño constantes), específica para su función. Para su formación es fundamental la presencia de materia orgánica, que define la naturaleza y composición química del material así como su relación con la fase mineral (14).

La biomineralización consiste en la mayoría de los casos, en una reacción de precipitación en medio acuoso, mediada y controlada por la actividad celular. En este proceso, es necesario que se cumplan tres condiciones fundamentales: *sobresaturación* (que la solución acuosa en la que ocurre esta precipitación se encuentre sobresaturada), *nucleación* (presencia de núcleos o gérmenes de precipitación en la disolución) y *crecimiento* (condiciones adecuadas para que ocurran procesos de crecimiento de cristales).

En el esmalte, la matriz para iniciar el proceso de mineralización no está preformada, por lo que el proceso de biomineralización se da de una manera diferente. Los pasos son los siguientes, (i) Los ameloblastos en estadio secretorio (proceso de Tomes) y la unión amelodentinal limitan el espacio del esmalte. (ii) Secreción de las amelogeninas y formación de una red estructural supramolecular. (iii) Transporte de iones de calcio y fosfato por los ameloblastos a la matriz extracelular, dando como resultado una solución supersaturada. (iv) Los cristales de apatita nuclean en una matriz preexistente de dentina por acción de las proteínas no amelogeninas. (v) Control del crecimiento cristalino por las nanoesferas de amelogeninas. (vi) Detenimiento del crecimiento cristalino por la degradación y eliminación de la matriz extracelular. (vii) Maduración del esmalte, paso durante el cual adquiere su dureza debido al rápido crecimiento cristalino, junto con el procesamiento, degradación y pérdida de proteínas (6).

Al igual que en otros procesos de biomineralización, durante el proceso de mineralización del esmalte, las células son las que dirigen el proceso de formación de minerales a través de la expresión de proteínas, que actúan como nucleadores dentro de la misma célula o en la matriz extracelular y como reguladoras que previenen la formación de minerales en sitios inadecuados, mediante la producción de enzimas y la regulación del transporte de iones (15).

Las proteínas asociadas con la biomineralización tienen funciones comunes. Sus estructuras se pueden estudiar mediante la secuenciación de los genes y los aminoácidos por métodos analíticos: por ejemplo espectroscopia NMR, IR y cristalografía de Rayos X. Muchas de ellas son aniónicas. Sus cargas les permiten interactuar con las cargas de los cristales. Se cree que la complementariedad entre la estructura cristalina y la proteica da como resultado la regulación de la morfología, el crecimiento cristalino, así como también la inducción de la nucleación (15).

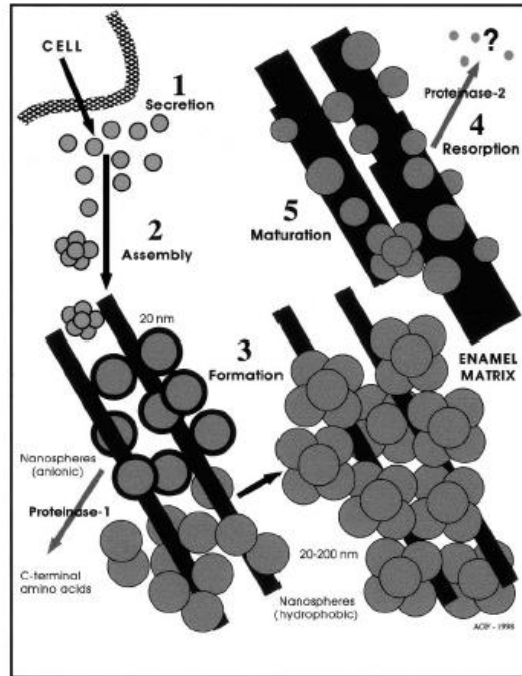
También pueden tener efectos directos o indirectos en la formación de la fase mineral. Las actividades indirectas incluyen transporte o secuestro de iones, interacción con otras proteínas permitiendo cambios en la conformación del núcleo de la proteína o de la organización del tejido y reclutamiento de células que modulan el proceso de mineralización (15).

Los primeros depósitos minerales pueden ser no cristalinos y estos minerales amorfos pueden luego ser transformados en varias formas cristalinas. Las fases minerales cristalinas son relativamente insolubles y están generalmente bien orientadas (15). Este proceso de biomineralización del esmalte se puede resumir en la figura 1.7.

1. Las amelogeninas son sintetizadas por los ameloblastos y segregadas al espacio extracelular.
2. Los monómeros de amelogenina se ensamblan para generar estructuras esféricas de 20 nm de diámetro con grupos carboxil (aniónicos) en los extremos.
3. Las nanoesferas aniónicas inicialmente interactúan electrostáticamente con los cristales a lo largo del eje axial, previniendo la fusión de los cristales. Luego la enamelisina proteínasa 1 (Bartlett y col 1996) procesa el extremo carboxi de la amelogenina, reduciendo su carácter aniónico. Por otra parte las nanoesferas hidrofóbicas se ensamblan estabilizando la matriz que contiene los cristalitos iniciales, los cuales continúan el crecimiento por la incorporación de iones en sus superficies expuestas.
4. La EMSP-1 (proteínasa 2) degrada las nanoesferas hidrofóbicas de las amelogeninas generando pequeños

fragmentos y productos no conocidos, los cuales son reabsorbidos eventualmente por los ameloblastos. 5. Como se elimina la protección de las nanoesferas, los cristalitas crecen en espesor y finalmente se fusionan para generar el esmalte maduro.

Figura 1.7 Proceso de biomineralización. Tomada de Fincham y col 1999 (6).



En el esmalte se producen carbonatos y los fosfatos, como procesos en la biomineralización. Los carbonatos son de tipo cálcico y son los más comunes en los procesos de mineralización biológica, tanto en términos de cantidad producida como por su distribución en taxones (8). De los ocho polimorfos de carbonatos, son conocidos que siete de ellos son cristalinos y uno amorfo (16).

Los fosfatos, fundamentalmente de calcio, comprenden cerca de un 25% de los tipos de minerales de origen biológico. El tipo de fosfato conocido en el esmalte es el hidroxiapatito carbonatado.

1.2 BLANQUEAMIENTO DENTAL

Figura 1.8 Resultado clínico de un procedimiento de blanqueamiento dental.



Es un procedimiento físico o químico por el cual se disminuye el cromatismo y el valor del diente afectado por manchas extrínsecas o intrínsecas.

1.2.1 Agentes blanqueadores

El blanqueamiento puede ser definido como un proceso de eliminación de pigmentos de los dientes. Se utilizan diversos agentes blanqueadores actualmente y entre ellos están:

1.2.1.1 Peróxido de hidrógeno

Muchos de los agentes activos de los blanqueadores poseen peróxido de hidrógeno con una concentración que puede variar del 8% al 50% (17).

El peróxido de hidrógeno es un agente oxidante que tiene una alta capacidad de formar radicales libres como O_2^{\bullet} y HO_2^{\bullet} (18), que pueden dañar directa o indirectamente todas las biomoléculas incluyendo proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA (19). La organización de formas activas del oxígeno depende de la temperatura, del pH, de la fuente luminosa, los catalizadores, la presencia de metales y otras condiciones.

El peróxido de hidrógeno además de ser un fuerte oxidante tiene carácter ácido y uno de los mecanismos de acción propuestos para el blanqueamiento se debe a su habilidad para formar los radicales libres de oxígeno que pueden interactuar con las moléculas originales coloreadas y oxidarlas al igual que los pigmentos produciendo por lo tanto la decoloración de dichas moléculas.

El peróxido de hidrógeno, puede cambiar la estructura de la apatita, donde el fosfato puede ser reemplazado. La otra sustitución coordinada de los ligandos que puede ocurrir en el hidroxiapatito, es formación de complejos metálicos (hierro) o cuando el CO_3^{2-} es reemplazado por el OH^- liberado del peróxido de hidrógeno. Se cree que estas sustituciones son débiles y el proceso puede ser reversible por la acción del fluoruro (20).

1.2.1.2 Peróxido de Carbamida

El peróxido de carbamida se descompone 1/3 en peróxido de hidrógeno y 2/3 en urea cuando entra en contacto con el tejido blando o saliva a temperatura oral. El peróxido de hidrógeno puede difundir a través del esmalte y de la dentina debido a su bajo peso molecular y se disocia en oxígeno y agua y la urea en amonio y dióxido de carbono (21), que contribuyen a la elevación del pH (22).

Arends y col (23) describen que la urea es capaz de penetrar dentro del esmalte, afectando a la sustancia interprismática. A pesar de que la urea puede contribuir a los cambios estructurales y de rugosidad del esmalte, también puede tener efectos benéficos, al descomponerse en dióxido de carbono y amonio (24).

Se piensa que el mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno puede estar asociado con la habilidad de formar radicales libres que interactúan con macromoléculas y pigmentos coloreados que han sido absorbidas, oxidándolas y dividiéndolas en moléculas más pequeñas y decoloradas. La pérdida de

componentes oscuros o denominaciones del color se pueden seguir mediante espectroscopia visible (21).

1.2.1.3 Perborato de sodio

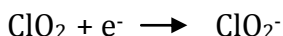
Este agente oxidante está disponible en forma de polvo y contiene casi el 95% de perborato de sodio, que corresponde al 9.9% de oxígeno disponible. Es estable cuando está seco, pero en presencia de ácido, aire o agua se descompone lentamente y forma el metaborato de sodio, peróxido de hidrógeno (9%) y oxígeno.

1.2.1.4 Clorito de Sodio

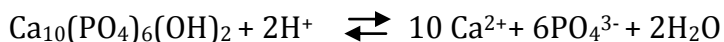
Recientemente sistemas blanqueadores a base de clorito de sodio (NaClO_2) y activados por el ácido cítrico han sido implementados. El clorito de sodio es conocido también como agente blanqueador en la industria textil y papelera, a través de la liberación de pequeñas cantidades de ClO_2 en presencia de ácido (4):



El dióxido de cloro se reduce a ClO_2^- en contacto con el material orgánico que a su vez es oxidado.



El clorito sódico además, puede combinarse con el ácido cítrico es un ácido carboxílico tribásico que puede disolver el esmalte a través de la siguiente reacción (4):



Además el ión citrato es un ligando quelante y forma un complejo soluble con el ión calcio, promoviendo posteriormente su disolución (4).

1.2.1.5 Otros agentes

Se han agregado a algunos agentes blanqueadores productos espesantes como el carbopol y la glicerina que aumentan la capacidad de adherencia a la superficie dental y dan mayor tiempo de contacto.

Por un lado el carbopol aumenta la capacidad desmineralizante del blanqueador, ya que inhibe el crecimiento de los cristales de hidroxiapatito, debido a su alta capacidad de unión al calcio. Por otra parte la glicerina puede actuar como una barrera para el efecto desmineralizante del agente blanqueador (25).

Por otra parte algunos de los productos blanqueadores disponibles incorporan sales sódicas del ácido etilenediamina tetracético) con un pH de 7.3, el cual tiene un efecto de ablandamiento de la dentina.

Algunas casas fabricantes han incorporado actualmente productos como nitrato de potasio, fosfato cálcico amorfo (FCA) (26) y fluoruro de sodio (27), xilitol, casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) (28), para disminuir la sensibilidad dental después del procedimiento y remineralizar las lesiones erosivas producidas por el blanqueamiento.

Algunos agentes blanqueadores son de activación química pero otros requieren la activación por luz y calor. Las diferentes fuentes de activación por luz son halógenas, halógenas de xenón, arco de plasma, diodo, láser de Argón.

El uso de luz y calor aceleran, la descomposición del peróxido de hidrógeno, el proceso de blanqueamiento y por lo tanto disminuyen el tiempo. Las desventajas son que causan aumento de la temperatura intrapulpar y aumento de la sensibilidad.

En todos estos agentes el pH juega un papel muy importante en la química del agente blanqueador. Un pH muy ácido puede tener efectos adversos sobre la estructura de los tejidos y las células.

1.2.2 Tipos de Blanqueamiento

Los procedimientos de blanqueamiento difieren según el tipo de dientes y su vitalidad. Por lo tanto se establecen protocolos para dientes vitales diferentes a los no vitales.

1.2.2.1 Blanqueamiento de dientes vitales

Es la técnica que se realiza en dientes que conservan la pulpa dental. Los geles de blanqueamiento se aplican sobre la superficie exterior del diente de forma directa o mediante cubetas de plástico.

1.2.2.2 Blanqueamiento de dientes no vitales

El blanqueamiento de dientes no vitales ha sido mostrado como una técnica efectiva y conservadora que tiende a restaurar el color normal del diente tratado endodónticamente.

Para este procedimiento es recomendado el uso de perborato de sodio polvo más agua por la técnica “walking bleach”. La reacción de descomposición del perborato de sodio es lenta y libera lentamente peróxido de hidrógeno con una concentración de 9%, mostrando un margen de seguridad amplio con respecto a otras técnicas (29).

Otro agente que ha sido usado y considerado como seguro, es el peróxido de carbamida al 37% en la técnica “walking bleach” (29). Ya que no se requiere el uso de calor, se reduce el riesgo de reabsorción radicular externa.

1.2.3 Protocolos de blanqueamiento

Podemos establecer tres tipos diferentes de blanqueamiento, según la clínica entre ellos están:

1.2.3.1 Blanqueamiento en consultorio

La técnica de blanqueamiento en consultorio es ampliamente usada por la rapidez del resultado y por la facilidad del procedimiento en una sola cita. La desventaja es que se utilizan agentes blanqueadores de alta concentración (peróxido de hidrógeno de 15%, 30%, 35% y 38,5%), activados químicamente, por luz o por calor que afectan más rápidamente los tejidos y aumentan los efectos deletéreos.

1.2.3.2 Blanqueamiento domiciliario

La técnica de blanqueamiento en casa ha sido uno de los procedimientos estéticos más aceptados, seguros y de bajo costo para los dientes coloreados. Se usan cubetas personalizadas realizadas por el dentista con blanqueadores de baja concentración (peróxido de carbamida de 10 - 22%) durante un tiempo corto (2 - 8 horas), en el día o la noche durante 2 - 6 semanas (Haywood y Heymann 1989, Haywood 2000, Ritter y col 2002).

Las ventajas que tienen este protocolo es que causan menor sensibilidad, disminuyen sus costos y la mayor desventaja es que requiere la mayor colaboración del paciente.

Otras formas son bandas de polietileno impregnadas de peróxido de hidrógeno al 5,3% durante 30 minutos, dos veces al día. Este método es recomendado para realizar mantenimientos de los dientes blanqueados.

1.2.3.3 Blanqueamiento combinado

Técnicas que se realizan combinando tratamientos caseros en la parte inicial y al final tratamientos en consultorio. Son de gran eficacia y menos agresivos para los tejidos dentales.

1.2.4 Efectos de los agentes blanqueadores sobre los tejidos

La aplicación del agente blanqueador sobre los tejidos vivos promueve alteraciones de la superficie, composición química, dureza, resistencia a la fractura (31) y resistencia a la adhesión.

1.2.4.1 Esmalte

La mayoría de los estudios mencionan que los agentes blanqueadores causan cambios micromorfológicos en la superficie y subsuperficie del esmalte, como poros, cráteres, depresiones, microfracturas, erosión asociada a la desmineralización de la sustancia interprismática e intraprismática, pérdida de la capa aprismática de la superficie y desorganización de los cristalitas. Estos cambios se observan inmediatamente después del procedimiento y aún tres meses después de su aplicación.

Adicionalmente, algunos investigadores han encontrado que el microdaño de la superficie y la subsuperficie del esmalte blanqueado está asociado a diferentes factores como el tipo de blanqueador, (32) su concentración (32), el pH (25), agentes químicos adicionales (ácido cítrico, cloruro de sodio, carbopol y glicerina) (25) (33) tiempo de exposición, tipo de dientes, tipo medio usado, el tipo de ensayo y las marcas comerciales (34).

Varios estudios que han utilizado peróxido de carbamida y/o peróxido de hidrógeno durante un tiempo determinado, han puesto de manifiesto la disminución de la dureza (31), microdureza (35) (36) (25) (33) (37), de la resistencia a la fractura (21), de la resistencia tensil (20 - 35%) (21), aumento de la rugosidad (18) y susceptibilidad a la pigmentación (24) (38) y al desgaste, a medida que aumenta la concentración del agente blanqueador y el tiempo de aplicación. Otros por el contrario señalan que esta dureza no se disminuye significativamente (39), aún aplicándola hasta 336 horas y que adicionalmente se tiene a

favor el proceso de remineralización dado por la saliva (40) y el flúor (38).

Sin embargo, la mayoría de los autores concluyen que los agentes blanqueadores de uso casero o en consultorio, causan desmineralización por la desnaturalización de las proteínas, pérdida del contenido mineral del esmalte e incremento de las reacciones radicalarias (peróxido de hidrógeno-alta concentración) (21), pérdida del contenido de calcio (37) (41), fosfato (37) (41), sulfuro, potasio (32), magnesio (42), flúor (42), disminución de la relación calcio- fosfato, (21) (37) disolución del calcio a una profundidad de 1-2 micras (42) - 50 micras (43) aún en presencia de saliva, flúor o haciendo control de placa, (21) disolución de fosfato (42) y aumento del contenido de zinc (42). Como cada elemento en el diente tiene una fuerte afinidad por el oxígeno para formar óxidos, este es más rápidamente ionizado y eliminado del diente cuando está en una solución rica de oxígeno como es el peróxido de hidrógeno (42).

Al no ser el efecto oxidativo específico, los agentes blanqueadores pueden no solamente oxidar los agentes cromógenos si no también atacar la materia orgánica de los dientes. El carácter ácido del pH, por debajo de 5.2 es probablemente la principal causa de la desmineralización del esmalte y reabsorción radicular (44).

Estudios como el de Tezel y col observaron que la pérdida de calcio fue más significativa cuando se usó peróxido de hidrógeno al 35% y 38% que en el peróxido de carbamida al 10% y el grupo control, en dientes humanos (32).

Covington y col, examinaron los cambios en la composición de la superficie del esmalte y de la dentina después de la exposición a un agente blanqueador durante 45 días. A pesar de que ellos observaron una ligera disminución del calcio y de los fosfatos, los autores concluyeron que no existe una alteración de los radicales en su composición (45).

Lee K. H. y col en su estudio en dientes bovinos sobre comportamiento de los elementos inorgánicos después de un

tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% durante 120 horas, por medio de espectrometría atómica de emisión de plasma y cromatografía, observaron una reducción en el contenido de calcio y fósforo, aumento del zinc y disminución de la relación magnesio/calcio de 0,06 en la capa superficial del esmalte 1-2 micras (42).

Estudios similares como el Al-Salehi y col, que midieron la liberación de iones y la microdureza de esmalte y dentina bovina tratadas con peróxido de hidrógeno al 10, 20 y 30% durante 24 horas, observaron el incremento en la liberación de iones a medida que aumenta la concentración, la liberación mayor de calcio que la de fosfato, siendo mayor en la dentina que en el esmalte y una disminución de la dureza (37).

Efeoglu y col estudiaron el efecto desmineralizante del peróxido de carbamida al 10% sobre la superficie y subsuperficie del esmalte a través del método no destructivo de tomografía microcomputarizada. Los resultados revelaron una pérdida significativa de minerales en las primeras 50 micras. No hubo daño en las capas más profundas del esmalte ni en la unión amelodentinal (46). Al contrario, estudios como el de McCracken y Heiwood que midieron la cantidad de calcio perdido al exponer el esmalte a un tratamiento con peróxido de carbamida al 10%, mencionan que la cantidad de calcio perdido es poco significativo y no tiene relevancia clínica (45).

Bistey T. y col, estudiaron por espectroscopia FTIR, las alteraciones producidas en esmalte humano después del tratamiento con peróxido de hidrógeno al 10, 20 y 30% por un tiempo de 30, 60 y 120 minutos. Los resultados mostraron cambios estructurales irreversibles en las bandas de los fosfatos de la superficie del esmalte que fueron proporcionales a la concentración y el tiempo de tratamiento (20).

Servecan F. y col estudiaron por FTIR-Med, los cambios en el contenido mineral, la matriz orgánica y las estructuras proteicas del esmalte y dentina humana tratadas con peróxido de carbamida al 17% y peróxido de hidrógeno al 38%. Los

resultados indican que el peróxido de hidrógeno al 38% causó una significativa desmineralización por la desnaturalización de las proteínas y una disminución de la concentración de las proteínas, los polisacáridos y la relación mineral/proteína. No se observaron cambios cuantitativos ni macromoleculares en la matriz ni en el contenido inorgánico con peróxido de carbamida al 17% (19).

1.2.4.2 Dentina

El peróxido de hidrógeno está asociado a efectos deletéreos sobre la dentina. Las complicaciones incluyen cambios en la superficie de la dentina, alteraciones en la estructura, pérdida de las propiedades mecánicas, incremento de la permeabilidad y reabsorción radicular externa. Se cree que el peróxido de hidrógeno puede causar destrucción de la dentina por la oxidación de las proteínas (47).

Jiang T. y col estudiaron los efectos del peróxido de hidrógeno al 30% sobre la estructura de la dentina humana por espectroscopia FTIR y ATR. Los resultados mostraron que el peróxido de hidrógeno ataca los componentes orgánicos y minerales de la dentina. La destrucción de los componentes orgánicos posiblemente esté asociada a la capacidad oxidativa del peróxido de hidrógeno mientras los cambios en los componentes minerales están asociados a su acidez (47).

Rotstein I y col 1996 a través de análisis histoquímico observaron una disminución de la relación de calcio y fosfato después de los procedimientos de blanqueamiento, la cual fue más significativa en el cemento y la dentina (48).

Estudios como el de Unglu y col demuestran que no hay una disminución significativa de la dureza cuando se aplicó peróxido de carbamida al 10-15% por un tiempo de 4 y 28 horas sobre dentina humana (45).

1.2.4.3 Pulpa

Otros estudios muestran que durante el blanqueamiento dental, el peróxido de hidrógeno al 30-38% (49) o el peróxido de carbamida al 10-35%, debido al bajo peso molecular y a la habilidad de desnaturalizar proteínas, pueden penetrar a través del esmalte, la dentina y reaccionar con el tejido pulpar. De acuerdo con (50), la cantidad de agente blanqueador que penetra la estructura dental depende del espesor del esmalte, de la dentina y la concentración del agente blanqueador (51). Algunos autores mencionan que un espesor grande de dentina es el mejor mecanismo de protección contra los agentes blanqueadores.

Otros estudios han mostrado que los blanqueadores de peróxido de carbamida o peróxido de hidrógeno con alta concentración también son capaces de penetrar la pulpa a través de los espacios de cavidades realizadas en esmalte y restauradas con resina, resina modificada con ionómero o ionómero de vidrio híbrido, (31), (49), (52), siendo la resina modificada con ionómero la que presenta estadísticamente más alta penetración y la menor la resina (16).

Estudios histológicos in vitro han demostrado un daño pequeño e insignificativo en la pulpa después del uso de agentes blanqueadores de alta concentración. Cohen SC y Chase C 1979 (53) observaron que premolares humanos expuestos a peróxido de hidrógeno al 35% no presentaron evidencia histológica de daño pulpar, mostrando pocas alteraciones como moderada vasodilatación y aprisionamiento de los núcleos de los odontoblastos dentro de los túbulos dentinales. Robertson WD Melfi RC 1980 verificaron solamente una ligera respuesta pulpar después de dos aplicaciones de peróxido de hidrógeno al 35% durante 4 días (54).

Sin embargo, Haywood WB 1997 mencionó que el peróxido de hidrógeno al 35% reacciona con la pulpa muy rápidamente. Durante los primeros 15 minutos de exposición penetran 12 veces más que cuando se usa peróxido de carbamida al 10%, pero no se observaron cambios irreversibles pulpares (55).

1.2.5 Efecto de los agentes blanqueadores sobre la resistencia de unión de los materiales restauradores al esmalte y la dentina

Son muchos los aspectos a los que se les ha atribuido la disminución de la resistencia de unión del esmalte y la dentina blanqueados con peróxido de hidrógeno o peróxido de carbamida a la resina. Estos pueden ser las alteraciones superficiales de los cristales de hidroxiapatito, pérdida de la proporción calcio-fosfatos del esmalte, el sobregrabado de la superficie del esmalte, la alteración de la matriz orgánica del esmalte y la dentina por los efectos oxidativos del peróxido de hidrógeno (31) (32), y la disminución del barrillo dentinal (34).

Adicionalmente también puede deberse a la presencia de oxígeno residual en el esmalte y en la dentina, después de completar el tratamiento (29). La liberación de oxígeno puede inclusive interferir en la penetración de la resina dentro del esmalte y de la dentina o inhibir la polimerización de la resina (42), que polimeriza a través de radicales libres. Esto se ha demostrado por la observación de áreas muy amplias de la superficie del esmalte libres de resina y "tags" menos definidos, mas fragmentados y de menor profundidad que en especímenes no blanqueados (31) (56).

Sin embargo Perdigao y col han sugerido que el oxígeno residual no puede ser el responsable de este efecto y que son los cambios en las proteínas y el contenido mineral de la capa más superficial del esmalte los responsables de la reducción en la resistencia de unión (57).

Por el contrario, los datos de los estudios de Sanae y col, demostraron que la reducción de la resistencia al corte es un fenómeno de superficie y que el peróxido de hidrógeno causa desnaturalización de las proteínas del componente orgánico del esmalte - dentina y alterando la proporción orgánica/inorgánica por el incremento del componente inorgánico (29).

1.2.5.1 Esmalte

La mayoría de los estudios que utilizaron peróxido de hidrógeno del 25-35%, mostraron que tanto la resistencia de unión, resistencia al corte (58) (56) y la resistencia tensil de todas las resinas compuestas probadas, se disminuyó, cuando se realizó inmediatamente o después de 1, 7, 14 o 21 días (58) de la aplicación del agente blanqueador y se incluyó el grabado ácido dentro de sus pasos.

Algunos estudios han investigado cuál es el tiempo apropiado para realizar el proceso de adhesión de las resinas, una vez que se ha hecho el protocolo blanqueamiento con peróxido de hidrógeno del 25-35%. Ellos han concluido varios tiempos, después de 24 horas, 1 semana, 2 semanas. Aunque se ha observado que a la semana no es un tiempo muy apropiado para realizar una óptima adhesión, el peróxido se libera completamente del hidrógeno en el esmalte blanqueado (31).

La recomendación clínica es la colocación de la restauración de resina o ionómero a las 3 semanas después de haber finalizado el tratamiento de blanqueamiento. Si se realiza antes de este tiempo se sugiere limpiar la cavidad con catalasa o ácido ascórbico al 10% que puede disolver los remanentes de peróxido (31) (58).

Sólo unos pocos estudios soportan la premisa que la adhesión de la resina al esmalte blanqueado y sus propiedades de adhesividad no son afectadas, después de realizar un protocolo de blanqueamiento extracameral (31) o intracameral (58) con peróxido de hidrógeno.

Estudios realizados con peróxido de carbamida del 10% - 20% (31), 37% (29) mostraron una reducción en la resistencia de unión similar. Por lo tanto se recomienda esperar un tiempo para realizar el proceso de adhesión de la resina en dientes que han sido blanqueados con peróxido de carbamida. Este tiempo oscila entre 1 día, 3-7 días (56), 14 días (29) y 3 semanas (31).

También se debe tener en cuenta el efecto del ácido fosfórico sobre el esmalte blanqueado y si afecta la adhesión de los materiales restauradores. En el estudio de De Madeiros y col observaron que en los especímenes de esmalte blanqueados con peróxido de carbamida al 30% y grabados con ácido fosfórico al 37%, a las 0, 24, 48, 72 horas y 7 días después, que a medida que el grabado ácido se hace más pronto, más calcio se pierde durante el grabado ácido, siendo crítico hasta los 7 días. Que la cantidad de calcio perdido se aumenta a medida que aumenta el tiempo de grabado y la más alta tasa de pérdida se presenta durante los primeros 30 segundos (43).

El efecto del agente de adhesivo sobre la resistencia de unión de la resina al esmalte blanqueado con peróxido de carbamida también depende del tipo de adhesivo utilizado. La controversia es si los adhesivos a base de acetona son capaces de revertir los efectos negativos del peróxido de carbamida sobre el esmalte. Autores como Sung y col (59) han publicado que los adhesivos que tienen como vehículo la acetona ayudan a la resistencia de unión del esmalte blanqueado y no blanqueado. Por otro lado otros autores mencionan que los adhesivos con acetona como vehículo y otros disolventes como agua, acetona o alcohol fueron capaces de reducir significativamente los efectos de los blanqueadores sobre la resistencia de unión del esmalte blanqueado-resina (31).

Varios estudios han demostrado que el efecto de disminución de la resistencia de unión que se da en los dientes blanqueados, puede ser revertido con el uso previo de un antioxidante como el ascorbato de sodio, antes de realizar la adhesión (56).

1.2.5.2 Dentina

Existen pocos estudios que muestran la resistencia de unión de la dentina (21) a la resina cuando se ha tratado con peróxido de hidrógeno o peróxido de carbamida.

Algunos estudios mencionan que la reducción de la resistencia de unión fue similar a la presentada en el esmalte, 7 días después de la aplicación del blanqueador.

Jerindoba y col mencionan que el uso de peróxido de carbamida en dos concentraciones (10% y 22%) sobre dentina radicular, provoca una significativa reducción en la microdureza, pero no en la rugosidad superficial (35).

Los resultados del estudio de Sanae y col, sobre blanqueamiento de dientes no vitales, muestran que la resistencia de unión al corte retorna a valores similares una semana después de haber recibido tratamiento blanqueador con perborato de sodio y que el peróxido de carbamida al 37% no altera la resistencia al corte. Una posible explicación de los resultados es que el substrato dentinal es poroso y los residuos de peróxido pueden liberar el oxígeno más fácilmente (29).

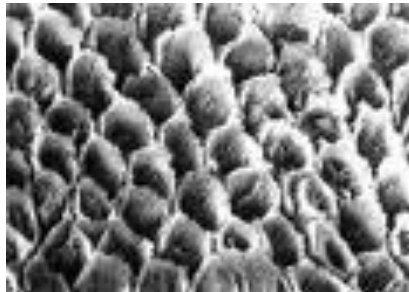
1.3 DESMINERALIZACIÓN DE ESMALTE

Se define como disminución o pérdida elementos minerales del esmalte por el ataque ácido interno o externo dado en diferentes procesos como caries, erosión, adhesión, cementación y blanqueamiento.

La desmineralización se inicia por la protonación del fosfato dentro de la apatita en el esmalte, finalizando con la pérdida de calcio (60).

1.3.1 Desmineralización por ácido fosfórico

Figura 1.9 Microfotografía por SEM de esmalte dental grabado con ácido fosfórico. Tomada de la dirección electrónica bp0.blogger.com/.../s320/esmalte+grabado.jpg.



El grabado de la superficie del esmalte o acondicionamiento del esmalte durante los procesos de adhesión es una técnica importante en la práctica clínica. El uso de selladores de fosetas y fisuras, adhesión de materiales restaurativos y cementación requieren el grabado ácido (1).

El proceso lleva a cabo dos efectos deseados, primero la eliminación de la placa y segundo el incremento de la porosidad de la superficie expuesta a través de la disolución selectiva de cristales, los cuales permiten una mejor superficie adherente para el adhesivo y el material restaurativo (1).

La microscopía electrónica de barrido demuestra físicamente los efectos del grabado ácido sobre la superficie del esmalte, donde predominan tres patrones de grabado ácido. El más común es el tipo I caracterizado por la modificación interna del cristal, tipo II la sustancia interprismática y el tipo III la combinación de los dos anteriores de forma irregular e indiscriminada (1).

Todavía existe el debate del porqué el grabado ácido produce diferentes patrones. La explicación más común es que el tipo de grabado ácido depende de la orientación cristalina. Estudios ultraestructurales de la disolución cristalina indican que los cristales se disuelven más rápidamente por sus terminaciones que por sus lados. Por lo tanto los cristales que corren perpendicular a la superficie del esmalte son los más vulnerables. El tipo I de grabado ácido puede ser explicado fácilmente porque los cristales que alcanzan la superficie del esmalte tienen diferentes inclinaciones en el prisma, comparados con la sustancia interprismática (1).

Los patrones observados durante el ataque ácido también reflejan divisiones dentro de los cristales del esmalte. Esto presume que los minerales que se fusionan entre las nanofibrillas y sus grupos funcionales son más vulnerables al ataque ácido (3).

1.3.2 Desmineralización por agentes blanqueadores

Muchos métodos innovadores y el uso de técnicas de espectroscopia pueden darnos una información efectiva sobre los efectos de la desproteínización y predecir el origen de la señal nativa.

Fatibene y col en 2005 realizaron un estudio comparativo de esmalte y dentina sin tratamiento y tratados con dos métodos químicos de desproteínización por RPE (Resonancia paramagnética electrónica), Raman e infrarrojos (IR). Para el esmalte y la dentina no tratadas, los resultados obtenidos por las técnicas de Raman e IR demuestran que la presencia de un

componente orgánico (bandas de amidas) es evidente tanto en esmalte como en dentina. El tratamiento de desproteización alcalina elimina las bandas asociadas al componente orgánico tanto del esmalte como en dentina (13).

Jiang T y col en 2007 investigaron el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la estructura de la dentina humana usando espectroscopia infrarroja transformada de Fourier y reflexión atenuada total. Los resultados mencionan que el peróxido de hidrógeno ataca el contenido orgánico y mineral de la dentina. La destrucción del componente orgánico probablemente se debe a la capacidad oxidativa del peróxido de hidrógeno, mientras los cambios minerales probablemente se deben a su acidez (47).

Wang y col en 2009 estudiaron el efecto in vitro de productos blanqueadores a base de clorito de sodio, sobre las propiedades físico-químicas del esmalte. Primero se compararon los cambios morfológicos y estructurales de la superficie por SEM, ATR-IR y después se observaron los cambios microquímicos por Microsonda electrónica de barrido - EPMA (SEM Analítico), espectroscopia ATR-IR y Raman, espectrometría de absorción atómica con llama (F-AAS) técnica de fluorescencia de rayos X por reflexión total (TXRF). Los resultados demostraron que tiene varios efectos deletéreos sobre el esmalte, eliminación del componente orgánico de la capa superficial y profunda ($> 100 \mu$), formación de poros, microfracturas y erosión de la superficie, daño de la estructura atómica de la apatita en la subsuperficie del esmalte por el rompimiento de las uniones Ca-O las cuales facilitan la liberación de calcio (4).

1.4 REMINERALIZACIÓN

Remineralización es el proceso de precipitación de calcio, fosfatos y otros iones en el esmalte parcialmente desmineralizado. Los iones pueden proceder de la disolución de tejido desmineralizado, de una fuente externa o la combinación de ambas.

Se ha demostrado que el factor primario que determina el desarrollo y la reversibilidad del proceso de desmineralización es el nivel de saturación termodinámica del medio en el que está el diente. (46) La remineralización de la superficie y subsuperficie desmineralizada requiere calcio y fosfato, los cuales son proporcionados inicialmente por la saliva, pero también se puede dar por la incorporación de iones como el flúor dentro del cristal o por la absorción de este por el cristal.

Existen diferentes técnicas para medir el estado de mineralización del esmalte. Métodos cuantitativos físicos o químicos pueden medir la ganancia o pérdida de minerales. Comúnmente las técnicas usadas son la microradiografía transversal (TMR) (41), métodos de microdureza, microtomografía microcomputarizada, método de atenuación de rayos X, microscopía de fuerza atómica (46).

Muchos investigadores han dedicado la mayoría de sus trabajos a determinar cual sería el mecanismo más efectivo para lograr la remineralización del esmalte y de la dentina una vez que estos han recibido un tratamiento blanqueador.

Se ha demostrado que la saliva (25) y la aplicación tópica de flúor (56) (20) (35), revierte los efectos de la desmineralización disminución microdureza (36) e inhiben la pérdida de minerales (60) causados por los agentes blanqueadores sobre el esmalte (60) y la dentina, pero nunca se llega a los valores iniciales antes del blanqueamiento.

Estudios de Turkun, han mostrado que el uso de agentes antioxidantes como el ácido ascórbico y sus sales (ascorbato de sodio 10%), son capaces de reducir variedad de componentes oxidativos especialmente los radicales libres y restaurar la resistencia de unión al corte del composite al esmalte y la dentina. La posible explicación del mecanismo de restauración está dada por Turkun M y col, quienes mencionan que los radicales peróxidos son substituidos por los hidroxilo de la apatita produciendo la peróxido-apatita. También demostraron que cuando los iones peróxido se descomponen se sustituye por

completo el radical hidroxilo por la apatita, dando como resultado la eliminación de los cambios estructurales dados por la incorporación de los iones peróxido (56).

Adicionalmente se le han agregado a los agentes blanqueadores otros productos como el nitrato de potasio, fosfato cálcico amorfo (FCA) (26) y fluoruro de sodio (27), xilitol, casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate (CPP–ACP) (28). Las diferencias entre los diferentes resultados de los estudios dependen del método de medición, el grado de desmineralización del esmalte blanqueado y medio de inmersión. (61). Por ejemplo, estudios como el de Da Costa y Mazur (36), Tschoppe y col (41) demuestran que la presencia de fluoruro, nitrato de potasio o fosfato cálcico amorfo no previenen la disminución de la dureza y ni tampoco muestran que sea restablecida después del tratamiento con agentes blanqueadores caseros. Por el contrario, Attin y col (27) observaron que blanqueadores con peróxido de carbamida al 10% y flúor, seguidos de tratamientos de desmineralización y remineralización con saliva recuperan los valores iniciales de microdureza después de 8 días.

Actualmente se están estudiando los efectos de la combinación de peróxido de hidrógeno, combinado con hidroxiapatito sintético para la remineralización de la estructura y recuperación de las propiedades del esmalte. Como el hidroxiapatito sintético es una sal alcalina, esta puede aumentar los valores del pH cuando se mezcla con peróxido de hidrógeno. El incremento del pH puede reducir los efectos desmineralizantes del peróxido de hidrógeno y facilitar el procedimiento de blanqueamiento por la aceleración en la formación de radicales libres (44).

Jiang Tao y Col evaluaron el efecto de la combinación de peróxido de hidrógeno con hidroxiapatito sintético sobre la morfología, el color y la microdureza del esmalte dental. Los resultados por SEM, FTIR y XRD mostraron que la hidroxiapatito sintético fue incorporada dentro del esmalte con un tamaño de nanopartícula y fue estructural y químicamente similar al esmalte natural. El tratamiento combinado de peróxido de hidrógeno e hidroxiapatito sintético podría reducir significativamente la pérdida de dureza del esmalte y mantener su morfología (44).

Basados en estudios previos, autores como Fan Yuwei y col 2009 han implementado una remineralización modificada por biomiméticos tratando de aproximarse a la reconstrucción de la superficie de esmalte que ha sido grabado con ácido durante procesos como caries inicial o mancha blanca. Ellos encontraron que al aplicar la solución biomiméticas mineralizadora (amelogenina y/o flúor) se formó una capa de cristales organizada de fosfato cálcico en la superficie del diente. Por otro lado el flúor tiene un efecto significativo sobre el fosfato cálcico en la remineralización de los cristales y genera un crecimiento de los nanocristales en forma de aguja (10).

2. OBJETIVOS

GENERAL

Estudiar el efecto de diferentes agentes desmineralizantes sobre la composición microestructural del esmalte bovino.

ESPECÍFICOS

Cuantificar mediante espectroscopia de absorción atómica, la cantidad de calcio extraído de la superficie y la subsuperficie de esmalte bovino (0, 25, 50 y 100 μm), tratado con peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones (38,5%, 38% y 30%), tiempos de aplicación (20 minutos, 60 minutos y 72 horas) y con ácido fosfórico al 37% a los 30 y 60 segundos.

Estudiar el efecto del tratamiento con ácido fosfórico en la composición y microestructura del esmalte bovino utilizando técnicas analíticas.

Estudiar el efecto del tratamiento con peróxido de hidrógeno en la composición y microestructura del esmalte bovino utilizando técnicas analíticas.

Estudiar el efecto del tratamiento con peróxido de hidrógeno seguido de ácido fosfórico en la composición y microestructura del esmalte bovino utilizando técnicas analíticas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Figura 3.1 Selección de la muestra de diente bovino.



Mediante una cuidadosa inspección visual se seleccionaron dientes incisivos bovinos, sin signos de caries, fractura o anomalías estructurales o de desarrollo. Los dientes fueron almacenados en solución de agua destilada saturada con cristales de timol al 1% y refrigerados a 6° C.

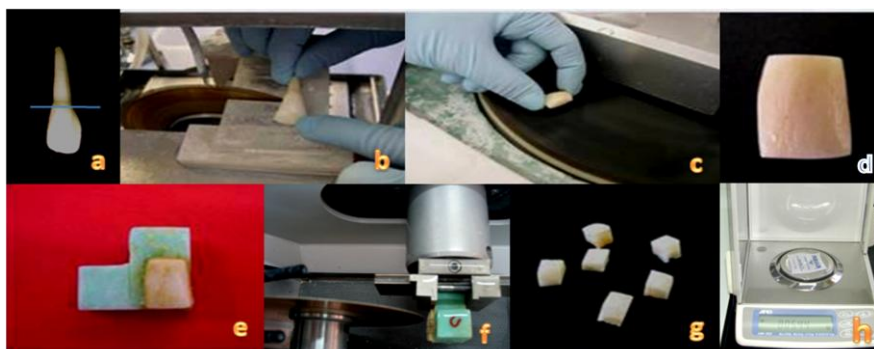
3.2 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Muestra fragmentada

Cada diente seleccionado (a) fue seccionado con un micrótopo Accutom-50 (Accutom Hard Tissue Microtome, Struers, Ballerup, Denmark) a nivel de la unión amelodentinal dejando separado la raíz de la corona (b). La parte coronal se cortó en sentido transversal de manera que se obtuvieron dos fragmentos: uno vestibular y uno palatino. (c) El fragmento vestibular fue pulido en una pulidora con discos de EXAKT, dejando una muestra plana y de superficies paralelas (d) Posteriormente la muestra se pegó

con cera a una base de acrílico (e) y se cortó de manera que se obtuvieran fragmentos de 4x4 mm con un micrótopo Accutom 50 microtome (Accutom Hard Tissue Microtome Struers, Ballerup, Denmark)(f). De cada diente se seleccionaron 6 especímenes (g), los cuales fueron pulidos en su superficie interna con discos de papel de lija de 600 (WS-18B), pesados con una balanza de precisión (Sartorius BL60S Mugió, Italy) (h) con el fin de estandarizar su peso (0,08 gramos) y se analizaron con el estereomicroscopio para comprobar la pureza del esmalte. Finalmente, las muestras así preparadas de cada diente se almacenaron en un recipiente rotulado con solución de timol al 1% y se refrigeraron 6°C.

Figura 3.2 Proceso de obtención de la muestra fragmentada.



Muestra pulverizada

Figura 3.3 Proceso de obtención de la muestra pulverizada.



Se tomaron varios fragmentos de esmalte de diversos dientes, se secaron en una estufa a 150° C durante 24 horas. Posteriormente

se molturaron en un mortero de ágata, hasta obtener un polvo fino. Con el objeto de homogenizar el tamaño de partícula, la muestra se tamizó con tamices de acero CISA de luz de malla 250 μ , 200 μ , 150 μ y 100 μ de tamaño de poro, y finalmente se seleccionó la fracción 2 para realizar los diferentes ensayos.

Fracción 1 <250 μ > 200 μ

Fracción 2 <200 μ > 150 μ

Fracción 1 <150 μ > 100 μ

Fracción 1 <100 μ

3.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

En la tabla 3.1 se describen los tratamientos realizados en las muestras, así como las técnicas utilizadas para su caracterización. Se realizaron cinco ensayos diferentes con objeto de determinar el efecto del ácido fosfórico y/o peróxido de hidrógeno sobre las muestras seleccionadas.

Tabla 3.1 Resumen de ensayos realizados.

Número de ensayo	Título de ensayo	Tipo de muestra utilizada	Tratamiento de la muestra	Técnica de análisis químico utilizada
Ensayo 1	Efecto del peróxido de hidrógeno y el ácido fosfórico de alta concentración sobre la capa superficial y subsuperficial de esmalte bovino parte I	Muestra sólida sumergida en resina	Superficie de esmalte blanqueada con peróxido de hidrógeno de alta concentración durante el tiempo indicado por las casas fabricantes y a las 24 horas grabada con ácido fosfórico al 37%	Absorción atómica
	Efecto del peróxido de hidrógeno y el ácido fosfórico de alta concentración sobre la capa superficial y subsuperficial de esmalte bovino parte II	Muestra sólida sumergida en resina	Superficie de esmalte blanqueada con peróxido de hidrógeno de alta concentración durante 72 horas y a las 24 horas grabada con ácido fosfórico al 37%	Absorción atómica
Ensayo 2	Análisis microquímico del efecto del ácido fosfórico sobre esmalte bovino	Polvo de esmalte y muestra fragmentada	Esmalte en fase sólida y en polvo tratado con ácido fosfórico al 37% y 0,1%	Absorción atómica, Infrarrojos, FTIR, Adsorción de gases, SEM
Ensayo 3	Análisis microquímico del efecto del peróxido de hidrógeno sobre esmalte bovino	Polvo de esmalte y muestra fragmentada	Esmalte en fase sólida y en polvo tratado con peróxido de hidrógeno al 30%	Absorción atómica, Infrarrojos, FTIR, Adsorción de gases, SEM
Ensayo 4	Análisis microquímico del efecto del peróxido de hidrógeno y el ácido fosfórico sobre esmalte bovino	Polvo de esmalte y muestra fragmentada	Esmalte en fase sólida y en polvo tratado con peróxido de hidrógeno al 30% y ácido fosfórico al 37% y 0,1%	Absorción atómica, Infrarrojos, FTIR, Adsorción de gases, SEM

3.3.1 Ensayo 1: Efecto del peróxido de hidrógeno y el ácido fosfórico de alta concentración sobre la capa superficial y subsuperficial de esmalte bovino

3.3.1.1 Parte I

Esmalte tratado primero con peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones 38 y 30% durante 20 y 60 minutos respectivamente y posteriormente con ácido fosfórico al 37% durante 30 y 60 minutos.

Figura 3.4 Montaje de muestras sólidas en discos de resina.



La cara intacta de esmalte de cada muestra, se pegó con cera Utility® en la parte central de un molde de silicona, que luego se rellenó con resina acrílica Implex®, hasta obtener discos de 12 mm de diámetro por 3 mm de ancho. La preparación de la resina se realizó de la siguiente forma: para preparar 10 ml se le agregaron, 4,5 gotas de acelerador y 10 gotas de endurecedor. Una vez que se terminó el proceso de polimerización de la resina se pulieron los discos con lija de papel N° 500 hasta 1500 por las dos caras hasta obtener superficies lisas. Se determinó un punto para la medición y se calibró su espesor.

Los especímenes se etiquetaron con dos números ej.: 1.1, 1.2. El primer número identificó el diente y el segundo el número del espécimen. Todos los especímenes 1 de cada diente formaron el grupo 1 (N=10) y así sucesivamente hasta determinar los tres siguientes grupos:

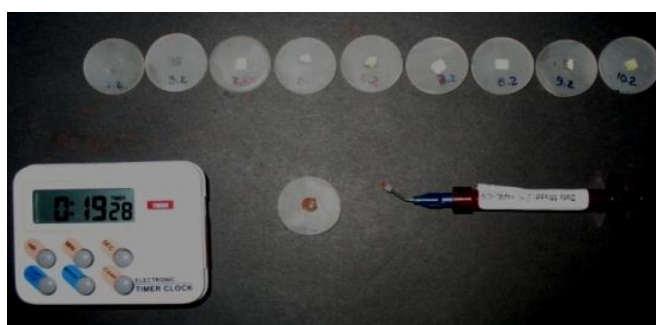
- Grupo 1 (N=10) Control- sin blanqueamiento.

- Grupo 2 (N=10) Peróxido de hidrógeno al 38 % neutro Opalescence Boost Ultradent. Referencia 5332 lote B39LH una capa de 1 mm de espesor durante 20 minutos.
- Grupo 3 (N=10) Peróxido de hidrógeno al 30 % Office Iluminé Dentsplay. Referencia 615.01.810 Lote No 070802 una capa de 1 mm de espesor durante 60 minutos.

Tabla 3.2 Ficha técnica de los materiales utilizados parte 1.

GRUPO	AGENTE	NOMBRE COMERCIAL	CANTIDAD FINAL	ADITIVOS	PH	MÉTODO DE APLICACION	TIEMPO DE APLICACIÓN
1	Grupo control						
2	Peróxido de hidrógeno 38%	Opalescence Boost	mezcla 38%	Nitrato de potasio, flúor	pH 5.5 (Wiegand 2005)	En consultorio Activación química	20 minutos
3	Peróxido de hidrogeno 30%	Office Iluminé	mezcla 15%		pH	En consultorio Activación química	60 minutos

Figura 3.5 Aplicación de agente blanqueador .



Una vez terminado el tiempo de aplicación del agente blanqueador, figura 3.5, se lavaron profusamente todos los especímenes con agua destilada y se almacenaron en 20 ml de agua destilada durante 24 horas.

Figura 3.6 Preparación del ácido fosfórico al 37%.



Posteriormente se prepararon 100 ml de ácido fosfórico al 37%, mediante dilución de 74 ml de ácido fosfórico al 50% (Scharlan Cemise S.A Barcelona España) (a), con 26 ml de agua bidestilada. El pH de la disolución resultante fue de 0.36 medido por un phmetro (Micro pH 2000 Crisol, Alella, Spain). (b) Se tomaron 5 ml de agua bidestilada (solución blanco 1), 5 ml de la solución de ácido fosfórico al 37 % (Solución blanco 2). Un disco de resina sin especimen se sumergió en 20 ml de ácido fosfórico al 37 % y se tomó una alícuota de 5 ml a los 30 segundos (solución blanco 3) y otra alícuota de 5 ml a los 60 segundos (solución blanco 4).

Figura 3.7 Tratamiento con ácido fosfórico de los especímenes y recolección de la alícuota.



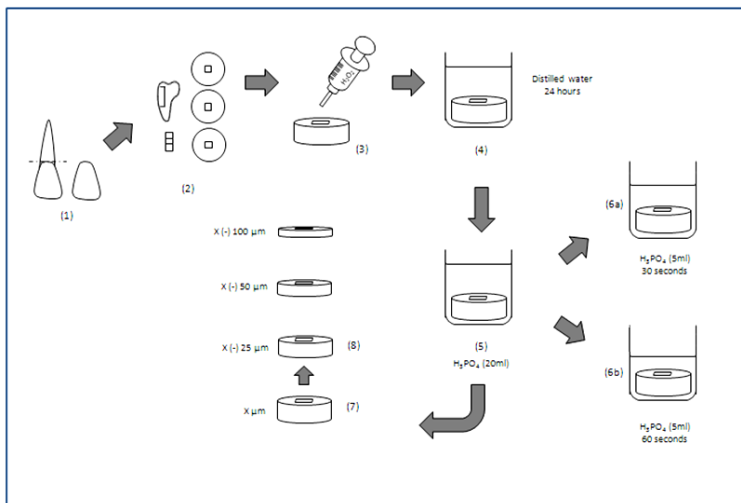
A las 24 horas se realizó el grabado ácido de todos los especímenes de los tres grupos, incluyendo el control. A cada especimen se le hizo el procedimiento de la siguiente manera: cada especimen se sumergió en 20 ml de una disolución de ácido fosfórico, manteniéndolo con agitación constante en un agitador magnético (MS 3000 Boeco Germany). A los 30 segundos se tomaron 5 ml con una micropipeta calibrada y punta desechable y luego a los 60 segundos se tomaron otros 5 ml (e). Las muestras líquidas se almacenaron en recipientes de vidrio oscuro y fueron

selladas etiquetadas y enumeradas. Los especímenes se lavaron profusamente y fueron almacenados en agua destilada.

Posteriormente, a cada uno de los especímenes se le rectificó su espesor inicial con un calibrador digital (Mytutoyo No 293-561 Japan), se le hizo un desgaste de 25 micras manual con discos de papel de lija 400, se lavaron profusamente, se midió de nuevo su espesor con un calibrador y se hizo el grabado ácido.

Este procedimiento se repitió sucesivamente en todos los especímenes con desgaste progresivo de 50 y 100 micras. Figura 3.8.

Figura 3.8 Resumen de los procedimientos. 1) La raíz fue seccionada en la unión ameloementaria . 2) De la corona se obtuvieron 3 especímenes de esmalte de 4x4 mm y fueron incluidos en resina acrílica. 3) Los especímenes fueron blanqueados con peróxido de hidrógeno. 4) Los especímenes fueron almacenados en agua destilada durante 24 horas. 5) Los especímenes se sumergieron en una disolución de ácido fosfórico al 37%. 6) A los 30 s and 60 s, se tomaron alícuotas de 5-mL con una micropipeta calibrada. 7) El espesor del espécimen se midió con un micrómetro. 8) Los especímenes fueron desgastados 25 μm y luego se sumergieron en solución de ácido fosfórico al 37%. Este procedimiento se repitió para las profundidades de 50 y 100 μm .



De esta manera se obtuvieron 240 alícuotas y 4 blancos, que fueron enviados al Centro de Instrumentación Científica para medir la concentración de calcio por Espectrofotometría de Absorción Atómica.

3.3.1.2 Parte II

En este segundo ensayo, se repitieron los mismos procedimientos anteriores con la diferencia de que el tratamiento se realizó durante 72 horas seguidas recambiando el material cada 24 horas.

Los grupos se determinaron de la siguiente forma:

- Grupo 4 (N=10) Control.
- Grupo 5 (N=10) Peróxido de hidrógeno al 38% neutro Opalescence Boots Ultradent. Referencia 5332 lote B39LH una capa de 1 mm de espesor durante 72 horas haciendo un recambio del material cada 24 horas.
- Grupo 6 (N=10) Peróxido de hidrógeno al 38,5%. Polaoffice + SDI. Referencia 7700416 una capa de 1 mm de espesor durante 72 horas haciendo un recambio de material cada 24 horas.

Tabla 3.3 Ficha técnica de los materiales utilizados parte II.

GRUPO	AGENTE	NOMBRE COMERCIAL	CANTIDAD FINAL	ADITIVOS	pH	APLICACION	TIEMPO DE APLICACION
5	Peróxido de hidrogeno 38 %	Opalescence Boots	mezcla 38%	Nitrato de potasio 3% y flúor 1%	pH 5.5 (Wiegand 2005)	En consultorio Activación química	72 horas con recambio cada 24 horas
6	Peróxido de hidrogeno 38,5 %	Polaoffice+	mezcla 38,5%	Nitrato de potasio y flúor		En consultorio Activación química	72 horas con recambio cada 24 horas

De este ensayo se obtuvieron 240 alícuotas que también se enviaron al Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada para determinar la concentración de calcio mediante la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica.

3.3.2 Ensayo 2: Análisis microquímico del efecto del ácido fosfórico sobre esmalte bovino

En este tercer ensayo se tomaron los dos tipos de muestras sólidas (fragmentada y pulverizada) para el tratamiento con ácido fosfórico y se caracterizaron mediante absorción atómica, espectroscopia infrarroja, Raman y adsorción de gases.

Tratamiento de esmalte pulverizado

Se tomó un tubo Eppendorf al cual se le comprobó su peso inicial (Po) en una balanza AND (SER 13502944 Japan), se le agregaron 30 mg de esmalte pulverizado fracción 2 (200-150 μ) y se volvió a pesar el tubo con el material (Pf).

Luego se le añadió 1 ml de H₃PO₄ al 0,1% (Panreac 50% PA). Al minuto se tomó con una pipeta microcalibrada (BOE 9220500 Boeco Germany), 0,5 ml del sobrenadante, a continuación se lavó con 10 ml de agua bidestilada y se centrifugó en una centrífuga (EBA 21 Hettich Zentrifugen Germany) a 2000 rpm durante dos minutos. Este procedimiento se repitió dos veces hasta pH neutro.

El residuo sólido se secó en una estufa J P Selecta S.A Barcelona Spain a 150°C durante 24 horas. Una vez finalizado el tiempo, se sacó de la estufa, se dejó enfriar y se pesó nuevamente el tubo después del tratamiento (Pdt) y se almacenaron en tubos Eppendorf.

Todos estos procedimientos se repitieron a los 2, 3, 5, 10,15, 30, 60, 90, 120 y 1440 minutos de tratamiento con H_3PO_4 al 0,1%. Esta serie se repitió a su vez cuatro veces.

A una alícuota de 0,5 ml tomada en el tiempo X de tratamiento se le agregaron 4,5 ml de agua destilada. Las muestras se enviaron al Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada para determinar la concentración de calcio por Espectrofotometría de Absorción Atómica.

Así mismo, las muestras se analizaron también por espectroscopia infrarroja, FTIR y Raman.

Tratamiento de esmalte fragmentado

Se tomaron dos muestras. Una de ellas con varios fragmentos y un peso 0,400 g sin tratamiento, fue utilizada como blanco. La otra muestra, con el mismo número de fragmentos y del mismo peso fue tratada con H_3PO_4 al 37% (Scharlan Cemise S.A Barcelona España) durante 30 segundos, luego lavada con agua bidestilada y secada con papel absorbente.

Las muestras fueron rotuladas y enviadas al Laboratorio de Adsorción de Gases del Departamento de Química Orgánica para su caracterización por adsorción de gases.

3.3.3 Ensayo 3: Análisis microquímico del efecto del peróxido de hidrógeno sobre esmalte bovino

Se repitieron los mismos procedimientos del ensayo anterior, pero las muestras se trataron con peróxido de hidrógeno de concentraciones 30 y 38%.

Tratamiento de muestra pulverizada

30 mg de polvo de esmalte se trataron con 1 ml de peróxido de hidrógeno al 30% w/w extrapuro SHARLAU durante 5 minutos, se repitieron los mismos pasos que el caso anterior y todas las muestras fueron caracterizadas mediante absorción atómica, espectroscopia infrarroja, FTIR y Raman.

El tratamiento con peróxido de hidrógeno se repitió a los 20, 60, 90 y 120 minutos completando una serie. Se realizaron en total 4 series.

Tratamiento de muestra fragmentada

Se tomaron dos muestras, cada una de 0,400 g de esmalte fragmentado. La primera muestra se trató con peróxido de hidrógeno al 38% en gel Boots de Ultradent durante 20 minutos y la segunda muestra se trató con peróxido de hidrógeno al 30% w/w extrapuro SHARLAU líquido durante 20 minutos.

Una vez obtenidas las muestras tratadas se enviaron al Laboratorio de Adsorción de Gases del Departamento de Química Inorgánica para análisis por absorción de gases.

3.3.4 Ensayo 4: Análisis microquímico del efecto del peróxido de hidrógeno y el ácido fosfórico sobre esmalte bovino

Este ensayo consistió en la aplicación de peróxido de hidrógeno seguido por el ácido fosfórico a diferentes concentraciones y tiempos.

Tratamiento de muestra pulverizada

Se tomó un tubo de ensayo (Eppendorf-Spain) se pesó (Po) en una balanza AND (SER 13502944 Japan), se le agregaron 30 mg de esmalte fracción 2 (150-200 μ) y nuevamente se volvió a pesar con el material (Pf).

Se le añadió 1 ml de H₂O₂ al 30% (Panreac 50% PA). A los 5 minutos se lavó agregando 10 ml de agua bidestilada y se centrifugó en una centrífuga (EBA 21 Hettich Zentrifugen Germany) a 2000 rpm durante dos minutos. Se continuó lavando hasta obtener pH neutro.

La muestra filtrada se secó dentro de un tubo de ensayo en una estufa J P Selecta S.A Barcelona Spain a 150°C durante 24 horas. Se sacó de la estufa, se dejó enfriar y se pesó nuevamente el tubo después del primer tratamiento (Pdt).

Posteriormente, se sometió al tratamiento de grabado ácido agregando 1 ml de H₃PO₄ al 0,1% durante 30 segundos. Una vez finalizado el tiempo se tomó con una pipeta microcalibrada (BOE 9220500 Boeco Germany), 0,5 ml del sobrenadante, se colocó en un vial de vidrio y el sólido se lavó hasta pH neutro.

El residuo sólido se secó en una estufa J P Selecta S.A Barcelona Spain a 150°C durante 24 horas para eliminar todo resto de humedad. Se sacó de la estufa, se dejó enfriar y se pesó nuevamente el tubo después del tratamiento (Pdt) y se almacenaron en tubos Eppendorf.

El procedimiento de blanqueamiento con H₂O₂ se repitió durante de 20, 60, 90 y 120 minutos y posteriormente se grabó con H₃PO₄ al 0,1% durante 30 segundos.

La otra serie se realizó con los mismos tiempos de blanqueamiento pero en este caso el tiempo de grabado ácido con H₃PO₄ fue de 5 minutos.

A una alícuota de 0,5 ml tomada en el tiempo X de grabado, se le agregaron 4,5 ml de agua destilada. Cada muestra fue revisada,

rotulada y enviada al Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada para determinar la concentración de calcio mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica.

Las muestras también se analizaron mediante espectroscopia infrarroja, FTIR y Raman.

Tratamiento de muestra fragmentada

Se tomaron 4 muestras, cada una con fragmentos que daban un peso final de 0,400 g de esmalte bovino. Se trataron con H_2O_2 al 30% durante 5, 20, 60, 90 y 120 minutos. Se lavaron las muestras, después se sometieron al grabado ácido con H_3PO_4 al 37% durante 30 segundos, se lavaron y se secaron en una estufa a 150°C.

Las muestras tratadas fueron enviadas al Laboratorio de Adsorción de gases del Departamento de Química Inorgánica para análisis por adsorción de gases.

3.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS

A continuación describiremos brevemente cada una de las técnicas analíticas empleadas y el método de tratamiento de datos.

3.4.1 Espectrometría de Absorción Atómica (EAA)

Cuando un conjunto de átomos se expone a una fuente de energía, únicamente una parte de estos sufre un proceso de absorción de dicha energía y por lo tanto de excitación y la otra parte permanece en estado fundamental. La espectrometría de absorción atómica permite cuantificar indirectamente la fracción de átomos no excitada. Para ello, los átomos presentes en una

muestra son sometidos a una fuente de radiación electromagnética de la longitud de onda deseada, y que es característica del elemento que se desea medir. Los átomos de la muestra que se hallan en estado fundamental absorben una cantidad de esta energía directamente proporcional a su concentración. Posteriormente, se recoge la potencia radiante de la radiación electromagnética que emerge de la muestra, es decir que no ha sido absorbida por ella, y se resta de la que fue suministrada inicialmente por la fuente (62).

Por lo tanto la Espectrometría de Absorción Atómica (EAA) es una técnica que se emplea para determinar la composición de elementos inorgánicos de una muestra. EEA se basa en el principio de atomizar la muestra y la posterior cuantificación de la concentración de átomos que aparecen en la fase gaseosa, midiendo la intensidad de luz absorbida en determinadas longitudes de onda (63).

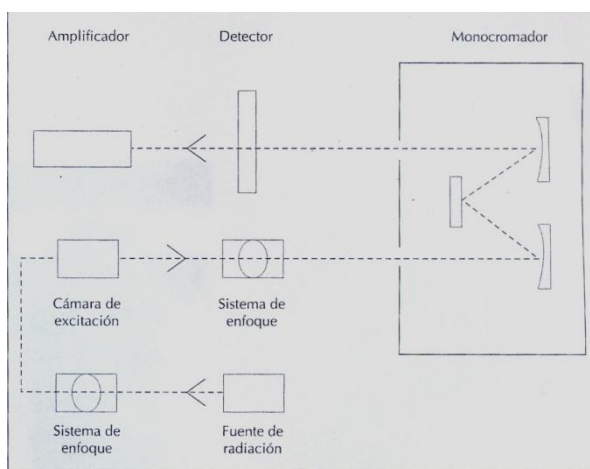
Un aspecto fundamental en la EAA es el método empleado para atomizar la muestra a analizar, ya que éste determinará la sensibilidad de la medida de la técnica. Entre los diferentes métodos utilizados se incluyen el de llama, con cámara de grafito, electro-térmico, horno de plasma y atomización hidro-vapor (64). Normalmente, el procedimiento emplea llama para transformar las soluciones a analizar en átomos gaseosos.

La EAA se utiliza comúnmente para análisis cuantitativos de elementos en un breve período de tiempo. La cuantificación del elemento se realiza mediante la elaboración previa de la recta de calibrado con los patrones más adecuados, en número y concentración, utilizando como blanco la mezcla empleada en la puesta en disolución de la muestra o disolvente de la disolución (65). El límite de detección, en condiciones favorables, es del orden de algunas decenas de partes por billón. No obstante este límite podrá variar según la naturaleza del analito y de la matriz o del tipo de instrumentación empleada (16).

La espectrometría de absorción atómica, requiere en primer lugar, de una fuente de radiación electromagnética que será dirigido hacia la muestra, en segundo lugar, es preciso que el

elemento de la muestra cuya concentración se desea medir se halle disociado en átomos susceptibles de absorber dicha radiación. Por último se requiere de un detector que pueda recoger la radiación no absorbida. Evidentemente, como cualquier sistema de medida la espectrofotometría de absorción atómica requiere un sistema de calibración en virtud del cual la señal obtenida pueda ser transformada en concentración del elemento a cuantificar Figura 3.9 (62).

Figura 3.9 Esquema del trayecto seguido por el haz óptico en la espectrometría de absorción atómica. Tomado del libro *Bioquímica Clínica y Patología Molecular* (62).



Es así como el equipo de espectroscopia de absorción atómica, consiste en un sistema generador de radiaciones características del elemento que se desea analizar y un mecanismo de obtención de átomos en estado fundamental. La necesidad de aislar una determinada longitud de onda, a la que se produce la absorción, del resto de radiaciones de múltiples longitudes de onda que escapa de cada elemento, implica el disponer de un sistema de monocromación. Las radiaciones deben ser conducidas desde el sistema de obtención de señales características hasta el monocromador y desde éste al detector, lo que requiere, un sistema óptico, consistente en lentes, espejos, rendijas, etc., más o menos complejo dependiendo de las prestaciones exigidas al equipo.

La radiación resultante debe ser detectada, amplificada y medida por medio de los componentes del sistema electrónico. El conjunto de todo esto constituye el equipo de medida (65).

Preparación de la muestra

Para cada muestra en estado líquido hay que realizar una recta patrón del elemento a analizar con la lámpara adecuada. En absorción atómica existe una fuente independiente de luz monocromática, específica para cada elemento a analizar y que se hace pasar a través del vapor de átomos, midiéndose posteriormente la radiación absorbida.

Equipo

Figura 3.10 Equipo para análisis por espectroscopía de absorción atómica. Centro de Instrumentación Científica. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.

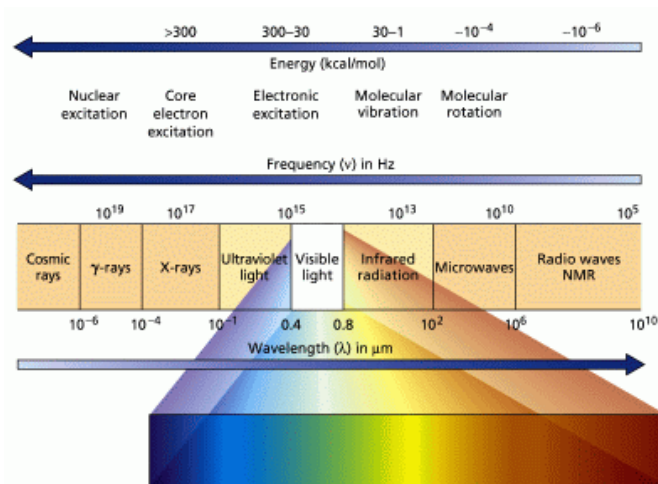


Registro y análisis

A partir de las ppm medidas por espectrómetro, se calcularon los mg totales de calcio, así como el porcentaje de calcio perdido.

3.4.3 Espectroscopia Infrarroja (IR)

Figura 3.11 Espectro electromagnético. Tomada de la siguiente dirección electrónica (www.ugr.es/~quiorred/espec/img/intro_01.gif).



La espectroscopia infrarroja (IR) estudia la interacción entre la materia y la radiación infrarroja, radiación que corresponde a la región del espectro electromagnético que abarca longitudes de onda entre 0,8 y 1.000 μm figura 3.11 (16).

La espectroscopia IR es sensible a la presencia de grupos funcionales en una molécula, es decir fragmentos estructurales con propiedades químicas comunes (un metileno, $-\text{CH}_2-$, en un hidrocarburo, un carbonilo, $\text{C}=\text{O}$, en una cetona, o un hidroxilo, $-\text{OH}$; en un alcohol, son ejemplos de grupos funcionales). La característica principal de la espectroscopia IR, es que permite identificar especies químicas, a través de la determinación de la frecuencia a las que distintos grupos funcionales presentan bandas de absorción en el espectro IR (67).

Esta espectroscopia representa importantes ventajas como técnica analítica, ya que permite analizar todo tipo de muestras sólidas, líquidas o gaseosas. Es una técnica sencilla, rápida (en muchos casos, se puede preparar la muestra, registrar el espectro y representarlo en pocos minutos) y de alta sensibilidad. Entre

sus principales desventajas, es que para que una muestra presente un espectro IR debe poseer enlaces químicos, por lo tanto los átomos y los iones monoatómicos no absorben radiación IR. Tampoco pueden detectarse las moléculas diatómicas homonucleares, como O₂ ó N₂ y presenta limitaciones para el análisis de mezclas complejas y de disoluciones acuosas (ya que el agua absorbe fuertemente la radiación infrarroja) (16).

El espectro infrarrojo muestra la intensidad de la radiación infrarroja medida en función del número de ondas, habitualmente en el intervalo 4000-400 cm⁻¹ (IR medio) y en el eje de ordenadas se representa, generalmente, absorbancia o transmitancia (16).

La transmitancia (T) se define como la relación entre la intensidad de radiación que emerge de las muestras (I) y la que ésta recibe (I₀). Lo habitual es representar la transmitancia porcentual (%T):

$$T = I/I_0$$

$$\%T = 100 T$$

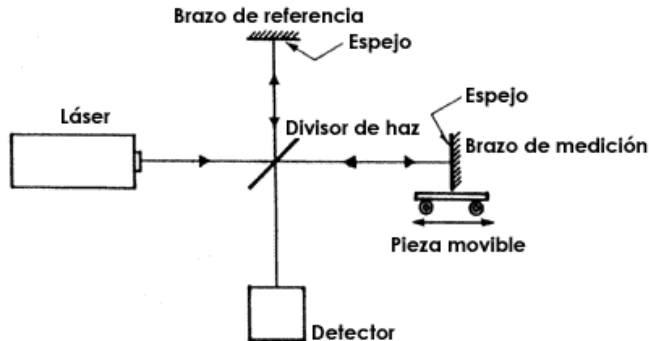
El parámetro I contiene información de la muestra, pero también contribuciones del espectrómetro y el ambiente. Estas dos contribuciones son las que mide I₀, que se denomina espectro de fondo (*background*). Por lo tanto, al calcular la relación entre I y I₀, es decir, la transmitancia, las contribuciones del equipo y del ambiente se eliminan.

Para el análisis cuantitativo, el espectro debe representarse en unidades de absorbancia (A), que se calcula como el logaritmo decimal de la inversa de la transmitancia:

$$A = \log (I/T) = \log (I_0/I)$$

Espectroscopia con transformada de Fourier (FTIR)

Figura 3.12 Interferómetro de Michelson.



El interferómetro de Michelson (figura 3.12) es un dispositivo en el que se divide un haz de radiación en dos haces que, tras recorrer caminos de distinta longitud, son de nuevo recombinados. De esta forma, se crea una interferencia del haz que emerge en función de la diferencia de camino recorrido por los haces separados (68).

El interferómetro consiste en dos espejos planos perpendiculares entre sí, uno de los cuales puede moverse en dirección perpendicular a la superficie, a una velocidad constante. Entre los dos espejos se sitúa un separador (*beamsplitter*) donde parte de la radiación que llega a la fuente se refleja hacia uno de los espejos y en parte se transmite hacia el otro espejo. Después de que los haces vuelven al separador, interfieren y, de nuevo, una parte se transmite y la otra se refleja. Debido al fenómeno de interferencia, la intensidad del haz que llega al detector varía con la diferencia de camino que recorre los haces de radiación en las dos ramas del interferómetro. Este patrón de interferencia se denomina interferograma y contiene la información espectral de un espectrómetro FT.

El método de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier presenta importantes ventajas con respecto a los espectrómetros dispersivos, que han hecho que, junto con la generalización del uso de los ordenadores, que los

espectrómetros FTIR hayan sustituido en la actualidad de forma prácticamente total a los equipos dispersivos.

La principal de estas ventajas es que, para un mismo tiempo de adquisición, el interferómetro genera un espectro con una relación señal/ruido. Esta mejora en la relación señal/ruido se debe a que en un espectrómetro FTIR, el interferómetro recibe simultáneamente todas las longitudes de onda del espectro, mientras que en un equipo dispersivo, cada punto del espectro se va registrando sucesivamente. Por otra parte Pierre Jacquinot señaló que en los espectrómetros FTIR la intensidad del haz puede ser mayor que en un equipo dispersivo (ventaja de Jacquinot), lo que también contribuye a mejorar la relación señal/ruido. (69) La ventaja de Jacquinot se deriva de la mayor apertura que presenta el interferómetro en comparación con la apertura de las rendijas de un monocromador. Otra ventaja que presenta la espectroscopia FTIR es su mayor precisión en la longitud de onda. Una transformación precisa del interferograma en espectro requiere que los puntos del interferograma sean registrados a intervalos de retraso exactamente iguales. Además de estas ventajas, los espectrómetros FTIR, a diferencia de los equipos dispersivos, proporcionan una resolución constante en todo el espectro, no presentan los efectos de polarización de la luz que son típicos de las redes de difracción, ni tampoco producen saltos en la línea base como los producidos por cambios bruscos en la apertura de las rendijas de un monocromador (70).

En espectroscopia de IR se cumple la conocida regla de Lambert-Beer, que relaciona la intensidad de la banda con la concentración de la muestra medida.

$$A = -\log T(\nu) = a(\nu)bc$$

Donde A es la absorbancia, T (ν) y a (ν) son la transmitancia y el coeficiente de absorción a una valor de frecuencia dado, b es la longitud de paso óptico y c es la concentración de la muestra. El coeficiente de absorción es propio de cada modo vibracional y depende de la variación del momento bipolar de la molécula durante la vibración. De la regla de Lambert-Beer se deduce que

la intensidad de la banda (absorbancia) medida en el infrarrojo varía linealmente con la concentración de la muestra, y por tanto es posible realizar análisis cuantitativos por espectroscopia infrarroja (67).

Preparación de las muestras para el análisis de FTIR

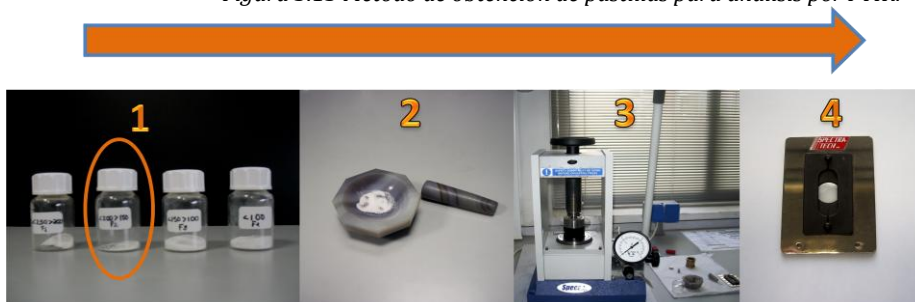
La preparación de la muestra suele ser la parte más tediosa y larga de un experimento de espectroscopia infrarroja. La calidad del espectro dependerá del grado de perfección que se haya alcanzado en la preparación de la muestra, ya que las muestras sólidas reflejan y dispersan la radiación incidente lo que conlleva a una transmitancia baja.

La muestra debe estar completamente seca pues el agua absorbe en gran parte del espectro electromagnético energía, con lo que puede enmascarar las bandas de la muestra problema.

La técnica utilizada es la preparación de pastillas utilizando como dispersante el KBr, compuesto que no absorbe en la región del espectro $4000-600\text{ cm}^{-1}$.

Las pastillas se prepararon molturando y homogenizando 2 mg de polvo de esmalte fracción 2 ($>150\mu < 200\mu$) tratado, con 95 mg de KBr en un mortero de ágata. Las muestras previamente se secaron en estufa a 100°C . Luego la mezcla se colocó en el pastillero y se sometió a presión de 8 Tn/cm^2 métricas durante 2 minutos.

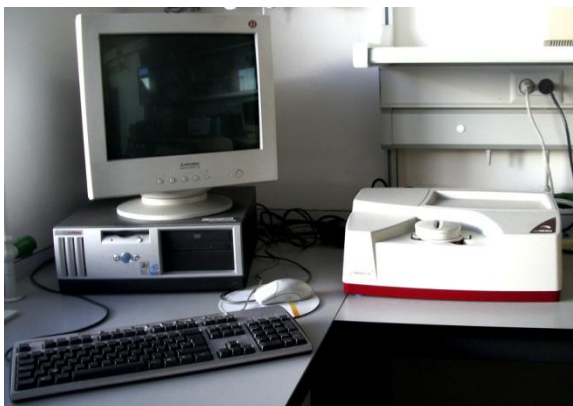
Figura 3.13 Método de obtención de pastillas para análisis por FTIR.



Equipo empleado

Los espectros de infrarrojo se registraron empleando un espectrofotómetro Magna IR-200 (Nicolet de Thermo Electron Scientifics Instruments Corporation USA), ubicado en los Laboratorios de Investigación del Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Granada España.

Figura 3.14 Equipo para análisis por Espectroscopia Infrarroja. Magna IR-200 Nicolet, utilizado para análisis de las pastillas.



Registro y análisis de las muestras

Los espectros se registraron utilizando el paquete informático EZ-OMNIC® en modo de absorbancia entre las frecuencias 400 a 4000 cm^{-1} , con una resolución de 2 cm^{-1} y un total de 256 barridos por muestra.

Una pastilla de referencia con composición constante (95 mg de BrK) se utilizó para corregir la línea base y el fondo (*background*), que fundamentalmente correspondía al dióxido de carbono CO_2 y agua H_2O como se muestra en la figura 3.15.

Figura 3.15 Espectro infrarrojo del fondo de CO₂ y H₂O.

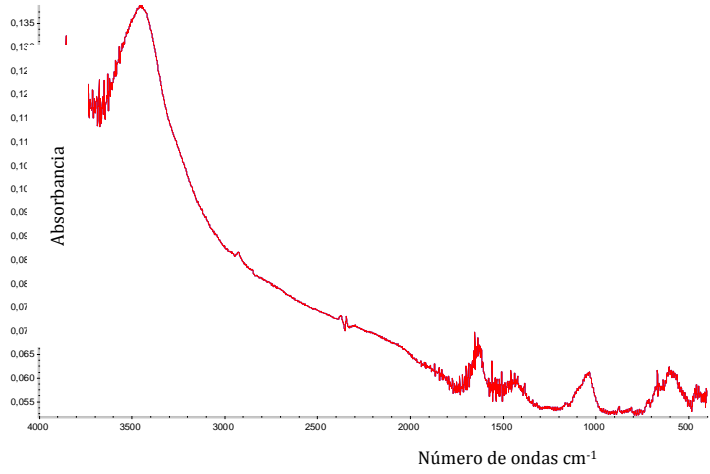


Figura 3.16 Espectro infrarrojo de esmalte sin tratamiento.

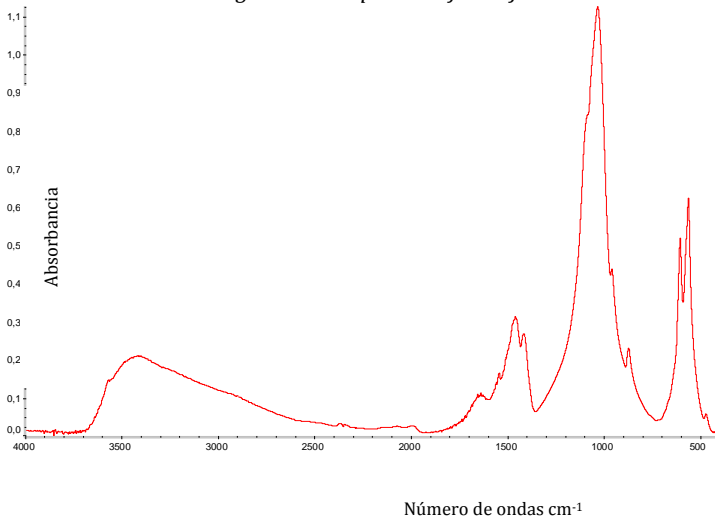
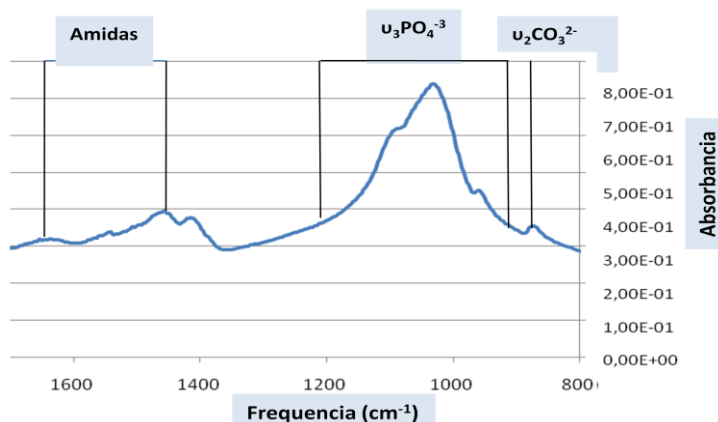


Figura 3.17 Fragmento del espectro infrarrojo (800-1600 cm^{-1}) de esmalte sin tratamiento. Se observan diferentes bandas que pueden ser asignadas a los distintos grupos funcionales componentes del esmalte, fundamentalmente el hidroxiapatito.



En la figura 3.17 se muestra el espectro IR de la muestra control y de la región 1600-800 cm^{-1} (figura 3.16) donde se pueden observar las bandas características de los grupos funcionales correspondientes a los grupos amidas, fosfato, carbonato. La tabla 3.4 muestra las frecuencias asignadas a dichos grupos.

Tabla 3.4 Asignación de bandas de FTIR del esmalte. Tomada como referencia de la literatura (71).

No	Frecuencia del Esmalte (cm^{-1})	Asignación de las bandas espectrales
1	3570-3450	N(OH)
2	3500-3300	$\nu(\text{N-H})$ Amida A
3	1637	$\nu(\text{C=O})$ Amida I
4	1544	$\delta(\text{N-H}) + \nu\text{C-N}$ (Amida), $\nu_3 \text{CO}_3^{2-}$ (mineral)
5 a 7	1200-900	ν_1, ν_3 (PO_4) (mineral)
8	890-850	ν_2 (CO_3^{2-}) (mineral)
9 a 10	700-450	ν_4 (PO_4) (mineral)

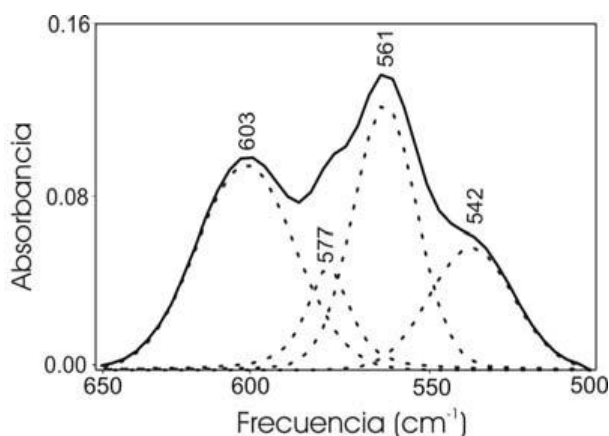
Las diferentes cantidades de fosfato, carbonato, colágeno y lípidos en las muestras de esmalte analizadas, se determinaron mediante el cálculo del área de los picos de las bandas de absorción asociadas a enlaces de grupos carbonato, fosfato, amida y C-H alifático del espectro de infrarrojo de esmalte sin tratamiento. Dichas asignaciones se muestran en la tabla 3.5 las cuales concuerdan con las encontradas en la bibliografía.

En los espectros de IR de las muestras sometidas a los diferentes tratamientos, aparecen las mismas bandas con muy pocas variaciones. Por lo tanto se utilizó un programa de deconvolución, para la determinación gráfica de las áreas de las bandas solapadas y el ajuste a través de una función mixta *Lorentziana-Gausiana* ($r < 0.9997$), variando el tipo de suavizado según la banda del espectro analizada. Los análisis realizados permiten variar la amplitud y forma de las funciones gráficas obtenidas de cada pico.

A continuación describiremos en detalle las diferentes bandas utilizadas en los análisis de los espectros de IR de esmalte.

Banda 500-650 cm^{-1} $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$

Figura 3.18 Banda 500-650 cm^{-1} $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$ (16).



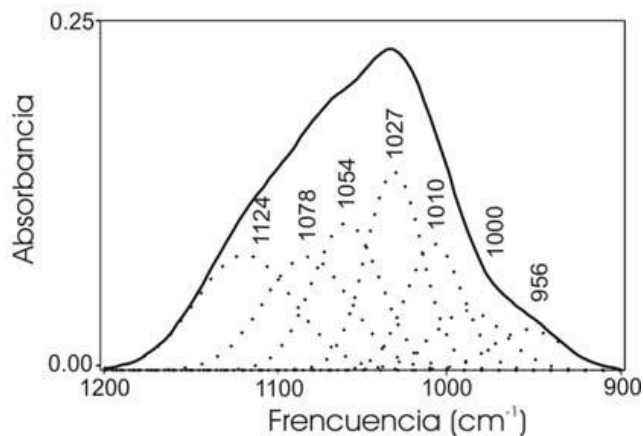
El espectro FTIR de un tejido mineralizado en la banda correspondiente a ν_4 muestra tres bandas de absorción independientes de la matriz orgánica; dos bandas de baja intensidad entre $530\text{-}540\text{ cm}^{-1}$ y $570\text{-}580\text{ cm}^{-1}$ que corresponden a HPO_4^{2-} y una tercera banda de absorción a 603 cm^{-1} no relacionada con iones HPO_4^{2-} ó OH^- , que correspondería a PO_4^{3-} inestable (72). Existe otra banda a 560 cm^{-1} cuya intensidad está correlacionada con la banda anterior a 603 cm^{-1} . El ión HPO_4^{3-} distorsiona la señal del espectro correspondiente al ión PO_4^{3-} no obstante la vibración de la tensión de la banda P-OH (dominio ν_3) aparece a una frecuencia menor de 870 cm^{-1} que en apatito biológico aparece oculta por una fuerte banda del $\nu_2\text{ CO}_3^{2-}$ (73). La vibración de tensión P-OH también da una banda ancha entre las frecuencias $2.400\text{-}2.500\text{ cm}^{-1}$ que no se detecta en apatito biológico.

Banda $850\text{-}890\text{ cm}^{-1}$ $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$

En el diente el dominio más importante de frecuencias de vibración del CO_3^{2-} (entre $1400\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, dominio ν_3) está solapado por numerosas bandas de absorción de proteínas (CH, amida II, COO^-) o glicosaminoglicanos (NH) (74). La banda de carbonatos en el dominio $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ presenta tres componentes: un pico principal localizado a 872 cm^{-1} correspondiente a iones carbonato localizados en los sitios de PO_4^{3-} (carbonato tipo B – sitio aniónico trivalente), un pico a 880 cm^{-1} asignado a iones carbonatos sustituyendo a iones OH^- en la estructura del apatito (carbonato tipo A – sitio aniónico monovalente) y una banda a 865 cm^{-1} que correspondería a carbonato lábil inestable (75).

Banda 900-1200 cm^{-1} $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$

Figura 3.19 Banda 900-1200 cm^{-1} $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ (16).



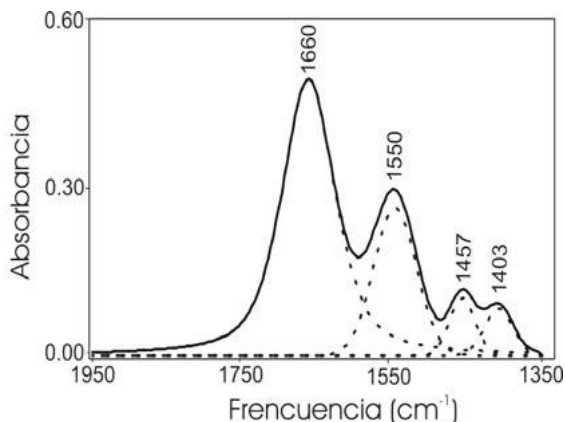
El dominio $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ de los iones ortofosfato en el espectro de IR consiste en una intensa banda de absorción generalmente dividida en dos componentes principales a 1170-1085 cm^{-1} y 1085-970 cm^{-1} (74). En depósitos minerales jóvenes de apatito biológico encontramos bandas a 1027, 1078, 1104, 1125 cm^{-1} pertenecientes a hidroxiapatito esteoquímtrico poco cristalizado. Las bandas a 1027 y 1078 cm^{-1} parecen darse en apatito no esteoquímtrico conteniendo iones HPO_4^{2-} (74). Aunque las bandas a 1104 y 1124 cm^{-1} no se han encontrado en ningún apatito bien cristalizado, éstas están presentes en apatito precipitado recientemente.

Banda 1350-1950 amidas y carbonatos

En esta banda encontramos los modos de vibración del material orgánico en el diente. Entre las frecuencias de la banda encontramos la banda amida I (C-O) *modo de distorsión* a una frecuencia aproximada de 1645 cm^{-1} , el modo de distorsión y deformación de los grupos CH_2 y CH_3 entre las frecuencias 1350-1450 cm^{-1} , el modo C-O distorsión asociado a grupos carboxilo a 1420 y la banda de amida III a 1270 cm^{-1} (no analizada en el estudio de la banda) (76). Existe una relación con la frecuencia 872 cm^{-1} de la banda $\nu_2 \text{CO}_3^{2-}$ (850-890 cm^{-1}), con el área del pico

a 1403 cm^{-1} de esta banda que corresponde igualmente a ión CO_3^{2-} tipo B (sustitución PO_4^{3-}) (77).

Figura 3.20 Banda $1350\text{-}1950\text{ cm}^{-1}$ (16).



En la tabla 3.5 resume la asignación aproximada de las bandas realizada para cada región o grupos moleculares que podrá variar dependiendo del tipo de muestra y del ajuste utilizado. La información de la tabla se ha obtenido a partir de las siguientes referencias (75) (78) (74) (79) (80) (81) (73). En particular, los diferentes parámetros composicionales fueron determinados por el estudio detallado de la composición durante el proceso de desmineralización. Específicamente las áreas de los picos aislados fueron determinadas y denominadas por la letra mayúscula "A" seguidas por los picos o posición de la banda en cm^{-1} (e.g., A1660, A1405). Alternativamente para evaluar la contribución de los componentes individuales a los diferentes grupos moleculares en regiones particulares (e.g. H_3PO_4 dentro de la región ν_1 , ν_3 PO_4^{3-} de la banda), las áreas de los picos deconvolucionados, fueron normalizados y las áreas relevantes de la banda fueron derivadas (e.g., A900_1200). Estas áreas de los picos fueron designadas usando la letra "a" seguida por la posición del pico (e.g., a956, a1000, a1010). Adicionalmente, a partir de razones entre áreas 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 esmalte.

Tabla 3.5 Asignación de regiones y grupos moleculares en espectroscopia infrarroja (16).

Región cm ⁻¹	Grupos moleculares
A500-650	v ₄ PO ₄ ³⁻
a527	HPO ₄ ²⁻
a540	HPO ₄ ²⁻
a560	PO ₄ ³⁻
a603	PO ₄ ³⁻
A850-890	v ₂ CO ₃ ²⁻
a865	Carbonato inestable
a872	CO ₃ ²⁻ tipo B (sustitución PO ₄ ³⁻)
a880	CO ₃ ²⁻ tipo A (sustitución OH ⁻)
A900-1200	v ₃ PO ₄ ³⁻
a956	HPO ₄ ²⁻
a1000	Apatito poco cristalino
a1010	Apatito poco cristalino
a1027	Apatito altamente cristalino
a1054	Apatito altamente cristalino
a1078	Apatito cristalino
a1124	Apatito poco cristalino
A1350-1950	Grupos amidas y carbonatos
a1413	CO ₃ ²⁻ tipo B (sustitución PO ₄ ³⁻)
a1460	Amida III
a1540	Amida II
a1645	Amida I
A2800-3800	OH "tensión-deformación"

El grado de mineralización del esmalte fue definido como la razón entre el fosfato mineral del esmalte y la matriz orgánica (colágeno) estimados como % mineral = A1200-900 / A1700-1400. Donde A1200-900 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 A1700-1200 las bandas de los grupos amidas (bandas principales de la parte orgánica).

$$\text{Gradmin (\%)} = A1200-900 / (A1700-1400)$$

La cantidad de carbonato en la parte mineral del esmalte (minCO_3^{2-}) principalmente de sustitución tipo B, (80) se calculó como la razón entre el área del pico 1405 cm^{-1} dividida por el área asignada anteriormente a la cantidad de fosfato (A900-1200).

$$\text{CO}_3\text{min} = A1405 / A900-1200$$

Para analizar la evolución de la composición de la matriz orgánica, fue calculado la proporción relativa de las bandas de amida como la proporción de cada banda de amida individual sobre la banda de amida total, de la siguiente manera:

$$a1660 = A1660 / (A1700-1400)$$

$$a1540 = A1540 / (A1700-1400)$$

$$a1460 = A1460 / (A1700-1400)$$

3.4.3 Espectroscopia Raman

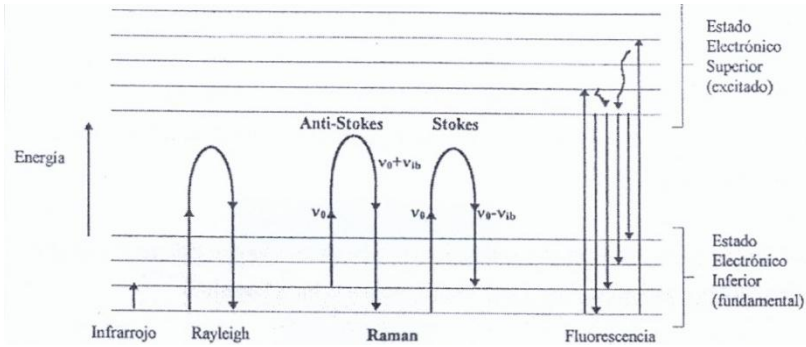
Es una técnica fotónica de alta resolución, que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico/inorgánico permitiendo así su identificación. El análisis mediante espectroscopia Raman se basa en el examen de luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independiente de la frecuencia de la luz incidente (82).

El análisis mediante espectroscopia Raman se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia ν_0 sobre una muestra cuyas características moleculares se desean determinar y examinar la luz dispersada por dicha muestra. La mayor parte de la luz dispersada presenta la misma frecuencia que la luz incidente pero una fracción muy pequeña presenta un cambio

frecuencial, resultado de la interacción de la luz con la materia. La luz que mantiene la misma frecuencia ν_0 que la luz incidente se conoce como dispersión Rayleigh y no aporta ninguna información sobre la composición de la muestra analizada. La luz dispersada que presenta frecuencias distintas a la de la radiación incidente, es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra y es la que se conoce como dispersión Raman. Las nuevas frecuencias $+\nu_r$ y $-\nu_r$, son las frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente (82).

Las variaciones de frecuencia observadas en el fenómeno de dispersión Raman, son equivalentes a variaciones de energía. Los iones y átomos enlazados químicamente para formar moléculas y redes cristalinas, están sometidos a constantes movimientos vibracionales y rotacionales; estas oscilaciones se realizan a frecuencias bien determinadas en función de la masa de las partículas que intervienen y del comportamiento dinámico de los enlaces existentes. A cada uno de los movimientos vibracionales y rotacionales de la molécula le corresponderá un valor determinado de la energía molecular. Un diagrama energético en el que cada estado de energía se representa por una línea horizontal se muestra en la figura 3.21 (82).

Figura 3.21 Diagrama energético en el que las líneas horizontales representan distintos estados vibracionales y en el que se muestran las transiciones entre estados energéticos para diferentes interacciones luz-material.



Cuando los fotones del haz de luz incidente, con energía $h\nu_0$ (donde h es la constante de Plank) mucho mayor a la diferencia de energía entre los niveles vibracionales (o rotacionales) de la molécula, chocan con ella, la mayor parte la atraviesan pero una pequeña fracción son dispersados (del orden de 1 fotón dispersado por cada 10^{11} fotones incidentes). Esta dispersión puede ser interpretada como el proceso siguiente: el fotón incidente lleva a la molécula transitoriamente a un nivel de energía vibracional (o rotacional) superior no permitido, el cual abandona rápidamente para pasar a uno de los niveles de energía permitidos emitiendo un fotón; la frecuencia a la cual es liberado este fotón dependerá del salto energético realizado por la molécula (82).

Pueden distinguirse los siguientes casos (82):

- Si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a la misma frecuencia que el fotón incidente, se dice que el choque es elástico ya que ni el fotón, ni la molécula sufren variaciones en su estado energético; la molécula vuelve al mismo nivel de energía que tenía antes del choque y el fotón dispersado tiene la misma frecuencia ν_0 que el incidente, dando lugar a la dispersión Rayleigh.
- Si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a una frecuencia distinta de la incidentes, se dice

que el choque es inelástico (existe transferencia de energía entre la molécula y el fotón); en este caso pueden darse dos fenómenos:

- Sí el fotón es dispersado tiene una frecuencia menor a la del incidente, se produce una transferencia de energía del fotón a la molécula que, después de saltar al estado de energía no permitido, vuelve a uno permitido mayor al que tenía inicialmente; el fotón es dispersado con frecuencia $\nu_0 - \nu_r$ y se produce la dispersión Raman-Stokes.
- Sí el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor a la del incidente, se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón; esto significa que la molécula, inicialmente antes del choque no se encontraba en su estado vibracional fundamental sino en uno de mayor energía y después del choque pasa a este estado; el fotón es dispersado con frecuencia $\nu_0 + \nu_r$ y se produce la dispersión Raman-anti-Stokes.

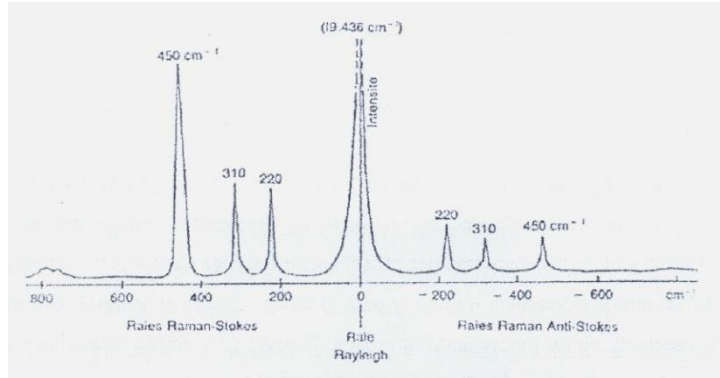
Cada material tendrá un conjunto de valores ν_r característicos de su estructura poliatómica y de la naturaleza de los enlaces químicos que la forman (82).

El espectro Raman recoge estos fenómenos representando la intensidad óptica dispersada en función del número de onda normalizado al que se produce. El número de onda normalizado es una magnitud proporcional a la frecuencia e inversamente proporcional a la longitud de onda, que se expresa en cm^{-1} : (82)

$$\nu = \nu / C = 1/\lambda$$

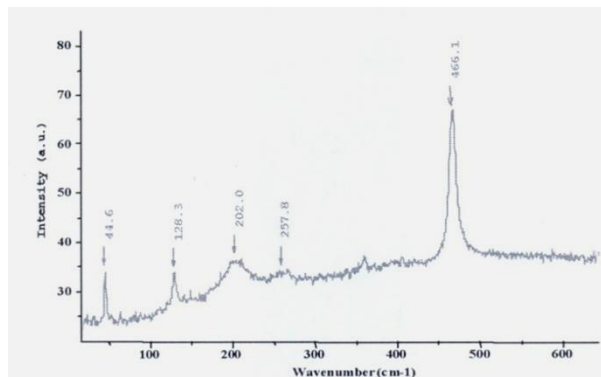
Como se observa en la figura 3.22, el espectro Raman está formado por una banda principal o Rayleigh y dos series de bandas secundarias correspondientes a las bandas Raman Stokes y anti-Stokes, situadas simétricamente a ambos lados de la banda Rayleigh (82).

Figura 3.22 Bandas Rayleigh, Raman Stokes y Raman anti-Stokes.



A temperatura ambiente, según la ley de distribución de energías de Maxwell-Boltzman, el 99% de las moléculas se encuentran en el estado vibracional de menor energía, y por tanto, la probabilidad de que ocurran transferencias de energía que den lugar a la dispersión Raman Stokes es mucho mayor que la dispersión Raman anti-Stokes. Esto se traduce en que la intensidad de la dispersión Raman Stokes es del orden de 100 veces superior a la de la dispersión Raman anti-Stokes. La diferencia entre la intensidad del efecto Stokes y el anti-Stokes hace que habitualmente se trabaje midiendo sólo el efecto Stokes y por comodidad se sitúa en resultado en la parte positiva del eje. Figura 3.23 (82).

Figura 3.23 Espectro Raman habitual, compuesto por las bandas Raman Stokes.



En ocasiones, debido a la naturaleza química del material que se analiza, unido al efecto Raman se produce un efecto de fluorescencia (fenómeno de absorción de luz) que puede llegar a enmascarar las bandas Raman; en estos casos, podría resultar de interés medir el espectro anti-stokes ya que a estas frecuencias y aunque el efecto Raman es más débil, también lo es el efecto de la fluorescencia y pueden aparecer bandas Raman en la parte anti-Stokes del espectro, que se encuentran enmascaradas en la parte Stokes (82).

El uso de la técnica en el área biomédica, se ha destacado en el estudio de proteínas y estructuras polipépticas en su estado fisiológico natural (82).

Los equipos de espectroscopia Raman están formados por varios elementos: (82)

- Fuente de excitación
- Iluminación de la muestra y recolección de la señal dispersada
- Portamuestras o celdas de tratamiento
- Eliminación de la dispersión elástica
- Espectrómetro, rejillas o sistemas FT-Raman
- Detectores

Todos los equipos Raman convencionales, miden el espectro utilizando la dispersión de luz. Sin embargo, el sistema FT-Raman, al trabajar con radiación IR utiliza la metodología de transformada de Fourier (FT).

Preparación de las muestras para análisis por Raman

En este caso no es necesario el uso de ningún agente dispersante, sino que se tomaron 3 mg aproximadamente de polvo de esmalte fracción 2 ($>150\mu < 200\mu$) con y sin tratamiento químico. El espectro se realizó directamente sobre la muestra sólida.

Equipo empleado

Figura 3.24 Equipo para análisis por espectroscopia Raman. Renishaw in Via microscope. Renishaw plc, Gloucestershire. UK. (Servicios Técnicos. Universidad de Jaén).



Se utilizó un microscopio Renishaw inVia (Renishaw plc, Gloucestershire, UK) equipado con 300 mW y 785 nm láser para adquirir los espectros de las muestras de polvo de esmalte (3mg aprox) con o sin tratamiento. Los datos se registraron entre 200 y 3200 cm^{-1} con una resolución mejor que la de 4 cm^{-1} . Los espectros se obtuvieron como resultado de 3 acumulaciones cada una con 18 segundos de tiempo de exposición.

Análisis de la muestra

Para analizar la muestra se utilizó el método de deconvolución, tomando como referencia la tabla publicada en el artículo de Penel y col 1998 (83).

Tabla 3.6 Asignación de regiones/grupos funcionales en espectroscopia Raman (83).

Región cm^{-1}	Grupos funcionales
900-1200	
961	$\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$
995-1120	
1025-1046	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$
1071	$\nu_1 \text{CO}_3^{2-}$ tipo B
1105	$\nu_1 \text{CO}_3^{2-}$ tipo A
380-500	
429-450	$\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$
580-611	$\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$

Con el fin de determinar la cristalinidad de las muestras analizadas mediante espectroscopia Raman, se obtuvieron los valores FWHM para la banda para la banda de absorción correspondiente a 961 cm^{-1} (PO_4^{3-}). Anteriormente se ha descrito como la cristalinidad del mineral aumenta (incremento del tamaño cristalino y/o ordenación atómica) con la relación del ancho de banda conocido a $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ (Akkus y col, 2003, Penel y col 1998).

3.4.4 Área superficial, textura y distribución porosa

Isotermas de Adsorción

El término adsorción fue usado por primera vez por Kayser en 1881 para describir la condensación de gases sobre una superficie distinguiendo el proceso del fenómeno de la absorción donde el gas puede penetrar en la masa del sólido (65).

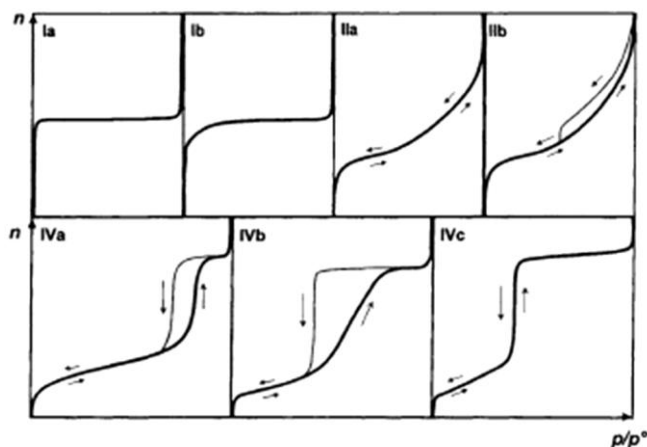
La adsorción, en el contexto de la interfase gas/sólido, implica el enriquecimiento o agotamiento de uno o más componentes en la capa interfacial. Las fuerzas implicadas en el proceso de adsorción pueden ser de naturaleza física o química.

Cuando un sólido se expone en un recipiente cerrado a un gas a una determinada presión, el sólido adsorbe el gas y la presión en

el recipiente disminuye. Al cabo de un tiempo la presión en el recipiente se estabiliza y la cantidad adsorbida se puede calcular a partir de la caída de presión aplicando la ecuación de los gases si los volúmenes del recipiente y el sólido son conocidos. En este tipo de experimento el sólido se conoce como *adsorbente* y el gas adsorbido por el sólido es el *adsorbato*.

Las isothermas de adsorción son la representación gráfica de la cantidad de gas adsorbida por gramo de sólido frente a la presión relativa a la presión de saturación del adsorbato a la temperatura de adsorción. Estas isothermas, presentan formas diversas condicionadas por la naturaleza del adsorbente y del adsorbato, pero la mayoría puede encuadrarse en alguno de los seis tipos establecidos en la clasificación de la IUPAC (84).

Figura 3.25 Subdivisión de las isothermas de adsorción de gases I, II y IV (84).



La isoterma tipo I se caracteriza por una abrupta subida inicial a presión relativa baja seguida por una meseta que se extiende hasta presiones relativas elevadas. Este tipo de isothermas corresponde a sólidos microporosos (tamaño de los poros menor de 2 nm). Representa la adsorción en poros de tamaño similar al tamaño molecular del adsorbato.

La isoterma tipo II es típica de sólidos no porosos o macroporosos (tamaño de los poros superior a 50 nm). Representa la adsorción en monocapa y multicapa sin

restricciones. Una isoterma tipo II completamente reversible se asocia a una adsorción monocapa-multicapa sobre una superficie externa abierta y estable de un sólido no poroso. Esta forma de isoterma se designa en la subdivisión de la figura 3.25 tipo IIa. Pero hay algunos casos en los que la isoterma de adsorción parece ser tipo II pero la rama de desorción presenta un ciclo de histéresis en la región de altas presiones relativas, en estos casos las isotermas se denominan tipo IIb, como se recoge en la figura 3.25. En las isotermas tipo IIb la histéresis se debe a que la adsorción en multicapa tiene lugar sobre la superficie del sólido hasta que se alcanza una presión relativa elevada y finalmente se produce lo que se denomina condensación capilar. Una vez que se ha producido la condensación, el estado del adsorbato cambia y la curva de desorción sigue un camino distinto hasta que el condensado se vuelve inestable a un determinado valor crítico de presión relativa. Se encuentra descrito y es común a muchos ciclos histéresis el que la región con una gran pendiente de la rama de desorción se une a la rama de adsorción (el ciclo se cierra o casi se cierra) a un determinado valor de presión relativa (P/P_0). El punto en el que se cierra el ciclo depende del adsorbato y de la temperatura de adsorción pero no del adsorbente, para N_2 a 77 K se recoge en la bibliografía (85) que este punto se localiza a $P/P_0 = 0,42$.

La isoterma tipo III es convexa hacia el eje de P/P_0 en todo el intervalo de presiones relativas, indica poca afinidad entre el adsorbente y el adsorbato. Este tipo de isotermas es poco común.

La isoterma tipo IV tiene una región inicial semejante a la de las isotermas tipo II pero después presenta una fuerte subida a presiones relativas elevadas. En estas isotermas la adsorción y la desorción transcurren por diferentes caminos por lo que presentan un ciclo de histéresis que se asocia con el llenado y vaciado de mesoporos (poros de tamaño entre 2 y 50 nm) por condensación capilar. Se llama condensación capilar al llenado de los poros con líquido condensado a una presión inferior a la de saturación del adsorbato a la temperatura de adsorción.

La isoterma tipo V es, en la región de bajas presiones relativas, convexa respecto al eje de P/P_0 y semejante en lo demás a la

isoterma tipo IV. Este tipo de isotermas son también raras e indican baja afinidad adsorbato-adsorbente.

La isoterma tipo VI se asocia con una adsorción en multicapa sobre una superficie muy uniforme. Cada escalón corresponde a la formación de una capa adsorbida.

La caracterización de la textura porosa de un material se realiza habitualmente a partir de las isotermas de adsorción de N_2 a 77 K y CO_2 a 273 K aunque se pueden utilizar también otros gases y vapores para obtener un conocimiento más preciso de la textura del material. Obtener a partir de las isotermas de adsorción los valores de parámetros texturales tales como superficie específica y volumen de microporos (poros de tamaño inferior a 2 nm) requiere analizar las isotermas aplicando el modelo teórico apropiado a cada caso.

Preparación de muestras para análisis por absorción de gases

Las isotermas de adsorción de N_2 y CO_2 se llevaron a cabo en un analizador automático Micromeritics, ASAP 2020. Una cantidad de muestra entre 0,25 y 0,30 gramos de muestras de esmalte sólido intacto con o sin tratamiento se colocó en el bulbo de adsorción. Las muestras fueron desgasificadas en el ASAP usando una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y mantenidas a 130 °C y vacío inferior a 10^{-7} mm Hg durante 12 horas. No se observó pérdida de peso durante el proceso de desgasificación. El espacio libre se determinó con He a la temperatura de adsorción.

Equipo empleado

Figura 3.26 Equipo para análisis por Isotermas de adsorción. Analizador Micromeritics, ASAP 2020 acelerado de área superficial y porosimetría.



Análisis de la muestra

Los datos de adsorción de N₂ se analizaron mediante el modelo de BET (85), la ecuación final a la que llega este modelo es:

$$\frac{P}{n(P_0 - P)} = \frac{1}{n_m C} + \frac{C-1}{n_m C} \times \frac{P}{P_0}$$

Donde:

- P es la presión en la cámara de adsorción.
- P₀ es la presión de saturación del adsorbato a la temperatura de adsorción.
- n es el número de moles de gas adsorbidos por gramo de adsorbente a la presión relativa P/P₀.
- n_m es el número de moles de adsorbato por gramo de adsorbente en la monocapa, o capacidad de la monocapa. La capacidad de la monocapa se define como la cantidad de adsorbato que puede acomodarse en una capa sencilla

(monocapa) y completa de moléculas sobre la superficie de una masa unidad del adsorbente.

- C es un parámetro relacionado con la energía de la interacción adsorbato - adsorbente.

Representando $\frac{P}{n(P_0 - P)}$ frente a $\frac{P}{P_0}$ se obtiene una recta a partir de la cual, conociendo la pendiente y la ordenada en el origen se puede calcular la capacidad de la monocapa, n_m .

Conocida la capacidad de la monocapa se obtiene la superficie de 1 g de sólido, por la simple ecuación:

$$S = n_m \times a_m \times L$$

Donde:

- n_m tiene el significado comentado anteriormente.
- a_m es el área de una molécula de adsorbato en la monocapa, para el N_2 este valor es de $0,1620 \text{ nm}^2$.
- L es el número de Avogadro.

Otra forma de obtener la superficie específica a partir de una isoterma tipo II es a partir de la cantidad adsorbida en el denominado punto B. Las isotermas tipo II suelen presentar un tramo recto en la región de presiones relativas intermedias, el punto en el que comienza esta porción lineal se denomina punto B y se considera (85) que indica que se ha completado la monocapa, así la adsorción en el punto B debería ser igual a la capacidad de la monocapa estimada aplicando la ecuación de BET. Los resultados recogidos en la bibliografía indican que los valores de la razón n_m/n_B oscilan entre 0,75 y 1,53 aunque la mayoría de los resultados se encuentran en torno a la unidad. Los valores del punto B sirven para validar los resultados obtenidos al aplicar BET para obtener la capacidad de la monocapa.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PAQUETES INFORMÁTICOS EMPLEADOS

En el estudio de las relaciones entre parámetros y variables se han usado análisis de correlación de Pearson, modelos de correlación bivariada y parcial y modelos de regresión lineal.

Para todos los análisis estadísticos se emplearon los paquetes informáticos SPSS (SPSS Inc). Los gráficos representados en la memoria de la tesis y la presentación de los manuscritos se obtuvieron a parte de los paquetes informático Adobe Photoshop, Excel y Origin.

El tratamiento de datos y espectros obtenidos en las diferentes técnicas analíticas aplicadas, se realizó empleando los siguientes paquetes informáticos: EZ-OMNIC (Thermo Fisher Scientific, Inc).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Una de las decisiones más importantes a la hora de iniciar una investigación es la selección del material adecuado de estudio. En este sentido, para el presente trabajo se han empleado muestras de esmalte bovino debido a su fácil obtención y estandarización (43). Además, su espesor presenta una variación muy baja (33), lo cual ha resultado idóneo para nuestro trabajo donde se precisó material fragmentado y pulverizado lo más homogéneo posible.

Así mismo, estudios por microscopía electrónica de barrido revelan que existe una gran similitud entre esmalte-dentina humana y bovina. Por ejemplo, su composición, densidad (86), espesor del esmalte, expansión térmica, dureza (33), permeabilidad (87) son similares a las del esmalte humano. Las diferencias fundamentales radican en la morfología microestructural del esmalte (49). El esmalte bovino presenta cristales más grandes que hacen que su porosidad sea mayor (88) y que tenga más materia interprismática y más estructuras fibrilares alrededor de los prismas (89). Adicionalmente existen pequeñas diferencias cuantitativas en cuanto al contenido de calcio y la distribución de las capas externas e internas en esmalte bovino y humano (90).

A pesar de estas diferencias y de que el esmalte bovino sufre una mayor desmineralización (60) por erosión, erosión- abrasión, la bibliografía consultada sustenta que es un modelo adecuado para hacer estudios de desmineralización porque su estructura es más homogénea. Otros estudios revelan que el uso de dientes bovinos puede ser un sustituto real de los dientes humanos para ensayos de microfiltración, adhesión a esmalte y dentina y estudios de elementos ya que dan resultados comparativamente similares (43).

Por otra parte, los agentes blanqueadores como el peróxido de hidrógeno por su bajo peso molecular pueden penetrar esmalte, dentina y pulpa. Esto ha sido corroborado en algunos estudios en dientes bovinos, en donde se observó también que el espesor de

los tejidos, las características microestructurales del esmalte, el diámetro pequeño de los túbulos dentinales, la presión hidrostática y el aumento de la dentina intertubular pueden influir en la permeabilidad y su capacidad de penetración de estos agentes (49).

Otros factores que también pueden influir en la penetración de peróxido de hidrógeno en dientes bovinos y humanos, pueden ser las alteraciones que estos generan en los componentes minerales y proteicos de la estructura dental (49). Específicamente en el esmalte dental, esos cambios se manifiestan en la desnaturalización de las proteínas, la reducción en la cantidad de iones calcio (32) (42), cambios en la relación calcio-fosfato (21) (49) y los cambios transitorios - permanentes de la estructura de hidroxiapatito (46). Asimismo conocer el valor de calcio perdido durante los tratamientos con peróxido de hidrógeno es muy importante. La pérdida de calcio está relacionada directamente con la alteración de las propiedades físico-mecánicas del esmalte (18) (21) (24) (31) (35) (36) (91), especialmente la dureza y microdureza lo que afecta la resistencia de unión en la adhesión (31) (32). Además, la pérdida de calcio adicional por la desmineralización a la que se somete el esmalte blanqueado que va a sufrir un proceso de adhesión por la acción del ácido ortofosfórico al 37% empeora la situación (24) (56).

Para determinar los niveles de calcio en el esmalte se han utilizado diferentes técnicas de análisis elemental o histoquímico. El análisis mediante microscopía electrónica-EDX, tomografía microcomputarizada, espectrofotometría de absorción atómica (43) (32), espectrofotometría infrarroja, espectrofotometría infrarroja transformada de Fourier, espectrometría atómica de emisión de plasma (ICP-AES) (42) (37), cromatografía (42), sonda atómica microanalizadora (EPMA) (42) microscopía de fuerza atómica, pueden demostrar claramente la pérdida de calcio. Por otra parte mediante difracción de rayos X, IR y FTIR se puede demostrar que existe una conversión del hidroxiapatito en monohidrógeno fosfato de calcio, resultando en una pérdida de Ca^{2+} del esmalte y una significativa disminución de la proporción calcio/fosfato (43).

4.1 ENSAYO 1: EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y EL ÁCIDO FOSFÓRICO DE ALTA CONCENTRACIÓN SOBRE LA CAPA SUPERFICIAL Y SUBSUPERFICIAL DE ESMALTE BOVINO

Este ensayo se dividió en dos partes. En la primera parte se realizó una comparación del calcio extraído, usando dos agentes blanqueadores comerciales, según las indicaciones de las casas fabricantes. En la segunda parte se realizó una comparación del calcio extraído por dos agentes blanqueadores comerciales durante 72 horas continuas.

4.1.1 Parte 1

El objetivo de esta primera parte fue cuantificar mediante espectroscopia de absorción atómica, la cantidad de calcio extraído de la superficie y la subsuperficie de esmalte bovino (0, 25, 50 y 100 μm), tratada con peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones (38% y 30%), tiempos de aplicación (20 minutos, 60 minutos) y con ácido fosfórico al 37% durante 30 y 60 segundos.

La tabla 4.1 presenta la cantidad de Ca^{2+} ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) final extraído de los especímenes de esmalte en función del tiempo de tratamiento para los diferentes niveles de profundidad en el esmalte 0, 25, 50, 100 μ .

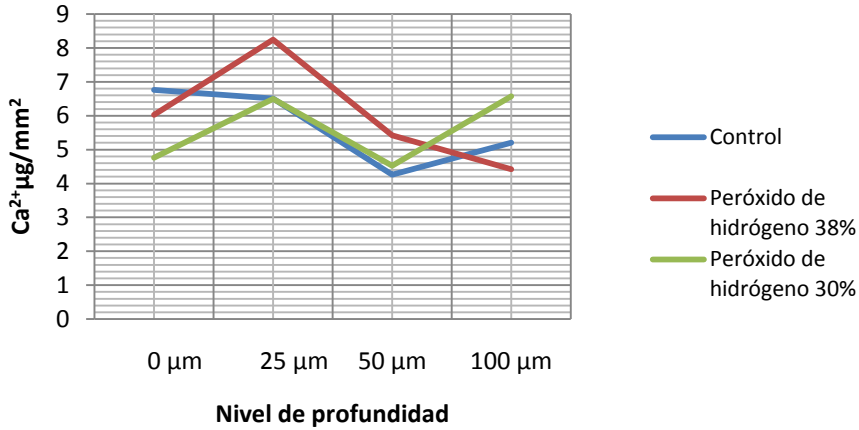
Tabla 4.1. Ca^{2+} extraído en función del tiempo de esmalte tratado con peróxido de hidrógeno y grabado con ácido fosfórico a diferentes niveles de profundidad ($\mu g/mm^2$). Desviación estándar (sd). Los superíndices representan las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los niveles de profundidad del esmalte en el grupo experimental tratado con peróxido de hidrógeno al 38% parte I.

Profundidad	0 μm			25 μm			50 μm			100 μm		
Tiempo de grabado	30 s	60 s	Mean	30 s	60 s	Mean	30 s	60 s	Mean	30 s	60 s	Mean
Grupo 1	6.33	7.19	6.76	6.05	6.97	6.51	3.89	4.63	4.26	4.82	5.58	5.20
Control	(2.64)	(2.63)	(2.63)	(2.35)	(2.80)	(2.57)	(3.56)	(4.26)	(3.91)	(3.03)	(3.57)	(3.29)
Grupo 2	5.51	6.55	6.03	8.17	8.32	8.25	5.24	5.60	5.42	4.28	4.57	4.42
Peróxido de hidrógeno 38%	(1.69)	(2.54)	(2.05)	(3.70) a	(3.94)	(3.79) b	(0.79)	(0.92)	(0.81)	(0.86) a	(0.89)	(0.87) b
Grupo 3	4.66	4.86	4.76	6.25	6.75	6.50	4.41	4.63	4.52	6.73	6.76	6.57
Peróxido de hidrógeno 30%	(1.50)	(1.62)	(1.56)	(2.25)	(2.74)	(2.46)	(1.31)	(1.59)	(1.43)	(2.12)	(2.50)	(2.31)

En los resultados se encontraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$) en la cantidad de calcio Ca^{2+} presente en la solución de ácido fosfórico como función de la profundidad del esmalte ($F=5.564$; $p= 0.026$) e interacción entre la profundidad del esmalte y el tratamiento de blanqueamiento ($F= 5.197$; $p= 0.012$), tiempo de aplicación de ácido fosfórico ($F= 45.853$; $p=0.000$) y interacción entre tiempo de aplicación y tratamiento de blanqueamiento ($F=3.506$; $p=0.044$). Interacciones de primer orden entre el tiempo de grabado con ácido fosfórico - profundidad del esmalte y de segundo orden entre tiempo de grabado ácido - profundidad del esmalte - tratamiento de blanqueamiento no fueron significativas. Por lo tanto los efectos de la profundidad del esmalte y el tiempo de aplicación de ácido fosfórico son mutuamente independientes pero no son independientes del tratamiento aplicado.

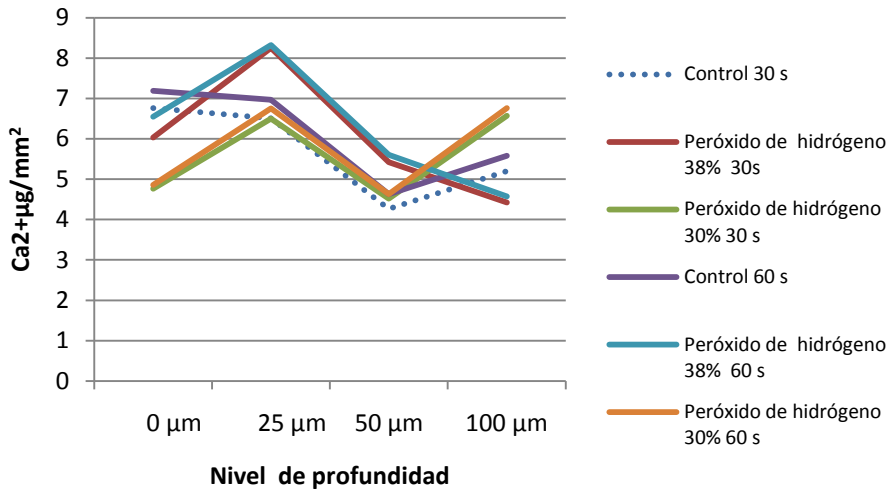
No se observó una diferencia significativa en la cantidad global de Ca^{2+} extraído entre los especímenes blanqueados y no blanqueados ($F= 0.142$; $p=0.869$) (factor inter-sujeto). Sin embargo, la profundidad del esmalte y el tiempo de inmersión en ácido fosfórico fueron analizados para cada tipo de de tratamiento blanqueador. En todos los grupos de tratamiento, la extracción de Ca^{2+} por el ácido fosfórico al 37% estuvo influenciado significativamente por la profundidad del esmalte y por el tiempo de grabado ácido y las variables fueron independientes unas de otras. En el grupo control y el grupo blanqueado con peróxido de hidrógeno al 30% (Illuminé™ Office, Dentsply de Trey, Konstanz, Germany), no se encontraron diferencias en la cantidad de Ca^{2+} extraído en los cuatro niveles de profundidad. El test de Bonferroni verificó que solamente el uso del peróxido de hidrógeno al 38% (Opalescence Boost®, Ultradent, South Jordan, UT, USA) produjo diferencias significativas en el Ca^{2+} extraído a lo largo de los cuatro niveles de profundidad. (Figura 4.1). Sin embargo, la cantidad de Ca^{2+} extraído a las 25 μm , fue significativamente el más grande en todos los niveles de profundidad y en todos los grupos.

Figura 4.1. Valores significativos de Ca^{2+} extraído ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) por nivel de profundidad parte I.



El análisis separado del Ca^{2+} extraído, en los tres grupos de tratamiento por tiempo de aplicación de solución de ácido fosfórico mostró resultados similares. La mayor cantidad de calcio extraído se produjo en el grupo de peróxido de hidrógeno al 38% y 30 s de grabado ácido, a la profundidad de 25 μm . Figura 4.2.

Figura 4.2 Valores significativos de Ca^{2+} extraído ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) a diferentes niveles de profundidad a los 30 y 60 segundos de grabado ácido parte I.



Por otra parte, se obtuvo más Ca^{2+} después de la inmersión en ácido fosfórico, a los 60 s que a los 30 s siendo esta diferencia estadísticamente significativa, excepto en el grupo del peróxido de hidrógeno al 38% a la profundidad de 25 μm y en el grupo de peróxido de hidrógeno al 30% a la profundidad de 25 y 50 μm . No existió diferencia significativa en la extracción de Ca^{2+} entre los 30 y 60 s de grabado ácido. Finalmente, el test de ANOVA de una vía nos presenta que no hay diferencias significativas entre el grupo control y los grupos con peróxido de hidrógeno al 30% o el 38% a ninguna profundidad y ningún tiempo de grabado ácido.

En este estudio la pérdida de calcio se determinó cuantitativamente mediante espectrofotometría de absorción atómica teniendo en cuenta el tamaño, el peso y el área de la muestra, para medir la capacidad de desmineralización y seguir la cinética de desmineralización (43).

Los resultados de nuestro estudio muestran que hay una pérdida de calcio en dientes no blanqueados y blanqueados con peróxido de hidrógeno al 30% y 38% y grabados con ácido fosfórico al 37%. Dichos resultados corroboran los estudios de Rostein y col (92) y Tezel y col (32) Lee k H y col (42) y Al-Salehi y col (37), que demostraron una disminución en la relación calcio/fosfato, magnesio/calcio en esmalte y dentina después de haber sido tratados con peróxido de hidrógeno con diferentes concentraciones debido a su acción desmineralizante.

Sin embargo la bibliografía presenta datos contradictorios acerca de los efectos del peróxido de hidrógeno en la superficie y subsuperficie. Götz y col (93) mediante el uso de microscopía de barrido láser confocal (CLSM), SEM y espectrofotometría de Raman combinada con CLMS, no encontraron cambios ultraestructurales o químicos en el esmalte o en la dentina. Por el contrario autores Madeiros y col (43) mediante estudios por espectrofotometría de absorción atómica (AA) mostraron cambios en la estructura y subestructura del esmalte hasta una profundidad de 110 micras. Posteriormente estudios de Efeoglu y col (94) con tomografía computarizada muestran un efecto desmineralizante desde una profundidad de 50 micras hasta 250 micras.

En nuestro estudio se demuestra que existe una pérdida de calcio hasta 100 micras, lo que corrobora su efecto desmineralizante hasta esa profundidad, siendo mayores a 25 micras. También se encontró relación entre el tipo de agente blanqueador y la profundidad. A medida que aumenta la concentración del peróxido de hidrógeno se aumenta la pérdida de calcio.

Nuestros resultados corroboran los estudios de Efeoglu y col (46) (94), Lee K H y col (42) y Bizhang M y col (60), quienes mencionaron que la alta tasa de descalcificación se produce en la capa externa del esmalte, debido a que las alteraciones estructurales del hidroxiapatito ocurren principalmente en la capa superficial del esmalte y van disminuyendo a medida que se profundiza.

En cuanto al tiempo de grabado con ácido fosfórico se observa que a medida que aumenta el tiempo de 30 a 60 segundos, aumenta la extracción de calcio y existen diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones.

En resumen el efecto tanto del peróxido de hidrógeno como del ácido fosfórico sobre el esmalte bovino, depende de su concentración y tiempo de aplicación, observándose una disminución de la concentración del ión calcio, principalmente en la superficie.

4.1.2 Parte II

El objetivo de esta segunda parte fue cuantificar mediante espectroscopia de absorción atómica, la cantidad de calcio extraído de la superficie y la subsuperficie de esmalte bovino a diferentes profundidades (0, 25, 50 y 100 μm), tratada con peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones (38,5% y 38%). En este caso se utilizó un tiempo mucho más largo de aplicación (72 horas) y posteriormente se trataron las muestras con ácido fosfórico al 37% durante 30 y 60 segundos.

La tabla 4.2 presenta la cantidad de Ca^{2+} ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) final extraído de los especímenes de esmalte en función del tiempo de tratamiento y para los diferentes niveles de profundidad estudiados: 0, 25, 50, 100 μ .

Tabla 4.2. Ca^{2+} extraído en función del tiempo de esmalte tratado con peróxido de hidrógeno y grabado con ácido fosfórico a diferentes niveles de profundidad ($\mu g/mm^2$). Desviación estándar (sd). Los superíndices representan las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los niveles de profundidad del esmalte en el grupo experimental tratado con peróxido de hidrógeno al 38% parte II.

Profundidad	0 μm			25 μm			50 μm			100 μm			
	Tiempo de grabado	30 s	60 s	Mean	30 s	60 s	Mean	30 s	60 s	Mean	30 s	60 s	Mean
Grupo 4		6.88	8.40	7.64	3.41	4.11	3.76	1.77	2.20	1.98	2.49	2.90	2.69
Control		(1.08)	(2.55)	(1.81)	(1.32)*	(1.68)*	(1.5)	(1.24)*	(1.59)*	(1.41)	(1.24)	(1.31)	(1.27)
Grupo 5		5.79	10.99	8.39	2.98	7.20	5.09	2.66	5.97	4.31	3.04	7.75	5.39
Peróxido de hidrógeno 38%		(1.06)*	(0.51)*	(0.78)	(1.06)*	(2.20)*	(1.63)	(0.52)*	(0.94)*	(0.73)	(1.01)*	(0.73)*	(0.87)
Grupo 6		3.56	9.12	6.34	3.80	7.86	5.83	3.25	6.39	4.82	2.29	4.00	3.14
Peróxido de hidrógeno 38.5%		(0.37)*	(0.65)*	(0.51)	(0.60)*	(0.57)*	(0.58)	(0.97)*	(0.51)*	(0.74)	(0.47)*	(0.56)*	(0.51)

El análisis de los datos mediante ANOVA para medidas repetidas demostró la interdependencia del nivel de profundidad del esmalte ($F=283,12$; $p<0,001$), el tiempo de aplicación de ácido fosfórico ($F=690,31$; $p<0,001$), las interacciones de primer orden entre ambos factores intrasujetos ($F=28,17$; $p<0,001$) y de cada uno de ellos con el tratamiento blanqueador [($F=8,73$; $p=0,001$) y ($F=97,43$; $p<0,001$), respectivamente], así como la interacción de segundo orden entre tratamiento* nivel de profundidad* tiempo de aplicación del ácido ($F=7,53$; $p<0,005$). Estos análisis contribuyen significativamente a explicar la variación en el calcio obtenido a partir de la solución de ácido fosfórico en función de los parámetros experimentales estudiados. El tratamiento blanqueador (factor intersujetos), demostró diferencias significativas en la cantidad de calcio obtenido por cada uno de los grupos analizados ($F=1464,00$; $p<0,001$). El test de comparaciones múltiples de Bonferroni demostró que el calcio promedio obtenido en el grupo control es significativamente menor que el extraído en los especímenes sometidos a blanqueamiento.

Si consideramos, pues de forma independiente los efectos del nivel de profundidad para cada grupo de tratamiento y tiempo de aplicación del ácido, vemos que en el grupo control, para un tiempo de aplicación del ácido fosfórico de 30 segundos, existen diferencias significativas en función del nivel de profundidad ($F=196,31$; $p<0,001$). Las comparaciones posthoc demuestran que, a nivel superficial, el calcio extraído fue significativamente más abundante que en el resto de los niveles, seguido por el extraído a 25 micras de profundidad, que fue mayor que el obtenido a 50 micras. El nivel más profundo (100 micras), demostró valores intermedios respecto a los de 25 y 50 micras.

Para un tiempo de grabado de 60 s, ($F=62,75$; $p<0,001$) el calcio extraído a nivel superficial es significativamente mayor que el extraído en el resto de los niveles.

En el grupo tratado con peróxido de hidrógeno al 38%, y para un tiempo de grabado de 30 s ($F=21,54$; $p=0,001$), también se detectaron diferencias significativas entre los distintos niveles, siendo mayor la extracción de calcio a nivel superficial que en el

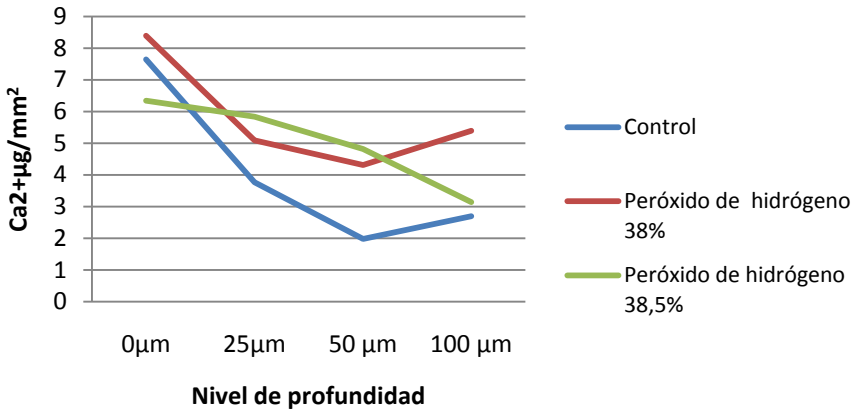
resto de los niveles. A los 60 segundos de exposición, los resultados son similares ($F=85,42$; $p<0,001$), con mayor extracción de calcio a nivel superficial. La menor cantidad de calcio extraído se obtuvo a 50 micras de profundidad, con diferencias significativas tanto frente al nivel superficial como frente al más profundo (100 micras).

En el grupo en que se utilizó como agente blanqueador peróxido de hidrógeno al 38,5%, para un tiempo de inmersión en ácido de 30 s, ($F=69,87$; $p<0,001$) se obtiene una menor cantidad de calcio al nivel más profundo (100 micras) que a niveles más superficiales (0 y 25 micras), sin diferencias respecto al extraído a 50 micras de profundidad. Finalmente, tras 60 s de contacto con el ácido fosfórico, hemos observado que existen diferencias significativas ($F=261,67$; $p<0,001$) entre todos los niveles de profundidad, de manera que ésta es progresivamente menor cuanto mayor es la profundidad del esmalte.

En cuanto a la dinámica de extracción de calcio, se ha analizado, mediante ANOVA para medidas repetidas, el calcio obtenido en cada subgrupo del estudio (tratamiento, nivel de profundidad) tras 30 s y 60 s de exposición al ácido. Los resultados señalados con asterisco se presentan en la tabla 4.2 donde se observa que las diferencias fueron estadísticamente significativas siendo mayor extracción la extracción de calcio a los 60 s que a los 30 s de exposición al ácido, excepto en el grupo control a nivel superficial ($F=3,87$; $p=0,087$) y a 100 micras ($F=48,15$; $p=0,138$).

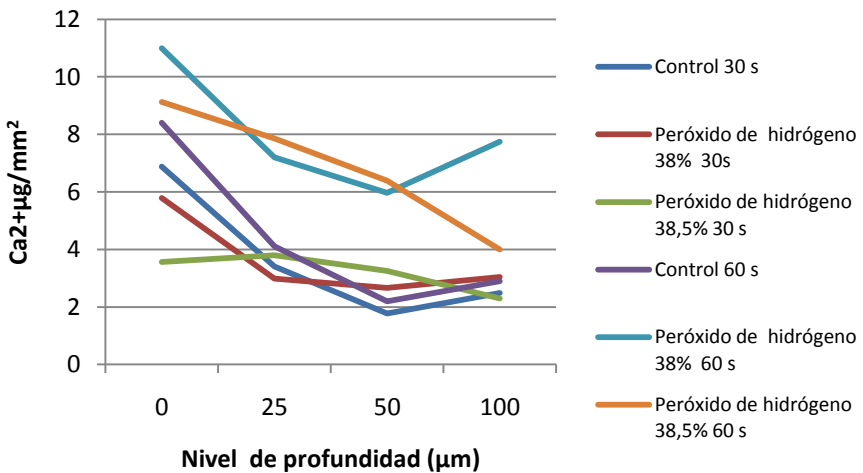
En la figura 4.3 se representan los valores del promedio de calcio extraído para cada nivel de profundidad. En todos los casos, se observa claramente que en la superficie (0 μm) es donde ocurre la mayor eliminación de calcio.

Figura 4.3 Valores significativos de Ca^{2+} extraído ($\mu\text{g} / \text{mm}^2$) por nivel de profundidad parte II.



El análisis por separado del Ca^{2+} extraído, en los tres grupos de tratamiento en los que se utiliza diferentes tiempos de aplicación la disolución de ácido fosfórico mostró diferentes resultados. La mayor cantidad de calcio extraído se produjo en el grupo de peróxido de hidrógeno al 38% y 60 s de grabado ácido, a la profundidad de 0 μm . Figura 4.4.

Figura 4.4 Valores significativos de Ca^{2+} extraído ($\mu\text{g} / \text{mm}^2$) a diferentes niveles de profundidad a los 30 y 60 segundos de grabado ácido parte II.



Por otra parte, los análisis demuestran que se pierde más Ca^{2+} después de la inmersión en ácido fosfórico, a los 60 s que a los 30 s siendo esta diferencia estadísticamente significativa en los tres grupos estudiados. Finalmente, el test de ANOVA de una vía nos presenta que hay diferencias significativas entre el grupo control y los grupos con peróxido de hidrógeno al 38% y al 38,5% con el nivel de profundidad y el tiempo de grabado ácido, excepto para el nivel 4 (100 μ).

Varios estudios han corroborado que durante el blanqueamiento dental, el peróxido de hidrógeno puede penetrar a través del esmalte, dentina y llegar a la pulpa. La capacidad de penetración de los agentes blanqueadores depende de su concentración, pH, bajo peso molecular, su habilidad para sustituir elementos del hidroxiapatito y desnaturalizar proteínas, hecho que incrementa el movimiento de los iones a través de todas sus estructuras. Nuestro estudio muestra que todos los grupos que se sometieron a un blanqueamiento previo con peróxido de hidrógeno y después a un grabado con ácido fosfórico, presentan una desmineralización en toda la estructura esmalte hasta una profundidad de 100 micras.

De acuerdo con los estudios de Gómez y colaboradores (50), la cantidad de agente blanqueador que penetra a través de la estructura dental depende de muchos factores como la edad, el espesor y las características microestructurales del esmalte junto con la concentración del agente blanqueador. En nuestro estudio aunque no se tuvo en cuenta el espesor del esmalte en las muestras, nos revela que el peróxido de hidrógeno de alta concentración puede penetrar a través de toda la estructura, alcanzando hasta las 100 micras, espesor que se ha sido utilizado como referencia.

El otro factor que puede influir en la capacidad de penetración del peróxido en esmalte bovino y humano pueden ser las alteraciones que los agentes blanqueadores producen sobre la estructura del esmalte (49), Tales alteraciones pueden producirse por la sustitución de elementos en la molécula de hidroxiapatito transitorios o permanentes (46), la pérdida de iones de calcio (32) (42), los cambios en la relación calcio/fosfato (49) (42) (32)

y la pérdida de carbonatos y fosfatos. En nuestro estudio se corroboró que en todos los niveles de profundidad estudiados se eliminó calcio pero principalmente en la superficie.

Las características y la composición química de la superficie también puede ser otro factor que determine la desmineralización y a la mayor eliminación de calcio. El esmalte superficial está compuesto por cristales de apatito que en su superficie externa son ricos en carbonatos y fosfatos pobremente cristalinos que son más lábiles al ataque ácido.

Otros estudios demuestran que mediante el uso de diferentes técnicas analíticas (difracción de rayos X, IR y FTIR) que los agentes blanqueadores y el ácido fosfórico producen una importante alteración de la composición del mineral de hidroxiapatito a otras fases de fosfatos de calcio, además una importante pérdida de calcio en el esmalte y una significativa disminución de la proporción calcio/fosfato. Nuestros resultados indican que la mayor eliminación de calcio se presentó en la superficie, en los todos los grupos. Estos resultados corroboran los estudios de Efeoglu y col (46) y Lee KH y col (42) quienes mencionaron que la mayor tasa de descalcificación se presentó en la capa externa del esmalte debido a que las alteraciones estructurales de hidroxiapatito se producen principalmente en la superficie y van disminuyendo a medida que aumenta la profundidad.

Se han utilizado diferentes técnicas de análisis elemental o histoquímico para determinar la pérdida y los niveles de calcio en el esmalte. Entre ellas podemos citar el análisis electrónico, tomografía microcomputarizada (T-microC), espectrofotometría de absorción atómica (AA) (43) (32), espectroscopia infrarroja (IR), espectroscopia con transformada de Fourier (FTIR), espectrometría atómica de emisión de plasma (ICP-AES) (42), cromatografía (42), sonda atómica microanalizadora (EPMA) (42), microscopía de fuerza atómica (AFM).

En nuestro estudio la pérdida de calcio se cuantificó a través de la técnica microanalítica de espectrofotometría de absorción atómica. Como es bien conocido este método sirve para

cuantificar la capacidad de desmineralización de ácidos y sustancias quelantes y para determinar la cinética de desmineralización (43).

Los resultados de este estudio demuestran que existe una pérdida significativa de calcio tanto en dientes no blanqueados y blanqueados previamente con peróxido de hidrógeno a alta concentración (38 y 38,5%) y grabados con ácido fosfórico al 37%. Lo que corrobora la alta capacidad de desmineralización del ácido fosfórico.

Los grupos tratados con peróxido de hidrógeno al 38 y 38,5% (72 horas) previamente y grabados durante 60 segundos con ácido fosfórico fueron los que más calcio eliminaron. Esto podría deberse a la combinación de los efectos oxidante y/o ácido de los agentes químicos utilizados y el aumento del tiempo de grabado.

En cuanto al tiempo de grabado con ácido fosfórico, se observa que a medida que aumenta el tiempo, aumenta la eliminación de calcio. Esto también podría deberse al comportamiento que tiene el ácido fosfórico sobre un sustrato. En los primeros minutos de acción del ácido fosfórico es cuando se eliminó la mayor cantidad de calcio hasta estabilizarse a mayores tiempos de exposición, posiblemente debido al efecto tampón del fosfato movilizado por la disolución del esmalte.

4.2 ANÁLISIS MICROQUÍMICO DEL EFECTO DEL ÁCIDO FOSFÓRICO SOBRE ESMALTE BOVINO

4.2.1 Análisis por absorción atómica

En la tabla 4.3 que presentamos a continuación se resumen los principales resultados del estudio, exponiéndose los promedios obtenidos de la series para cada intervalo de tiempo, de la concentración de calcio liberado (ppm), pérdida de calcio en miligramos y el porcentaje de calcio eliminado con respecto al peso inicial.

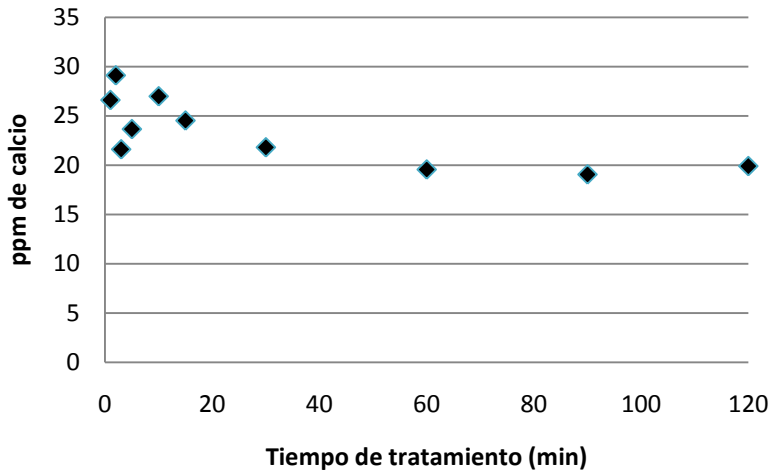
Tabla 4.3 Calcio liberado en función del tiempo de tratamiento con ácido fosfórico. Resumen de promedios obtenidos de las series para cada intervalo de tiempo, de la concentración de calcio liberado (ppm), pérdida de calcio en miligramos y porcentaje de calcio eliminado con respecto al peso inicial.

Tiempo (min)	Promedio de ppm de calcio liberado	Desviación estándar	Promedio de pérdida de calcio en mg	Desviación estándar	Promedio del porcentaje de calcio eliminado referido al peso inicial	Desviación estándar
1	20,9	12,9	1,0	0,7	3,4	2,3
2	22,6	29,9	1,1	1,5	3,7	5,0
3	15,3	8,7	0,7	0,5	2,5	1,6
5	19,3	9,1	0,9	0,5	3,1	1,7
10	21,3	11,5	1,0	0,6	3,5	2,0
15	24,1	0,7	1,2	0,7	3,9	2,4
30	17,4	0,6	0,9	0,6	2,8	1,9
60	14,8	0,7	0,7	0,7	2,4	2,4
90	22,0	12,0	1,1	0,6	3,6	2,1
120	28,5	21,0	1,4	0,6	4,7	1,9
1440	20,9	14,0	1,0	0,7	3,5	2,4

La figura 4.5 muestra la cantidad acumulada de Ca^{2+} extraído del esmalte en polvo expuesto a la disolución de ácido fosfórico a diferentes intervalos de tiempo. La mayor extracción de calcio tiene lugar en los primeros 5 minutos, estabilizándose aproximadamente a los 30 minutos, valor que permanece

constante hasta 1440 minutos, que es el tiempo final al que se lleva el experimento. En estos primeros minutos se produce la disolución principal de la parte mineral del esmalte dejando libre el ion Ca^{2+} .

Figura 4.5 Cantidad de Ca^{2+} (ppm) extraído del esmalte en polvo tratado con ácido fosfórico en función del tiempo.



4.2.2 Análisis por IR

La tabla 4.4 resume los principales resultados significativos de los análisis de correlación entre los diferentes parámetros composicionales determinados por FTIR y el tiempo de exposición a la solución ácida.

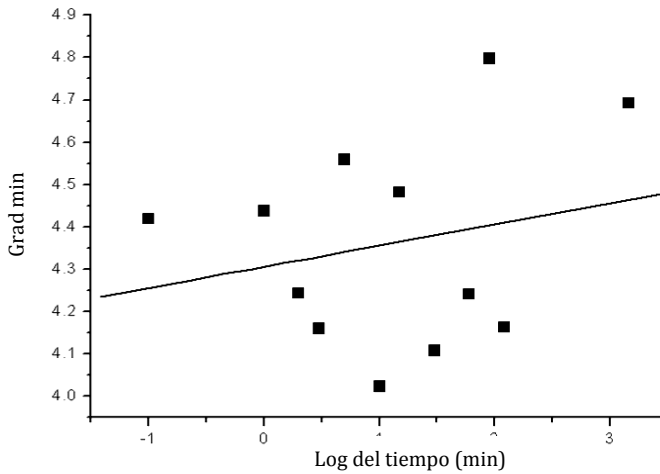
Tabla 4.4 Análisis de correlación de los diferentes parámetros composicionales de esmalte determinados a partir del espectro de FTIR y el tiempo de tratamiento con ácido fosfórico.

(R) representa los coeficientes de correlación de Pearson. (N) es el número de especímenes. Los valores en color rojo representan los componentes minerales y en azul componentes orgánicos. Los valores por debajo o igual a $P < 0,05$, que indican que existe una relación estadísticamente significativa, se han marcado con asteriscos.

Log Tiempo			
	R	P	N
Gradmin	0,226	0,480	12
Min CO₃²⁻	-0,887	0,000**	12
a1405	-0,818	0,001**	12
a1460	-0,661	0,019*	12
a1550	-0,092	0,775	12
a1660	0,665	0,018*	12
a954	-0,472	0,122	12
a1005	-0,489	0,106	12
a1030	0,81	0,001*	12
a1058	0,336	0,285	12
a1095	-0,544	0,067	12
a1138	-0,028	0,932	12

Aunque la eliminación de Ca^{2+} indica una pérdida progresiva del componente mineral con el tiempo, se encontró que el grado de mineralización (gradmin: medida como la razón entre fosfato sobre amida total) no cambió significativamente con el tiempo de exposición a la solución ácida (tabla 4.4 y figura 4.6). La constancia del grado de mineralización sugiere que tanto la parte mineral como la orgánica se pierden simultáneamente y en igual proporción durante la exposición al ácido. Esto hace que la proporción mineral-amida total se mantenga más o menos constante. Sin embargo, otros parámetros composicionales determinados por análisis de FTIR nos muestran, que la exposición de los especímenes de esmalte a la solución de ácido fosfórico modifica la parte mineral y orgánica de una forma muy definida.

Figura 4.6 Grado de mineralización (gradmin) en función del tiempo de tratamiento con ácido fosfórico. El grado de mineralización medido como la relación entre fosfato y la amida total, no cambia significativamente con el tiempo de exposición al ácido.



Con respecto a la parte mineral, existe una correlación positiva entre el tiempo de exposición al ácido y los valores a_{1030} (área del pico asociado a los fosfatos altamente cristalinos) y una correlación negativa entre el tiempo de exposición al ácido y los valores a_{954} (área del pico asociada a los fosfatos pobremente cristalinos) (ver tabla 4.4 y figura 4.7). Estos resultados indican que el fosfato pobremente cristalino/amorfo es preferencial y selectivamente eliminado por la solución ácida durante los procesos de desmineralización.

Adicionalmente, existe una correlación negativa entre el porcentaje de carbonatos en la parte mineral (CO_3^{2-} min) y el tiempo de exposición al ácido (ver tabla 4.4 y figura 4.8). Estos resultados indican que los componentes de la parte mineral ricos en carbonatos son también preferencialmente y selectivamente eliminados por el ataque ácido.

Figura 4.7 Área relativa del pico a 954 cm^{-1} , asociado al fosfato pobremente cristalino, en función del tiempo de tratamiento con ácido fosfórico.

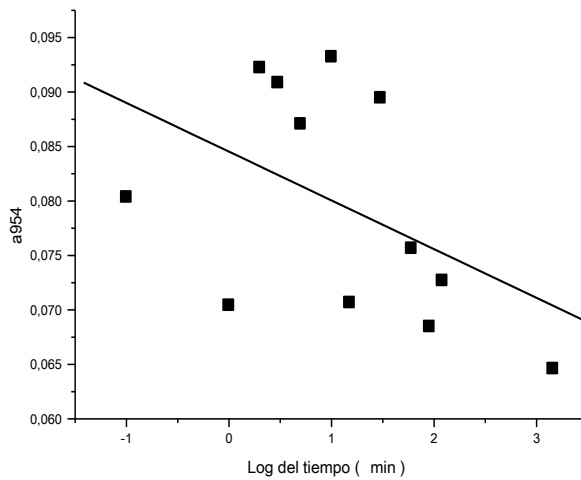
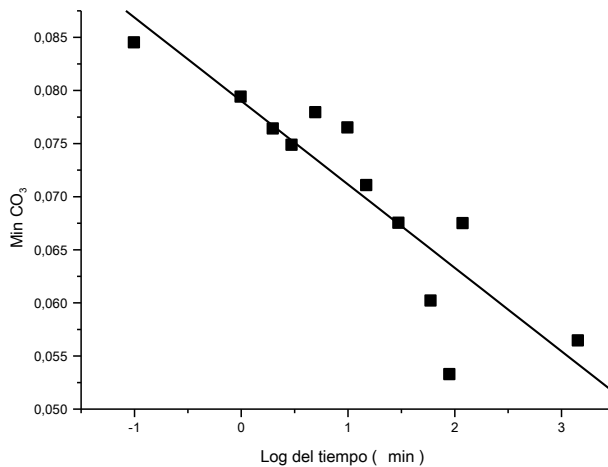


Figura 4.8 Contenido de carbonato en la parte mineral en función del tiempo de tratamiento con ácido fosfórico.

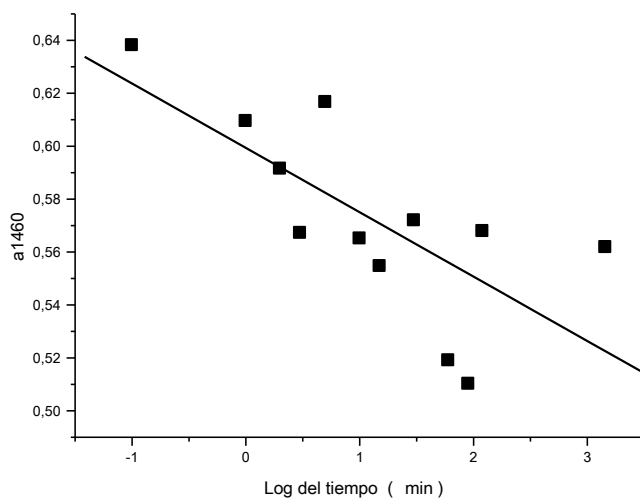


Por otro lado, los análisis de correlación de los parámetros composicionales determinados por FTIR presentan que la composición de la matriz orgánica, caracterizada por el área de los picos de absorción de las diferentes bandas de amidas, también cambia de una forma muy marcada durante el tratamiento ácido. Más específicamente, hemos observado que

existe una correlación positiva entre el área del pico de los grupos de amida I y el tiempo de exposición a la solución ácida. Mientras que existe una correlación negativa entre el área del pico de la banda a 1460 cm^{-1} con el tiempo de exposición a la solución ácida (ver tabla 4.4 y figura 4.9). Estos resultados indican que los componentes orgánicos que contribuyen a la banda 1460 cm^{-1} se pierden preferencialmente mientras progresa el proceso de desmineralización, mientras que los remanentes quedan enriquecidos en amida I.

La principal contribución a esta banda son los grupos $-\text{CN}$ y $-\text{CH}$ de las proteínas (ricas en aminoácidos tipo prolina) y lípidos (95) (96), lo que indica que la materia orgánica de naturaleza hidrofóbica se pierde selectivamente por la exposición al ácido. Estos componentes están asociados a proteínas de la familia de las amelogeninas, las cuales son ricas en aminoácidos tipo prolina y son de naturaleza hidrofóbica (1) (96). También se ha analizado si existió algún cambio en la posición de los picos de amida I. Sin embargo no observamos ningún cambio significativo en la posición de esta banda, lo cual nos indica que no existe ningún cambio en la conformación o desnaturalización de las proteínas.

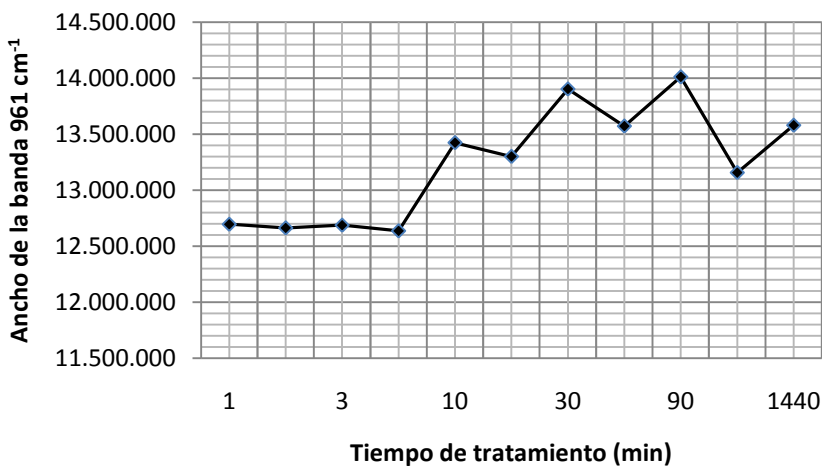
Figura 4.9 Área relativa del pico a 1460 cm^{-1} asociada a grupos CN y CH en función del tiempo de tratamiento con ácido fosfórico.



4.2.3 Análisis por Raman

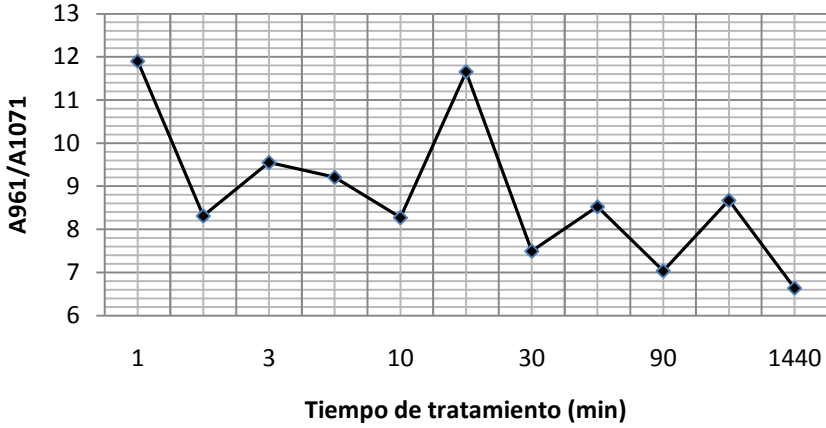
En los análisis realizados por RAMAN se observa que a partir de los 10 minutos del tratamiento con H_3PO_4 la cristalinidad del material decae. (Aumenta el ancho de banda para el pico a 961 cm^{-1}). En la figura 4.10 se muestran estos datos, sin embargo, estos resultados son contradictorios con los obtenidos mediante FTIR, que indican que hay una pérdida de los componentes poco cristalinos. En nuestra opinión los resultados de FTIR son más fiables al ser más fácilmente cuantificables (medidas de área).

Figura 4.10 Índice de cristalinidad. FWHM para la banda correspondiente a 961 cm^{-1} $\nu_1 PO_4^{3-}$.



En la figura 4.11 se representa la pérdida de carbonato tipo B en función del tiempo, como se puede observar existe una tendencia negativa, lo que confirma los resultados obtenidos mediante FTIR.

Figura 4.11 Relación A961/A1071 PO_4^{3-}/CO_3^{2-} tipo B.



4.2.4 Análisis por adsorción de N_2 y CO_2

Las isotermas de adsorción de N_2 de la muestra control y la tratada con ácido fosfórico al 37% durante 30 segundos se comportan como isotermas del tipo II de la clasificación BDDT (97), de gases sobre sólidos no porosos. La presencia de histéresis en estas isotermas podría deberse a la existencia de cavidades en las que se produce la adsorción en multicapa hasta que se produce la condensación. Figura 4.12. En ambos casos el punto donde la rama de desorción se aproxima a la de adsorción corresponde a una presión relativa próxima a 0,4 lo que está de acuerdo con lo que se ha descrito en Gregg y Sing (85). Figura 4.13.

Figura 4.12 Isotermas de adsorción de N_2 de la muestra blanco. Marcador relleno presenta la adsorción y marcador sin relleno la desorción.

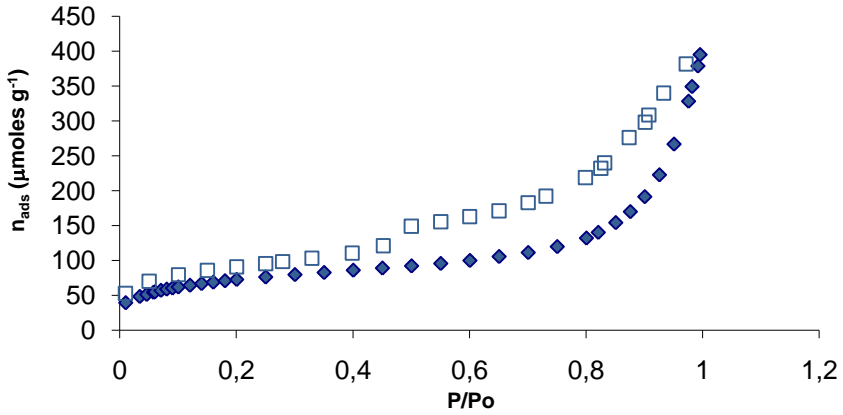
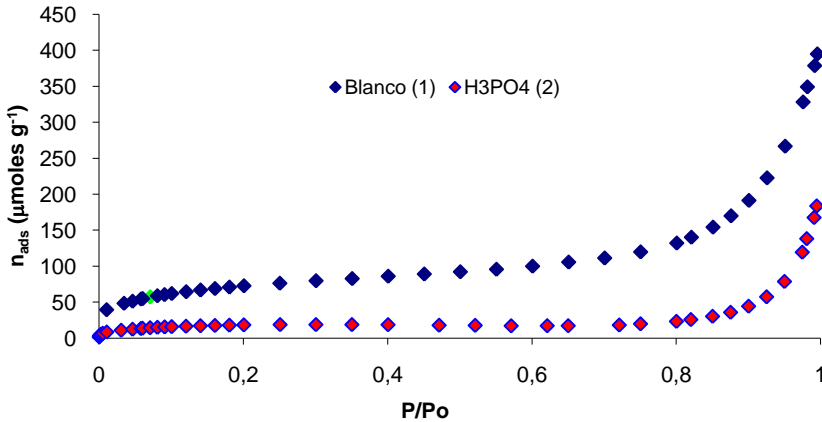


Figura 4.13 Isotermas de adsorción de N_2 de la muestra blanco y la tratada con ácido fosfórico al 37%.



Las isotermas se analizaron mediante el método BET. Aunque este modelo se admite como excesivamente simple y es muy criticado, la teoría conduce a una expresión, la ecuación de BET, que cuando se aplica racionalmente ha demostrado ser bastante buena para estimar la superficie específica a partir del valor calculado de capacidad de la monocapa. También se ha obtenido el valor de la monocapa a partir del denominado punto B con

objeto de validar los resultados BET. Los resultados se presentan en la tabla 4.5.

Tabla 4.5 Análisis de las isotermas de adsorción mediante el método BET y punto B de la muestra control y la tratada con ácido fosfórico al 37%.

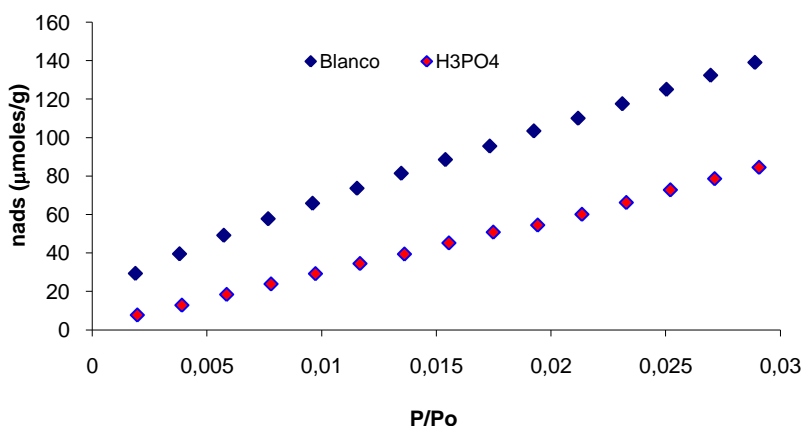
Muestra		BET		Punto B	
		$n_m(\mu\text{moles/g})$	$S(\text{m}^2/\text{g})$	$n_B(\mu\text{moles/g})$	n_m/n_B
Control	1	58,08	5,7	64,32	0,90
H ₃ PO ₄	2	14,08	1,4	15,79	0,89

Los resultados obtenidos por ambos métodos concuerdan bastante bien, manteniéndose los valores de n_m/n_B muy próximos a 1.

Nuestros hallazgos más relevantes son los que indican que el tratamiento con H₃PO₄ al 37% produce una severa disminución de la superficie específica de la muestra de 5,7 a 1,4 (m²/g), como lo podemos observar en la tabla 4.5.

En las isotermas de adsorción de CO₂ el grado de cubrimiento de la superficie se mantiene muy próximo a 0, lo que queda reflejado en la linealidad de las isotermas figura 4.14. Se ha sugerido (Gregg y Sing) (85) que debido al elevado momento cuadrupolar del CO₂ las isotermas de adsorción son muy sensibles a la presencia de grupos polares o iones en la superficie del sólido. De hecho se encuentra en la bibliografía estudios de la adsorción de CO₂ sobre hidroxiapatito cálcico en los que se relaciona dicha adsorción con la presencia de grupos OH⁻ en la superficie (98). El tratamiento con H₃PO₄ al 37% tiene el mismo efecto respecto a la adsorción de este gas que el obtenido a partir de la adsorción de N₂.

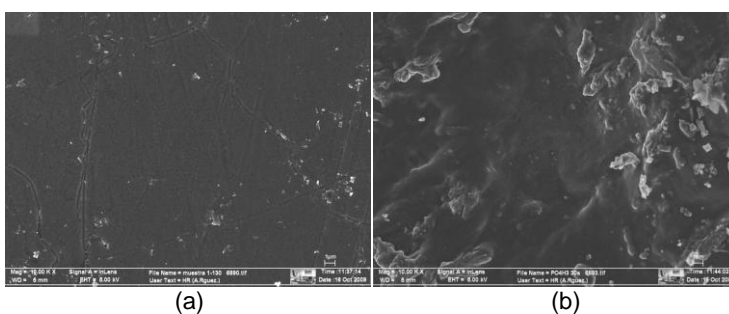
Figura 4.14 Isotermas de adsorción de CO_2 de la muestra control y la tratada con ácido fosfórico al 37%.



4.2.5 Análisis por SEM

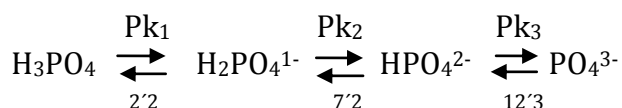
Por otra parte, la superficie de las muestras intactas control y las tratadas con H_3PO_4 al 37%, se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). En estos análisis se puede observar la alteración de la superficie y la desorganización de la estructura y de los cristalitos. En la figura 4.15 (a) en la muestra de control se puede observar una superficie lisa y en la figura (b), que corresponde a una muestra tratada con ácido fosfórico, se observa un aumento de la rugosidad, desorganización de la estructura y aparición de valles.

Figura 4.15 Microfotografías por SEM de esmalte bovino a 10.000 X. En la figura (a) se observa esmalte sin tratamiento y en la figura (b) se observa esmalte tratado con ácido fosfórico al 37%.



En nuestro estudio se ha investigado con detalle, la evolución de la composición química del esmalte durante el proceso de desmineralización dado por el ácido fosfórico. Usamos en este estudio polvo de esmalte como material de prueba, con el objetivo de tener un material más homogéneo e incrementar substancialmente la superficie expuesta al ataque ácido, ya que los efectos y resultados son más evidentes en este tipo de muestra y se evitan los efectos de la dilución que se presentan en las muestras sólidas.

Los datos de Absorción Atómica muestran que la cantidad de Ca^{2+} movilizado por el tratamiento ácido fue más alto en los primeros minutos y empieza a ser constante después de pocos minutos. La posible explicación es que las tasas de saturación de Ca^{2+} eliminado, están asociadas al hecho de que los fosfatos minerales (99) tienen la capacidad de neutralizar el ácido de acuerdo al siguiente equilibrio químico para disolver fosfatos:



Por otra parte, los análisis mediante FTIR pueden directa y simultáneamente proporcionar información cuantitativa (100) y estructural (95) acerca de los constituyentes moleculares de la parte mineral y orgánica que forman el esmalte (100). Los datos de FTIR muestran que el fosfato pobremente cristalino y los carbonatos de la parte mineral son preferencialmente eliminados del esmalte y esto es presuntamente la causa principal de liberación de Ca^{2+} asociada a la exposición al ácido. La eliminación selectiva de esos componentes minerales puede ser explicada por la disolución de las capas externas de los cristales de apatita los cuales son ricos en fosfato pobremente cristalino y carbonato. Estos componentes están más expuestos al ataque ácido, son más reactivos y fáciles de disolver (101) (102). Por el contrario, la parte interna de los cristales está formada por apatita más cristalina, lo que la hace más resistente al ataque químico y a permanecer dentro del esmalte.

Al mismo tiempo, los datos de FTIR muestran que los componentes orgánicos ricos en grupos hidrofóbicos son preferencialmente eliminados durante la exposición al ácido. Estos componentes son probablemente proteínas de la familia de las amelogeninas (ricas en prolina) las cuales están distribuidas en el espacio intercrystalino y en la periferia de los cristales (13). Esto las hace estar más expuestas y susceptibles al ataque ácido y es por esta razón que son fácilmente eliminadas.

El proceso de desmineralización, es una interacción específica de los ácidos con el esmalte (103) y depende de las características de cada uno (104). Se ha demostrado que la tasa de pérdida de mineral depende del tipo de ácido, el tiempo de exposición, temperatura, cantidad y concentración de protones (pH) (105). Por el contrario en el esmalte, depende de la edad, grado de mineralización, metabolismo etc. Por lo tanto el proceso de desmineralización del esmalte puede variar dependiendo del grado de maduración y la edad, esto puede tener importancia clínica, ya que los efectos del grabado ácido pueden ser diferentes en dientes recién erupcionados o en dientes maduros.

Vale la pena resaltar que las amelogeninas juegan también un papel importante en la mineralización del esmalte y se cree que regulan la nucleación y el crecimiento de cristales de apatita (106). De hecho, se han utilizado para facilitar la remineralización del esmalte in vitro (107). Por lo tanto, la eliminación de estos componentes por el ataque de ácido fosfórico, podría disminuir la capacidad de esmalte de remineralizar in vivo. Tratamientos clínicos de grabado con ácido fosfórico o consumo de bebidas que contienen ácido fosfórico, podría no sólo inducir una desmineralización del esmalte, sino que podría impedir su remineralización a través de la saliva. En cualquier caso, es de gran importancia clínica, el conocer la capacidad de eliminación de materia orgánica y el efecto sobre la estructura de las proteínas de agentes químicos utilizados clínicamente para diferentes tratamientos.

En cuanto a la observación de la superficie por SEM, nuestros resultados coinciden con los resultados obtenidos en el estudio de Watari (108), donde se observó una alta tasa de

desmineralización a través de un patrón de grabado tipo I, siendo el ataque ácido más pronunciado dentro del prisma que en la periferia, una desorganización estructural y aparentemente una pérdida de sustancia interprismática y un redondeado de los bordes de los prismas. Por el contrario Reis y col (99), en su estudio presentan que la morfología del esmalte humano y bovino fue similar después del grabado con H_3PO_4 al 35%.

En resumen, observamos que el tratamiento con ácido fosfórico induce una pérdida de calcio mayor en los primeros 5 minutos estabilizándose aproximadamente a los 30 minutos valor que permanece constante con el tiempo. También se ha observado que induce cambios severos en la superficie del esmalte, representado por los resultados obtenidos a través de SEM y de las isotermas de adsorción. Además de cambios importantes en la estructura inorgánica e orgánica, con disminución del contenido de fosfatos, pérdida de proteínas principalmente de la familia de las amelogeninas y disminución del índice de cristalinidad.

4.3 ANÁLISIS MICROQUÍMICO DEL EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO SOBRE EL ESMALTE BOVINO

Con objeto de analizar el efecto del tratamiento con peróxido de hidrógeno, se ha estudiado cómo varía la composición y microestructura del esmalte mediante diferentes técnicas analíticas, obteniéndose los siguientes resultados:

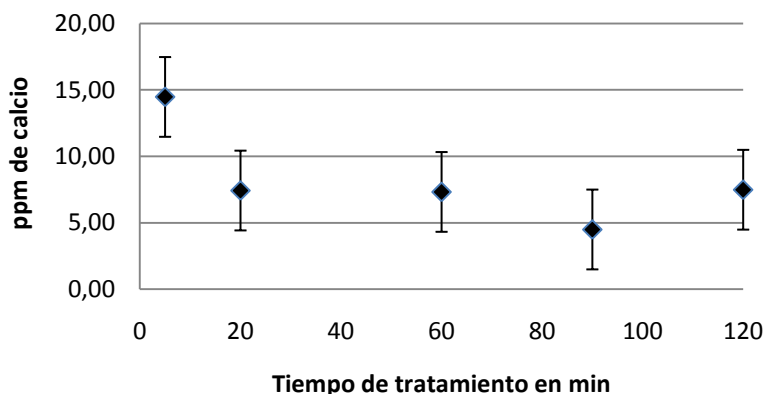
4.3.1 *Análisis por absorción atómica*

En la siguiente tabla 4.6 se muestran los valores medios de calcio liberado para diferentes tiempos de tratamiento. La cantidad de calcio se expresa en ppm, en miligramos y en tanto por ciento referido al peso inicial.

Tabla 4.6 Calcio liberado en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%. Valores promedios obtenidos para cada serie y cada intervalo de tiempo. El calcio liberado se expresa en ppm, miligramos y porcentaje respecto al peso inicial de esmalte en polvo.

Tiempo (min)	ppm de calcio	Desviación estándar	Pérdida de calcio en mgs	Desviación estándar	% de calcio eliminado referido al peso inicial	Desviación estándar
5	14,47	15,87	1,34	1,70	4,45	5,66
20	7,43	3,18	0,32	0,13	1,08	0,42
60	7,33	4,66	0,36	0,24	1,19	0,81
90	4,50	2,64	1,57	3,33	5,23	11,09
120	7,49	4,91	1,25	2,33	4,17	7,78

Figura 4.16 Cantidad de Ca^{2+} (ppm) extraído del esmalte en polvo tratado con peróxido de hidrógeno al 30% en función del tiempo.



A partir de estos datos podemos concluir que existe efectivamente pérdida de calcio con el tratamiento con el peróxido de hidrógeno al 30%. Además, esta pérdida es mayor durante los cinco minutos iniciales de tratamiento, manteniéndose la tasa de pérdida constante para tiempos más largos.

4.3.2 Análisis por IR

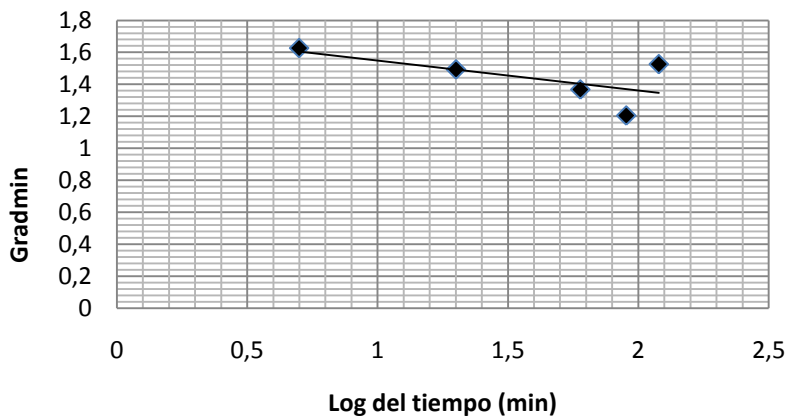
A partir de los espectros IR se determinaron diferentes parámetros que definen la composición del esmalte a nivel molecular. La tabla 4.7 resume los principales resultados significativos de los análisis de correlación entre los diferentes parámetros composicionales determinados por FTIR y el tiempo de exposición a la solución de peróxido.

Tabla 4.7 Análisis de correlación de los diferentes parámetros composicionales del esmalte determinados a partir del espectro de FTIR y el tiempo de tratamiento con peróxido de hidrogeno al 30%. (R) representa los coeficientes de correlación de Pearson. Los valores por debajo 0 igual a $P < 0,05$ se han resaltado en negrita. (N) es el número de especímenes. Los valores en color rojo representan los componentes minerales y en azul componentes orgánicos.

	Log Tiempo		
	R	P	N
gradmin	0,715	0,110	6
min CO₃²⁻	-0,813	0,049*	6
a1405	-0,133	0,802	6
a1460	0,388	0,447	6
a1550	0,292	0,574	6
a1660	-0,663	0,177	6
a956	0,720	0,107	6
a985	-0,426	0,399	6
a1005	0,282	0,589	6
a1030	-0,619	0,191	6
a1058	-0,583	0,224	6
a1095	-0,681	0,137	6
a1138	0,720	0,107	6
Cl	-0,306	0,555	6

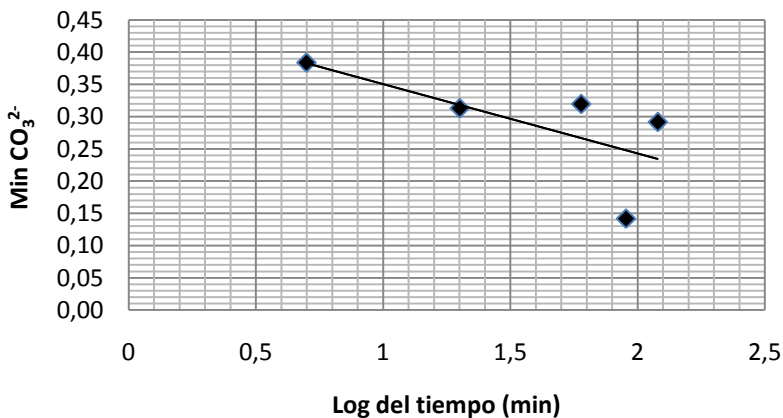
En la figura 4.17 se muestra el efecto del peróxido de hidrógeno al 30% sobre el grado de mineralización en función del tiempo. El grado de mineralización, medido como la relación entre fosfato y amida total, no cambia significativamente con el tiempo de exposición. Esto indica que tanto la parte mineral como la orgánica se pierden simultáneamente y en igual proporción durante la exposición al peróxido. Esto hace que la proporción mineral-amida total se mantenga más o menos constante. Sin embargo, otros parámetros composicionales determinados por análisis de FTIR nos muestran, que la exposición de los especímenes de esmalte a la solución de peróxido de hidrógeno modifica al menos la parte mineral y orgánica de una forma muy definida.

Figura 4.17 Grado de mineralización (gradmin) en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%.



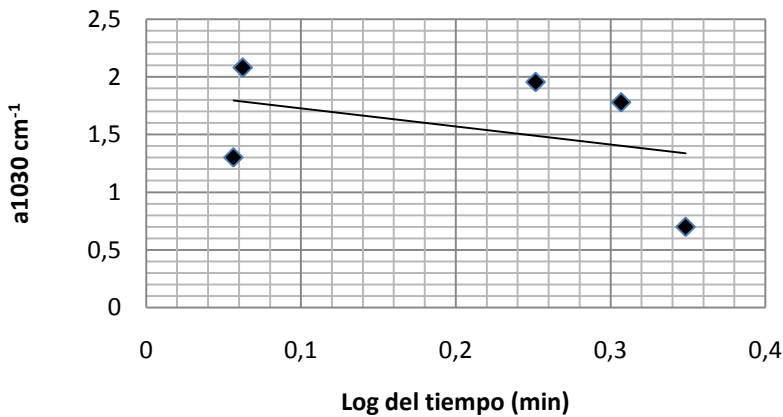
En particular, se observa una correlación negativa entre el porcentaje de carbonato en el mineral (MinCO_3^{2-}) y el tiempo de tratamiento (tabla 4.7 y figura 4.18). Esto indica que hay un ataque selectivo y una pérdida de la parte mineral rica en carbonato (más lábil), que puede ser debido a que esta parte está en la superficie de los cristales e íntimamente asociada a la parte orgánica que es atacada (oxidada) por el peróxido.

Figura 4.18 Contenido de carbonato en la parte mineral en función del tiempo de tratamiento con peróxido al 30%.



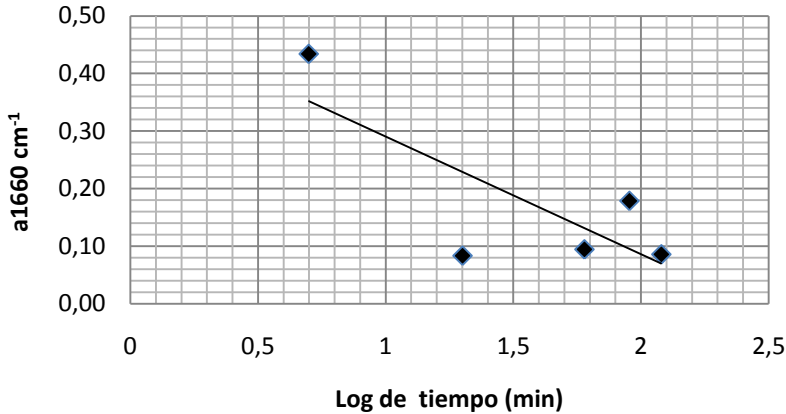
Con respecto a la parte inorgánica, valores en color azul de la tabla 4.7, se observa una correlación positiva entre el tiempo de exposición al peróxido y los valores de a_{956} (fosfato pobremente cristalino), a_{1005} , a_{1138} y una correlación negativa entre el tiempo de exposición al peróxido de hidrógeno y los valores a_{985} , a_{1030} - a_{1058} (apatito altamente cristalino), a_{1095} . En la figura 4.19 se observa el efecto del peróxido de hidrógeno sobre el del fosfato altamente cristalino en función del tiempo. Sin embargo, ninguna de estas relaciones son estadísticamente significativas, por lo que no se puede decir que el tratamiento afecte directamente los fosfatos.

Figura 4.19 Área relativa del pico $a_{1030} \text{ cm}^{-1}$ asociado al fosfato altamente cristalino en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%.



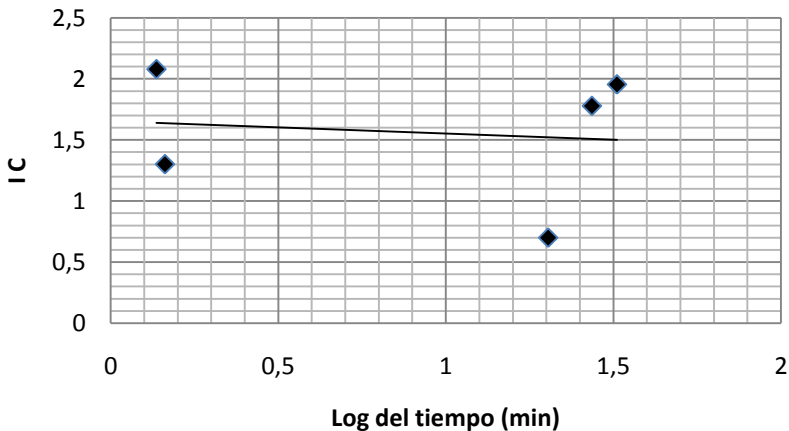
Con respecto a la parte orgánica, valores resaltados en color rojo en la tabla 4.7, se observa una correlación positiva entre el tiempo de exposición al peróxido y los valores de a_{1460} y a_{1550} . Una correlación negativa con los valores a_{1405} , a_{1660} (amida tipo I). Sin embargo ninguna de estas correlaciones son estadísticamente significativas y no permiten extraer conclusiones al respecto. En la figura 4.20 se muestra el comportamiento de la banda a_{1660} en función del logaritmo del tiempo, parece que hay una pérdida inicial de este componente.

Figura 4.20 Área relativa del pico a 1660 cm^{-1} asociado al componente orgánico amida I en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%.



En cuanto al índice de cristalinidad, no se observa una correlación significativa con el tiempo de exposición. Figura 4.21.

Figura 4.21 Área relativa del pico asociado con el índice de cristalinidad (IC) en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%.



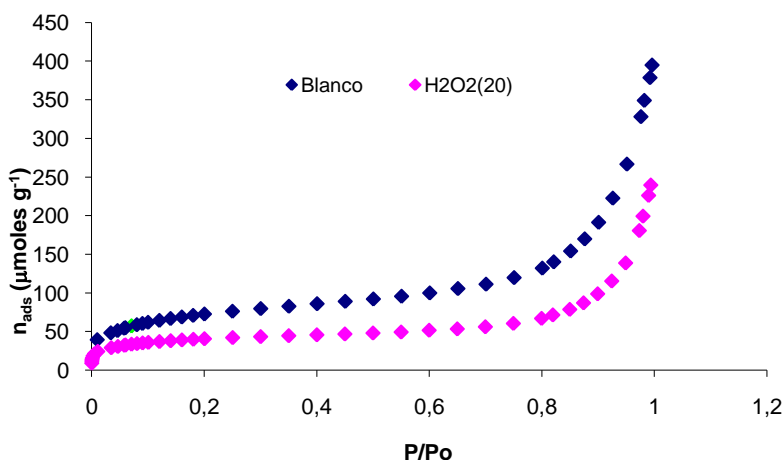
En conclusión, los análisis de infrarrojos de la serie 1 y serie 2 tratadas con peróxido de hidrógeno al 30% indican que hay una pérdida selectiva de la parte mineral rica en carbonatos (más lábil) y que podría ser la fuente principal de calcio liberado. Sin embargo, el resto de los parámetros composiciones determinados permanecen inalterados.

4.3.3 Análisis por adsorción de N_2 y CO_2

Las isothermas de adsorción de nitrógeno en estas muestras son también del tipo II de la clasificación de BDDT, mostrando un ciclo de histéresis a altas presiones relativas que, como ya se ha mencionado en el apartado 4.2.3 se puede relacionar con la presencia de cavidades en las que se produce la adsorción. Figura 4.22.

La disminución de superficie específica es menor que la producida por el tratamiento con ácido fosfórico.

Figura 4.22 Isothermas de adsorción de N_2 de la muestra control (blanco) y la tratada con peróxido de hidrógeno al 30% durante 20 minutos.



Las isothermas también fueron analizadas mediante el método BET y los datos de superficie y punto B de las muestras control y las tratadas se recogen en la siguiente la tabla 4.8.

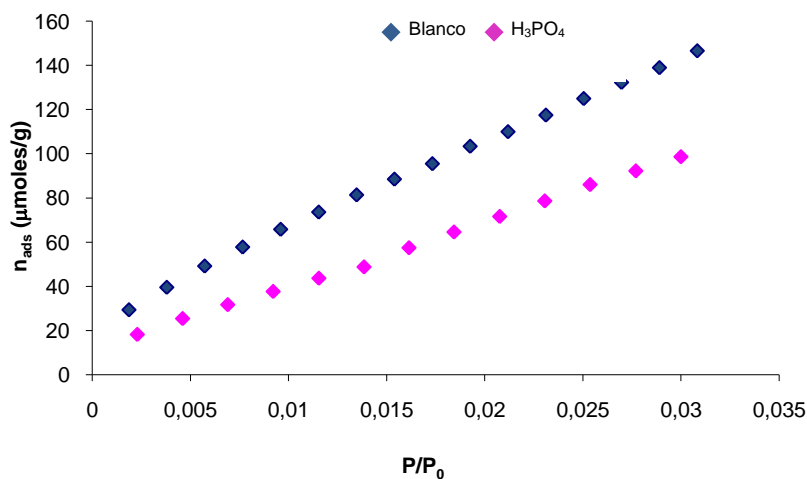
Tabla 4.8 Análisis de las isotermas de adsorción mediante el método BET y punto B de la muestra, control y la tratada con peróxido de hidrógeno al 30% durante 20 min.

Muestra		BET		Punto B	
		n_m (μ moles/g)	S (m^2/g)	n_B (μ moles/g)	n_m/n_B
Control(1)	1	58,08	5,7	64,32	0,90
H ₂ O ₂ (20)	8	31,74	3,1	33,54	0,94

Los resultados obtenidos por ambos métodos concuerdan bastante bien manteniéndose los valores de n_m/n_B muy próximos a 1. Los tratamientos con peróxido de hidrógeno producen una disminución de la superficie específica de la muestra, aunque esta es menos importante que la obtenida con ácido fosfórico.

El tratamiento con peróxido de hidrógeno produce también una disminución en la adsorción de CO₂ como se refleja en la figura 4.23, aunque esta es superior que la muestra tratada con ácido fosfórico.

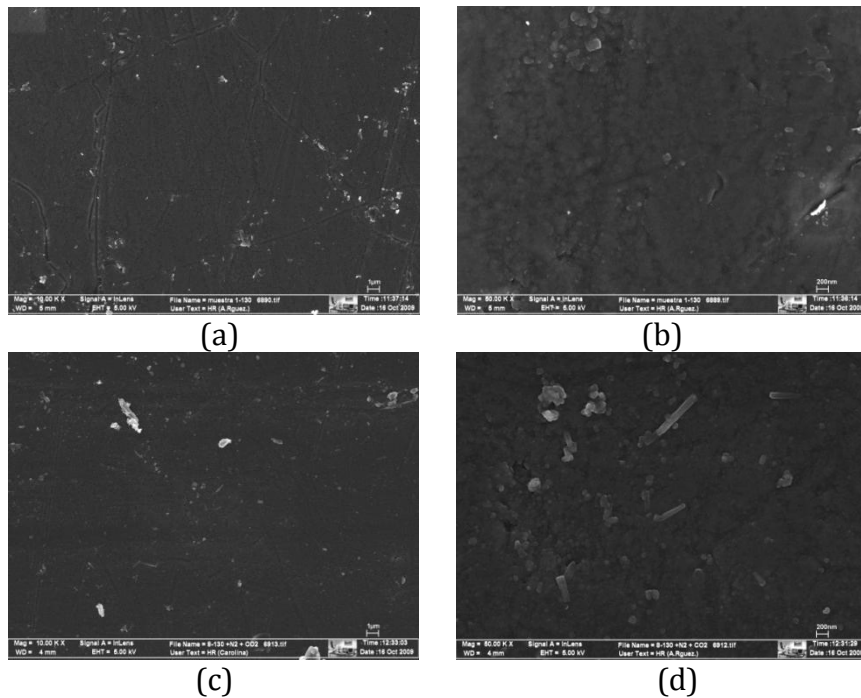
Figura 4.23 Isotermas de adsorción de CO₂, de la muestra control y la tratada con peróxido de hidrógeno al 30% durante 20 minutos.



4.3.4 Análisis por SEM

Los resultados encontrados mediante SEM, muestran que en la superficie del esmalte tratado con peróxido de hidrógeno al 30% durante 20 minutos, es irregular, desorganizada, de apariencia rugosa, con una mayor identificación de los nanocristales y de los espacios intercristalinos y presencia de grietas. Figura 4.24 (c) y (d).

Figura 4.24 Microfotografías por SEM de esmalte bovino a 10.000 X y 50.000 X. En la figura (a) y (b) esmalte sin tratamiento (control) y en la figura (c) y (d) esmalte tratado con peróxido de hidrógeno al 30% durante 20 minutos.



Por medio de este ensayo se demuestra que la exposición a una solución de peróxido de hidrógeno afecta tanto a la parte orgánica e inorgánica del esmalte y sus efectos dependen de su concentración, pH y del tiempo de contacto. Los resultados ponen de manifiesto que la exposición a este agente produce disolución del esmalte, mediante mecanismos de oxidación proteica, y también muestra cambios en sus componentes minerales.

En concreto, este estudio revela que el tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% induce una importante pérdida de calcio lo que indica que tiene un potente efecto desmineralizante. Este hallazgo coincide con los estudios de Al- Salehi y col (37) y Lee y col (42). La pérdida se hizo más evidente durante los primeros minutos de contacto, estabilizándose con el tiempo. Estos resultados corroboran también los hallazgos del estudio de Chow y Takagi (4) en el que se describe cómo la tasa de desmineralización se hace constante después de los dos días. Por el contrario, el estudio de Ushigome y col (109), muestra que la cantidad de calcio disuelto aumenta a medida que aumenta el tiempo de inmersión en la solución. La estabilización de la pérdida de calcio podría deberse a que sólo se moviliza calcio de componentes específicos de mineral. En particular, hemos visto que el peróxido produce un ataque selectivo de la parte superficial de los cristales que es más rica en carbonatos y componentes orgánicos. Por otra parte, la estabilización podría deberse a una acción tampón del fosfato disuelto que podría neutralizar en parte la acidez de la solución de peróxido y disminuir la capacidad de disolver el mineral. Otro efecto combinado sería la neutralización de los radicales libres generados por el peróxido al reaccionar con la materia orgánica y mineral del esmalte.

Los análisis mediante IR de la composición del esmalte durante el transcurso de los experimentos permite detectar que el tratamiento con peróxido modifica la composición de este material. Nuestros hallazgos indican que determinados componentes orgánicos y minerales del esmalte son movilizados por la acción del peróxido de hidrógeno. Esto se deduce a partir de los cambios en la intensidad de las bandas de las amidas y fosfatos en los espectros de IR. En particular se ha observado que la proporción carbonato/mineral disminuye y que la banda de fosfatos empieza a ser mas aguda, indicando que el fosfato que permanece después del tratamiento es el de mayor cristalinidad. Estos hallazgos son similares a los encontrados en los estudios de Jian T y col 2007 (47), Feride y col (19) en los que mencionan que después de una exposición a ácido buffer, los carbonatos que están en el hidroxiapatito se pierden, quedando el material enriquecido en los componentes de mayor cristalinidad.

Adicionalmente, los análisis mediante IR muestran que existen cambios conformacionales en las proteínas del esmalte. En particular, la región de la amida I nos informa de la estructura proteica secundaria. El pico de la banda está localizado a 1637 cm^{-1} , cuando las estructuras de las proteínas están principalmente conformadas por una estructura helicoidal, con una banda alfa y otra beta. Después del tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%, la frecuencia de esta banda se desplaza de 1637 cm^{-1} a 1646 cm^{-1} , lo que sugiere que ha habido un cambio conformacional por un enrollamiento al azar, que trae como consecuencia que la estructura proteica cambia de la forma β a una estructura desorganizada. Esto indica que el tratamiento produce una desnaturalización de las proteínas. Adicionalmente se observa que la intensidad de la banda disminuye significativamente, indicando una disminución en la concentración de la proteína (19).

Por otra parte, los cambios en los componentes minerales se pueden explicar por la disolución de las capas que envuelven los cristales del esmalte. Esto sugiere que una de las más importantes características de las apatitas pobremente cristalinas (esmalte, dentina y hueso), es la presencia de ambientes lábiles no apatíticos de iones fosfato y carbonato (106); Se cree que esos ambientes crean una capa que mantiene hidratada la superficie de los cristales, mientras que el núcleo cristalino contiene la fase organizada del hidroxapatito. (106) La capa hidratada puede jugar un papel importante en la homeostasis de calcio y otras interacciones de los cristales con el medio. También podría jugar un papel en las propiedades mecánicas y químicas de los tejidos mineralizados (110).

La razón entre el área de las bandas $\nu_{1030}\text{ cm}^{-1}/\nu_{1020}\text{ cm}^{-1}$ es una medida de la cristalinidad de la parte mineral y está relacionada con el tamaño de los cristales de apatito. En nuestro estudio se observó que la cristalinidad del mineral remanente después del tratamiento es mayor, lo que corrobora los hallazgos encontrados en los estudios de Feride y col (19).

En cualquier caso para entender los resultados anteriores es necesario conocer los mecanismos de interacción química entre

el peróxido, la estructura de la apatita y las proteínas. Este agente se utiliza comúnmente en tratamientos de blanqueamiento y sus efectos no se limitan al esmalte ya que difunde a través no sólo del esmalte sino de otros tejidos (dentina y pulpa). La bibliografía recoge que el peróxido de hidrógeno, es capaz de cambiar la estructura del hidroxiapatito reemplazando los grupos PO_4^{3-} . Otro tipo de sustitución que se puede dar es la de ligandos coordinados formados a través de iones metálicos (hierro) o cuando el CO_3^{2-} es reemplazado por el OH^\bullet liberado del H_2O_2 . (111) (112). También se observa en los análisis de IR que aparece una banda OH^- , entre 3000 y 3700 cm^{-1} con una intensidad muy variable y poco definida. Esta unión puede volverse fuerte o débil y el proceso puede ser reversible por la aplicación de flúor (20). En cuanto a la parte orgánica del esmalte (las proteínas), los radicales que produce el peróxido y que contienen oxígeno permiten la oxidación de todos los aminoácidos, incluyendo la metionina, la cual junto con la cisteína y el triptófano, son más fácilmente oxidados (19).

Por otra parte, el tratamiento con peróxido produce una alteración de la superficie del esmalte como se ha observado mediante microscopía SEM. El tipo de alteraciones observadas en la superficie del esmalte bovino coinciden con las descritas en otros estudios entre los que podemos destacar los publicados por de Bistey y col (20), Park y col (113), Uschigome y col (109), Santini y col (114). Estos trabajos muestran que existen cambios muy aparentes y significativos micro y nanomorfológicos tanto en la superficie de los cristales y como en la zona intercrystalina, dando como resultado una desorganización microestructural, una apariencia rugosa y la generación de múltiples grietas. Esto se debe a que el peróxido afecta a los componentes orgánicos del esmalte. Por otro lado, los análisis por adsorción de gases muestran que los tratamientos con peróxido de hidrógeno producen una desaparición de las irregularidades existentes originalmente en la superficie de la muestra. Esto se debe probablemente a la disminución de la superficie específica probablemente dada por el aplanamiento de los vértices de los cristales y la pérdida de sustancia orgánica que recubre los cristales.

Otros investigadores, Cimilli y col 2001, que evaluaron los efectos del tratamiento del esmalte con peróxido de carbamida al 10%, 15% y 16% sobre las propiedades químicas del esmalte humano, por medio de IR, FTIR, XRD (difracción de rayos X), y observaron que el hidroxiapatito se convierte a monohidrógeno fosfato de calcio debido a la pérdida de calcio en el esmalte. Por tanto, este estudio indica que el tratamiento altera la composición química y cambia la estructura cristalina (115).

Otros estudios interesantes relacionados con nuestros ensayos son los de Bistey y col (20) que describieron las alteraciones del esmalte humano después del tratamiento con peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones (10, 20 y 30%), durante 120 minutos, a un pH de 7.2 usando IR. Los resultados muestran cambios en la superficie del esmalte después del tratamiento con peróxido de hidrógeno, el cual afecta de forma importante a la parte mineral del esmalte, aún a concentraciones bajas. Las alteraciones detectadas mediante espectroscopia de FTIR aumentan a medida que aumenta la concentración y el tiempo de tratamiento. En particular las bandas $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ y $\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$ son las que presentan las mayores alteraciones.

Por otra parte, Park y col en su estudio investigaron el efecto del peróxido de hidrógeno al 30% durante 120 horas en esmalte bovino. En particular, estudiaron el efecto sobre la superficie mediante (microscopía de fuerza atómica), composición (FT-Raman) y microdureza. Los resultados de microscopía de fuerza atómica muestran cambios en la nanoestructura, los bordes de los cristales son más agudos que en las muestras sin tratar, están más resaltados y ligeramente reducidos en número. En los espectros de FT-Raman no se observa una disminución significativa de la fase orgánica y/o inorgánica y pero sí una disminución de la fluorescencia en los espectros Raman (113).

Santini y col (114), estudiaron el efecto del tratamiento en esmalte humano con peróxido de carbamida al 10% entre 7 y 28 días. Observaron un cambio notable en la concentración de los grupos fosfato a partir del análisis mediante espectroscopia Raman. Ellos demuestran que hay pérdida de los grupos fosfatos de la superficie del esmalte. Jiang y col (11) exploraron los efectos

del peróxido de hidrógeno al 30% durante 15, 30 y 60 minutos, sobre el esmalte humano, por medio de espectroscopia Raman y fluorescencia, test de microdureza y SEM. Los resultados de este estudio muestran cambios morfológicos, disminución de la microdureza asociada a la destrucción de la materia orgánica, pérdida de contenido en fosfatos en la superficie debido a una marcada desmineralización a los 30 y 60 minutos. Asimismo, observan una reducción de la fluorescencia en estos tiempos. Sin embargo el estudio de Cadernaro y col (116) mediante SEM y profilometría de no contacto no encontraron cambios morfológicos en la superficie del esmalte.

Feride y col (19) estudiaron el efecto del peróxido de hidrógeno al 35% sobre la estructura orgánica e inorgánica de esmalte humano mediante FTIR. Para ello midieron y compararon la frecuencia de las bandas y los valores de la intensidad de la amida A, amida I, fosfato (PO_4^{3-}) y carbonato (CO_3^{2-}). Los resultados revelan que además de la desmineralización que se produce, hay una disminución en las concentraciones de proteínas y polisacáridos, proporción mineral-proteínas, la fuerza de las uniones de hidrógeno alrededor de los grupos NH, el cambio en la estructura secundaria de la proteínas y aumento significativo del tamaño de los cristales.

En resumen, se puede deducir que el tratamiento con peróxido de hidrógeno induce sobre el esmalte una pérdida de calcio principalmente en los primeros minutos de contacto debido a movilización selectiva de componentes específicos minerales del esmalte. En nuestra opinión, el peróxido oxida la materia orgánica que recubre los cristales de apatito, dejando más expuesta la superficie mineral al ataque ácido y facilitando la disolución de los componentes minerales más lábiles (ricos en carbonatos). En cuanto al análisis de superficie a través de la adsorción de N_2 y CO_2 se observó una disminución de la superficie específica de la muestra. Mediante SEM se observaron cambios microestructurales en la superficie del esmalte y en particular se observa un aumento de la desorganización, aparecen los prismas más resaltados y los cristales aparecen más espaciados.

4.4 ANÁLISIS MICROQUÍMICO DEL EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y DEL ÁCIDO FOSFÓRICO SOBRE EL ESMALTE BOVINO

Con el objeto de estudiar el efecto de este tratamiento consecutivo con peróxido y ácido fosfórico, se realizaron dos series de experimentos. En ambos se hizo previamente, un tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo (5, 20, 60, 90 y 120 min) y posteriormente una serie fue grabada con ácido fosfórico por un intervalo corto de tiempo (30 segundos) (tratamiento 1) típico de un tratamiento clínico, y la otra con un tiempo mas largo (5 minutos) (tratamiento 2). Este último se realizó para ver los efectos de un tratamiento más agresivo que pudiese poner de manifiesto alteraciones no detectables en el tratamiento clínico. Finalmente se estudió en las dos series cómo varían las propiedades del esmalte (composición química y superficie) con el tiempo de exposición. Para ello, se utilizaron diferentes técnicas analíticas y se obtuvieron los siguientes resultados:

4.4.1 Análisis por Absorción atómica

En las tablas 4.9 y 4.10 se recogen los resultados de pérdida de calcio (expresada en ppm, mg y porcentaje eliminado) del esmalte bovino después del tratamiento combinado con peróxido de hidrógeno y ácido fosfórico durante 30 segundos y 5 minutos respectivamente. Como podemos observar en dichas tablas, la pérdida de calcio es mayor para el tratamiento secuencial de, peróxido/fosfórico, que para los tratamientos individuales con peróxido o ácido fosfórico.

Tabla 4.9 Calcio liberado en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno y ácido fosfórico. Pérdida de calcio (ppm, mg y porcentaje) en el esmalte bovino en polvo después del tratamiento consecutivo con peróxido de hidrógeno al 30% durante 5, 20, 60, 90 y 120 minutos y ácido fosfórico durante 30 segundos.

Muestra	Tiempo de tratamiento (min)	ppm de calcio	Pérdida de calcio en mgs	% de calcio eliminado referido al peso inicial
C4-F2-5H2-30SH3	5	25,63	1,28	4,27
C4-F2-20H2-30SH3	20	29,13	1,46	4,86
C4-F2-60H2-30SH3	60	18,38	0,92	3,06
C4-F2-90H2-30SH3	90	31,26	1,56	5,21
C4-F2-120H2-30SH3	120	17,38	0,87	2,90

Tabla 4.10 Calcio liberado en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno y ácido fosfórico. Pérdida de calcio (ppm, mg y porcentaje) en el esmalte bovino en polvo, después del tratamiento consecutivo con peróxido de hidrógeno al 30% durante 5, 20, 60, 90 y 120 minutos y ácido fosfórico durante 5 minutos.

Muestra	Tiempo de tratamiento (min)	ppm de calcio	Pérdida de calcio en mgs	% de calcio eliminado referido al peso inicial
C3-F2-5H2-5H3	5	33,08	1,654	16,54
C3-F2-20H2-5H3	20	13,13	0,6565	6,565
C3-F2-60H2-5H3	60	10,58	0,529	5,29
C3-F2-90H2-5H3	90	28,81	1,4405	14,405
C3-F2-120H2-5H3	120	11,37	0,5685	5,685

En las figuras 4.25 y 4.26 se representan el calcio eliminado (ppm) en función del tiempo de tratamiento. No se observa una variación clara con el tiempo de exposición al peróxido, ni tampoco una diferencia significativa para los diferentes tiempos de grabado.

Figura 4.25 ppm de calcio liberado en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% y ácido fosfórico durante 30 segundos.

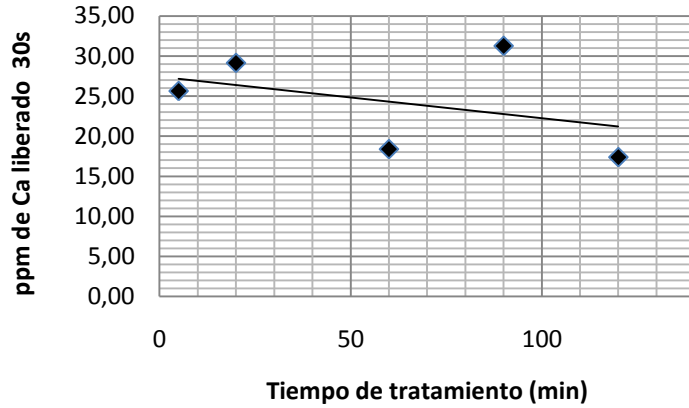
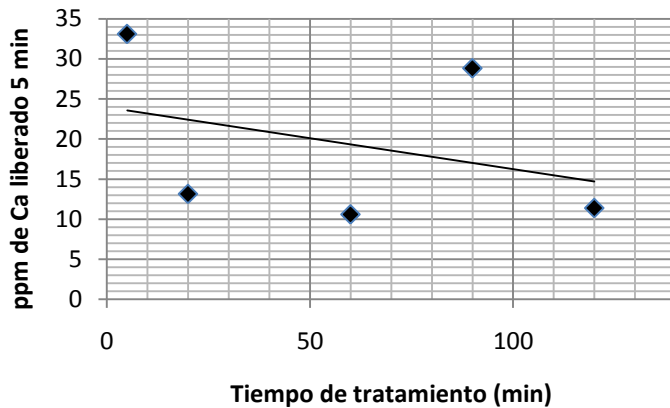


Figura 4.26 ppm de calcio liberado en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% y ácido fosfórico durante 5 minutos.



4.4.2 Análisis por IR

En la tabla 4.11 se presentan los principales resultados del análisis de la composición del esmalte mediante espectroscopia de IR. En esta tabla se muestra el análisis de correlación entre los parámetros composicionales determinados con el tiempo de exposición a la solución de peróxido. Como podemos observar el tratamiento previo con peróxido de hidrógeno al 30% a

diferentes intervalos de tiempo y posteriormente con ácido fosfórico durante 30 segundos, no produce cambios notables en los diferentes parámetros composicionales determinados. Tampoco se observa ninguna tendencia clara cuando representamos los diferentes parámetros en función del tiempo.

Tabla 4.11 Análisis de correlación de los diferentes parámetros composicionales determinados a partir del espectro de FTIR y tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% y ácido fosfórico. Esmalte tratado con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes tiempos de tratamiento en minutos y ácido fosfórico durante 30 segundos. Gradmin (grado de mineralización) min CO_3^{2-} (Carbonato), CI (índice de cristalinidad), R (coeficiente de correlación de Pearson, P (probabilidad), N (número de muestras).

	Log Tiempo		
	R	P	N
gradmin	0,608	0,200	6
min CO₃²⁻	-0,639	0,172	6
a1405	-0,453	0,367	6
a1460	0,709	0,115	6
a1550	-0,291	0,576	6
a1660	-0,360	0,483	6
a956	0,544	0,265	6
a985	-0,138	0,794	6
a1005	0,308	0,553	6
a1030	-0,346	0,501	6
a1058	-0,260	0,619	6
a1095	-0,212	0,687	6
a1138	0,517	0,294	6
IC	-0,421	0,405	6

De la misma forma para el tratamiento con peróxido y posteriormente con ácido fosfórico durante cinco minutos, en la tabla 4.12 se representaron los principales resultados del análisis de la composición del esmalte mediante IR y en particular se muestran los resultados del análisis de correlación entre estos parámetros y el tiempo de exposición. Como podemos observar en este tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% y ácido fosfórico durante 5 minutos sí se producen cambios notables en la composición del esmalte. En particular se observa que existe una correlación negativa significativa entre los parámetros

$MinCO_3$, $a1030$, $a1058$, $a1095$ y el tiempo de tratamiento. Por el contrario, se observa que existe una correlación positiva entre el parámetro $a956$ (fosfato pobremente cristalino) y el tiempo de exposición. Aunque el tiempo de grabado es demasiado alto, para tener relevancia clínica, permite observar efectos que no son detectables en los experimentos realizados a tiempos más cortos. Estos efectos aunque no sean detectables por las técnicas analíticas utilizadas si que pueden ser importantes.

Tabla 4.12 Análisis de correlación de los diferentes parámetros composicionales del esmalte determinados a partir del espectro de FTIR y tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% y ácido fosfórico. Esmalte tratado con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes tiempos de tratamiento en minutos y ácido fosfórico durante 5 minutos. Gradmin (grado de mineralización) $min CO_3^{2-}$ (Carbonato), CI (índice de cristalinidad) R (coeficiente de correlación de Pearson, P (probabilidad), N (número de muestras).

	Log		
	Tiempo		
	R	P	N
Gradmin	0,545	0,263	6
min CO_3^{2-}	-0,873	0,023*	6
a1405	-0,164	0,756	6
a1460	0,381	0,456	6
a1550	-0,273	0,601	6
a1660	-0,585	0,223	6
a956	0,864	0,026*	6
a985	0,051	0,924	6
a1005	0,296	0,569	6
a1030	-0,924	0,008**	6
a1058	-0,892	0,017*	6
a1095	-0,922	0,009**	6
a1138	0,508	0,304	6
CI	-0,417	0,411	6

Para estudiar en más detalle las relaciones observadas a partir de los análisis de correlación, se representaron los diferentes parámetros en función del tiempo de exposición a la solución de peróxido. En las figuras 4.27 y 4.28, se representa la variación del grado de mineralización en el tratamiento consecutivo 1 y 2. Se ve una cierta tendencia a aumentar el grado de mineralización a

tiempos mayores de exposición a la solución de peróxido, aunque no está muy definida y no permite extraer conclusiones.

Figura 4.27 Grado de mineralización (*gradmin*) en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 30 segundos.

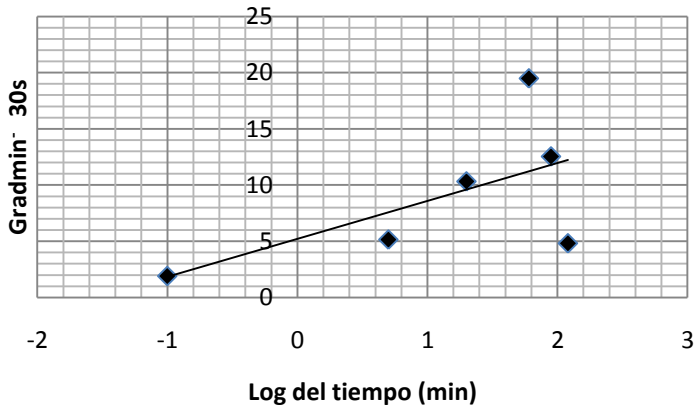
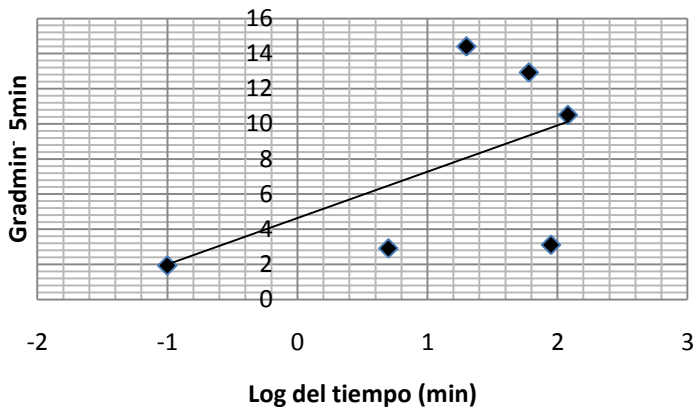


Figura 4.28 Grado de mineralización (*gradmin*) en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 5 minutos.



En el parámetro $MinCO_3^{2-}$ para el tratamiento 1 (figura 4.29) no se observa una relación clara, aunque parece que hay una cierta disminución del contenido de carbonato con el tiempo de exposición a la solución de peróxido. En el caso del tratamiento 2 (figura 4.30) esta relación si está muy bien definida y se observa una correlación negativa con el tiempo de exposición a la solución

de peróxido, lo que nos indica que el grabado con fosfórico hace que la muestra pierda selectivamente la parte mineral rica en carbonatos (más lábil) quedando empobrecida en este componente.

Figura 4.29 Contenido de carbonato en la parte mineral en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 30 segundos.

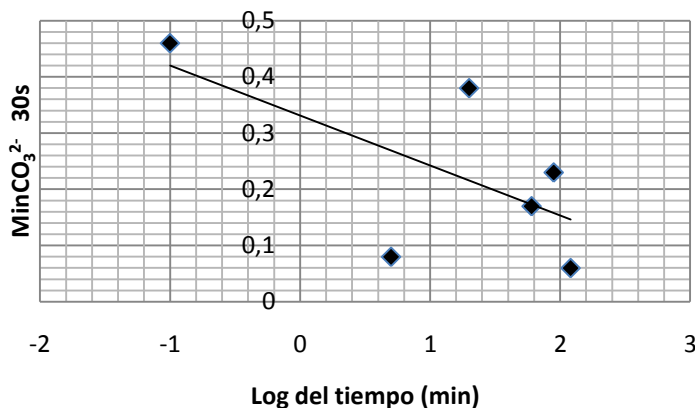
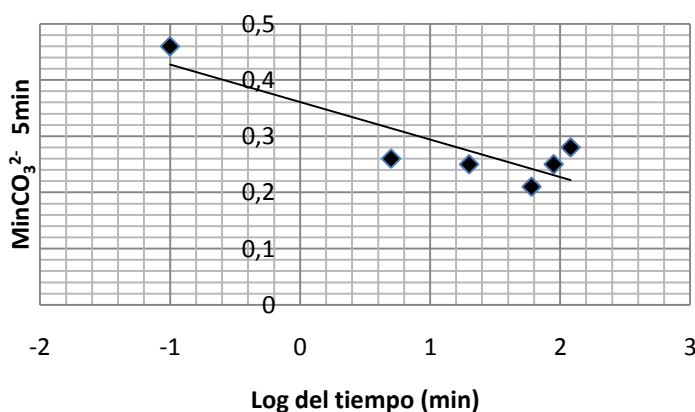


Figura 4.30 Contenido de carbonato en la parte mineral en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 5 minutos.



En cuanto a los componentes orgánicos, el análisis mediante espectroscopia de IR de las muestras sometidas a los tratamientos 1 y 2 indica que no producen ninguna alteración notable. En la figura 4.31 y 4.32 se representa el área relativa del

pico $a1550\text{ cm}^{-1}$ asociado al componente orgánico amida II en función del logaritmo del tiempo. En dichas figuras no se observa una tendencia clara.

Figura 4.31 Área relativa del pico $a1550\text{ cm}^{-1}$ asociado al componente orgánico amida II en función del logaritmo del tiempo. Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 30 segundos.

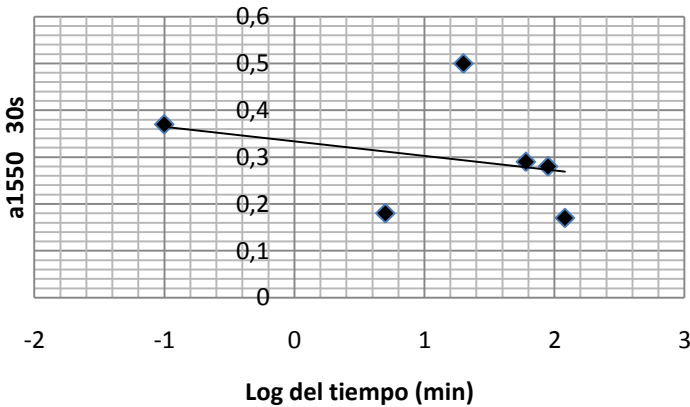
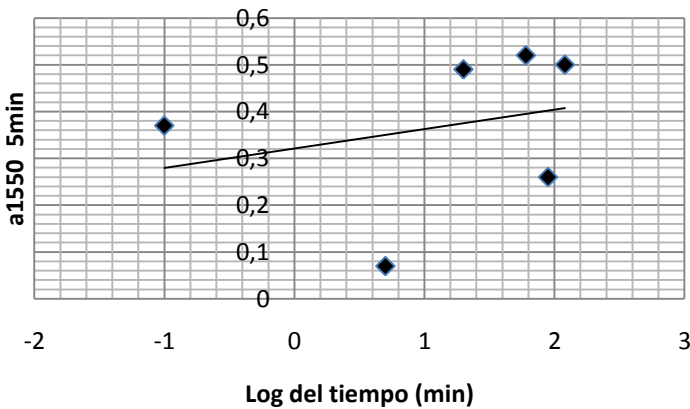


Figura 4.32 Área relativa del pico $a1550\text{ cm}^{-1}$ asociado al componente orgánico amida II en función del logaritmo del tiempo. Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 5 minutos.



En el componente inorgánico, con el tratamiento 1 no se observa una tendencia clara en función del tiempo, por el contrario con el tratamiento 2 se observó una correlación positiva en los picos $a956$ (fosfato pobremente cristalino) y una correlación negativa entre los picos $a1030$, $a1058$, (apatito altamente cristalino) $a1095$ (apatito cristalino), lo que indica que ese tipo de fosfatos se

pierde significativamente con el tiempo, tanto el altamente cristalino como el cristalino. En las figuras 4.33 y 4.34 se representa el pico $a1030$ observándose claramente la tendencia.

Figura 4.33 Área relativa del pico $a1030$ asociado al fosfato altamente cristalino en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 30 segundos.

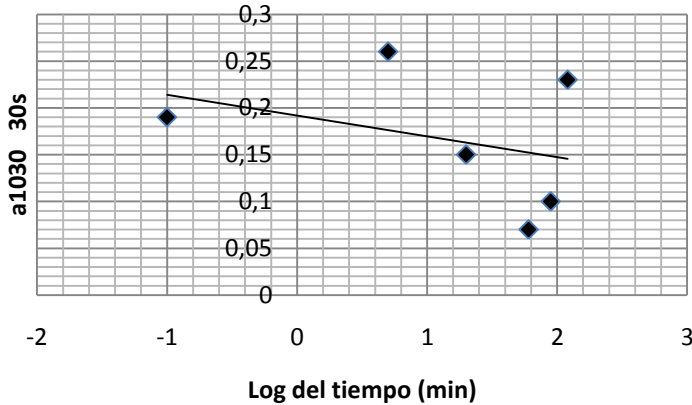
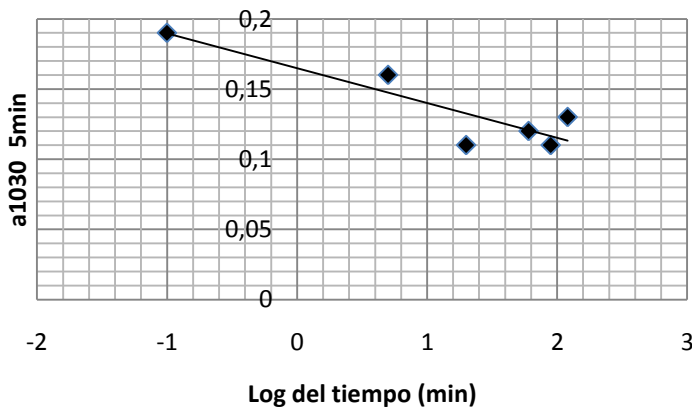


Figura 4.34 Área relativa del pico $a1030$ asociado al fosfato altamente cristalino en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 5 minutos.



En cuanto al índice de cristalinidad IC, los datos de análisis de correlación no muestran que haya ninguna relación significativa entre este parámetro y el tiempo de exposición a la solución de peróxido en ninguno de los dos ensayos. Tampoco se observa que

exista ninguna relación definida cuando representamos los datos frente al tiempo de exposición, aunque los datos de los otros parámetros indican que existe una pérdida selectiva de los fosfatos más cristalinos, lo que debería de llevar asociado una disminución del índice de cristalinidad. Sólo se observa una disminución de este índice en un solo punto a largo tiempo. Figura 4.35 y 4.36.

Figura 4.35 Área relativa del pico asociado con el índice de cristalinidad (IC) en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 30 segundos.

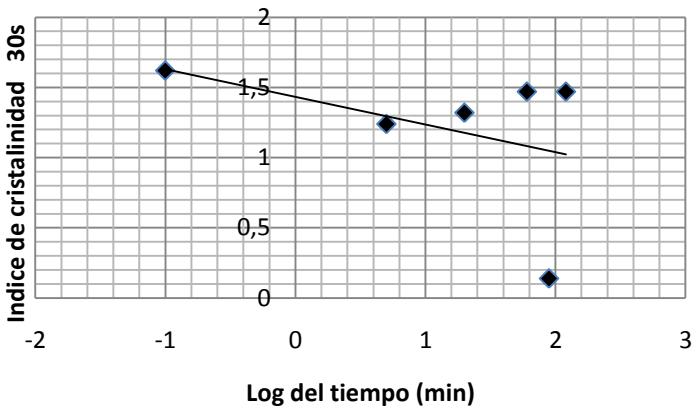
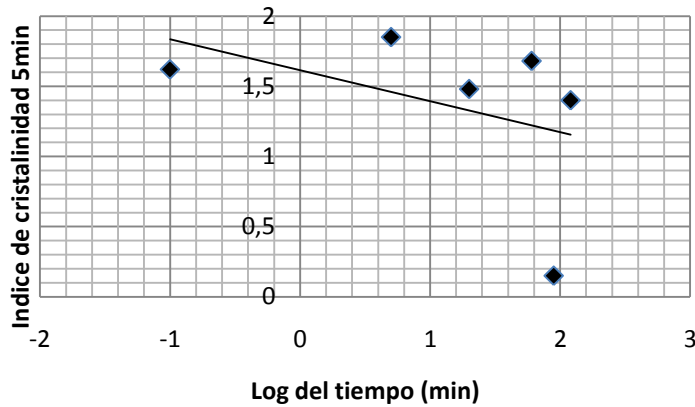


Figura 4.36 Área relativa del pico asociado con el índice de cristalinidad (IC) en función del tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 5 minutos.

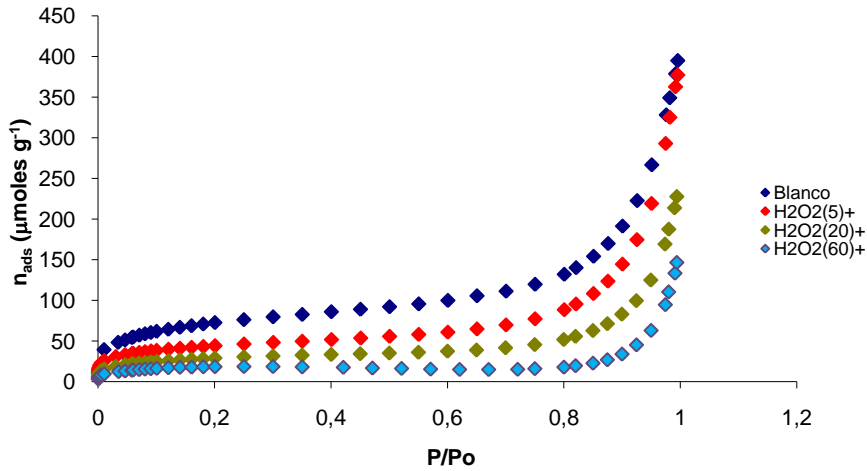


4.4.3 Análisis por adsorción de N_2 y CO_2

Las isotermas de adsorción de N_2 de todas las muestras estudiadas en el tratamiento consecutivo con peróxido y ácido fosfórico también son del tipo II de la clasificación de BDDT.

En la figura 4.37 se representa las isotermas de adsorción de N_2 para las muestras tratadas con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo (5, 20 y 60 min). Las muestras tratadas a 90 y 120 minutos no se han representado ya que las isotermas son equivalentes a cero ó por debajo de cero.

Figura 4.37 Isotermas de adsorción de N_2 de la muestra de la muestra blanco y las tratadas con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 30 segundos.



De la misma forma, se ha obtenido el valor de la monocapa a partir del denominado punto B con el objeto de validar los resultados de BET. Los resultados se recogen en el Tabla 4.13.

Tabla 4.13 Análisis de las isotermas de adsorción mediante el método BET y punto B de la muestra control y las tratadas con peróxido de hidrógeno al 30% durante 5, 20 y 60 minutos y ácido fosfórico al 37% durante 30 segundos.

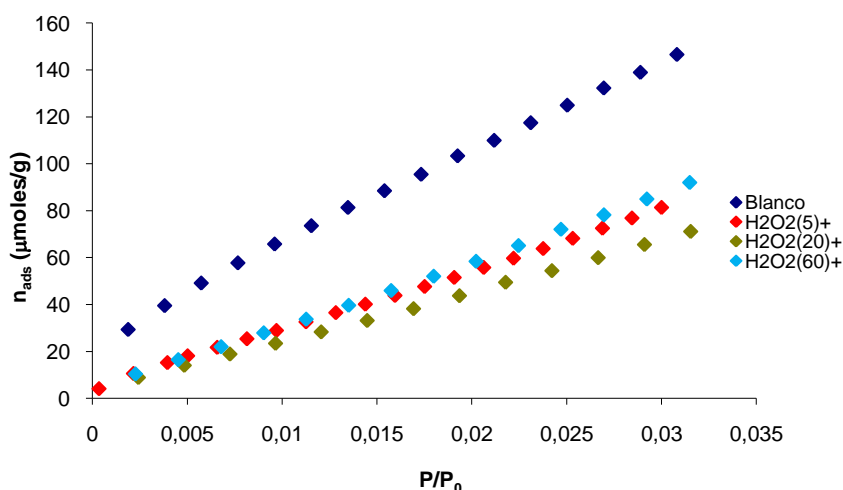
Muestra		BET		Punto B	
		n_m (μ moles/g)	S (m^2/g)	n_B (μ moles/g)	n_m/n_B
Blanco	1	58,08	5,7	64,32	0,90
H_2O_2 (5min)+ H_3PO_4 (30s)	9	34,82	3,4	35,89	0,97
H_2O_2 (20min)+ H_3PO_4 (30s)	10	22,76	2,2	23,51	0,97
H_2O_2 (60min)+ H_3PO_4 (30s)	11	14,12	1,4	16,00	0,88

Se puede concluir a partir de estos resultados que, los tratamientos con H_2O_2 y H_3PO_4 producen una disminución de la superficie específica de la muestra, efecto que aumenta con el tiempo de tratamiento de peróxido. Cuando las muestras se tratan en primer lugar con H_2O_2 , el efecto del H_3PO_4 (muestra 9,

10 y 11) es menor que cuando se trata sólo con fosfórico. Figura 4.37.

El tratamiento con peróxido de hidrógeno y posteriormente con ácido fosfórico produce en todos los tiempos estudiados una disminución de la adsorción de CO₂ con respecto al blanco, cómo se puede observar en la figura 4.38.

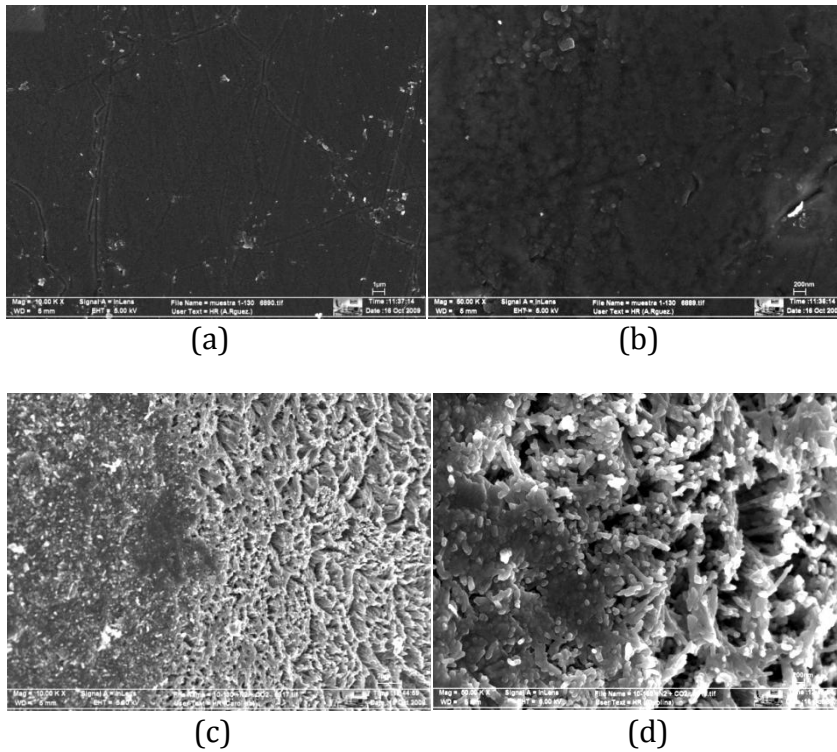
Figura 4.38 Isotermas de adsorción de CO₂ de la muestra blanco y las tratadas con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes intervalos de tiempo y ácido fosfórico durante 30 segundos.



4.4.4 Análisis por SEM

El análisis de la superficie de las muestras mediante SEM (a 10.000 X) muestra que el esmalte presenta un aspecto moteado con apariencia de panel de abeja, corroído y con pérdida de la capa más superficial (figura 4.39 c). A Mayores aumentos (50.000 X) se observan los cristales individuales resaltados que forman parte de la configuración prismática desorganizada. También aparecen agujeros que indican una pérdida importante tanto de materia mineral como orgánica (figura 4.39 d).

Figura 4.39 Microfotografías por SEM de esmalte bovino a 10.000X y 50.000X. Esmalte sin tratamiento (a) y (b) y de muestras tratadas con peróxido de hidrógeno al 30% durante 20 minutos y ácido fosfórico al 37% durante 30 segundos (c) y (d).



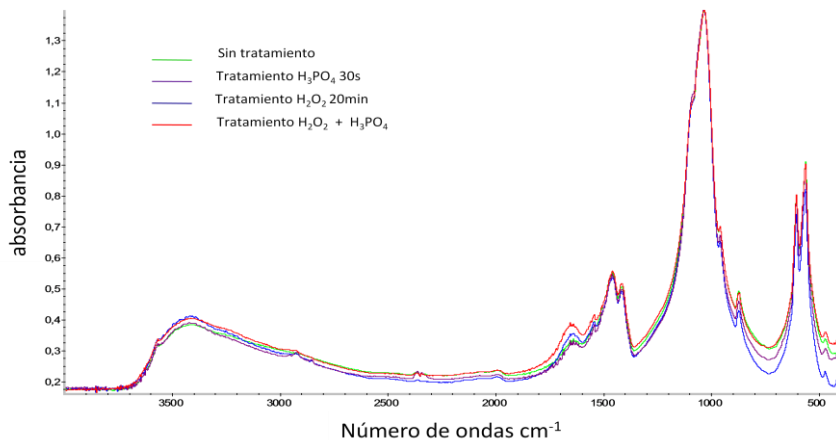
En resumen, podemos concluir que el tratamiento del esmalte con de peróxido de hidrógeno (20 minutos) seguido de ácido fosfórico (30s) produce una mayor pérdida de calcio (29,13 ppm) que los tratamientos individuales con ácido fosfórico durante 30 s (17,4 ppm) o peróxido de hidrógeno durante 20 min (7,43 ppm). Probablemente sea debido a la potencialización de los efectos de ambos compuestos. Esto se ha podido constatar mediante técnicas cuantitativas (AA), lo que nos permite comparar los diferentes tratamientos. Lo que no se pudo establecer claramente es el efecto del tiempo de tratamiento en el caso del tratamiento consecutivo, pues no se observó una tendencia clara de que a medida que aumenta el tiempo de tratamiento con peróxido se descalcifique más.

Según Hanning y col (105) una posible razón de los efectos erosivos producidos por un ácido son sus interacciones con el

hidroxiapatito. Ácidos mono, di y tricarbónicos se absorben químicamente a el hidroxiapatito por interacciones iónicas. Sin embargo, la capacidad de descalcificación y de absorción química depende de la solubilidad de la sal carboxílica en la solución ácida. Este proceso de absorción química no depende del pH o la concentración del ácido. Los grupos carboxílicos sustituyen los grupos hidroxilo o fosfatos del hidroxiapatito del esmalte.

En la figura 4.40 se representan los espectros IR del control y de las muestras tratadas individualmente con ácido fosfórico y peróxido de hidrógeno y el tratamiento secuencial.

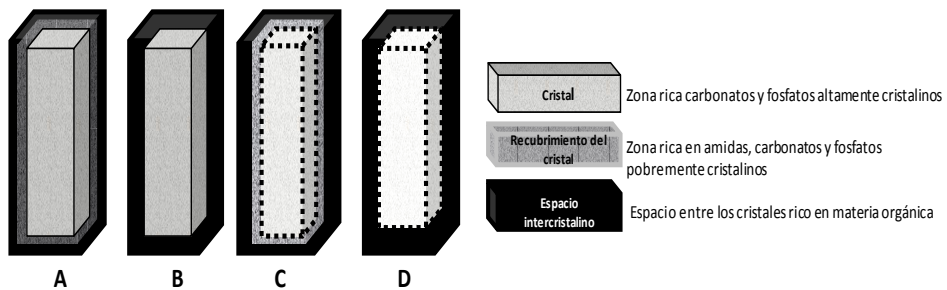
Figura 4.40 Espectroscopia IR de la muestra control y las tratadas con ácido fosfórico, peróxido de hidrógeno al 30% y el tratamiento combinado.



El análisis de correlación de los parámetros composicionales indica que en el caso del tratamiento previo con peróxido y luego con fosfórico provoca una pérdida selectiva de los componentes del mineral con mayor cristalinidad, quedando enriquecida en fosfatos de baja cristalinidad (con valores más altos de a_{956}). Es interesante resaltar que, este comportamiento es opuesto al producido por el tratamiento sólo con ácido fosfórico a diferentes tiempos (ver ensayo 4.2), lo que indica que el tratamiento secuencial produce un ataque selectivo de la parte interior de los cristales (parte más cristalina del mineral), debido probablemente a una pérdida o degradación parcial de la recubierta orgánica que sirve para su protección. Por lo tanto,

este tratamiento con peróxido y posteriormente con ácido fosfórico produce una alteración mayor que los tratamientos individuales, como se puede ver en la tabla comparativa de los diferentes tratamientos Tabla 4.14. En la figura 4.41 se esquematiza el proceso de alteración del esmalte con los diferentes tratamientos. En el modelo se tiene en cuenta la composición de los cristales, en los que se distribuyen de forma heterogénea la materia orgánica (Amidas) e inorgánica (carbonatos, fosfatos).

Figura 4.41 Esquema del modelo propuesto para explicar el proceso de alteración del esmalte debido a los diferentes tratamientos aplicados durante los ensayos con ácido fosfórico, peróxido de hidrógeno y tratamiento con peróxido y fosfórico.



A: cristal sin tratamiento. B: cristal tratado con ácido fosfórico. Se pierde la parte superficial que recubre el cristal y un aumento del espacio intercristalino C: cristal tratado con peróxido de hidrógeno. Se observa una pérdida parcial del recubrimiento del cristal y ataque del cristal D. Cristal tratado con peróxido de hidrógeno y ácido fosfórico, se observa una pérdida del recubrimiento del cristal, ataque del cristal y disminución de su tamaño.

Tabla 4.14 Tabla comparativa de la variación de la composición del esmalte sometido a diferentes tratamientos: 1) con ácido fosfórico; 2) peróxido de hidrógeno; 3) secuencial con peróxido y ácido fosfórico. En la tabla se muestran los análisis de correlación de los diferentes parámetros composicionales del esmalte determinados a partir del espectro de FTIR y tiempo de tratamiento.

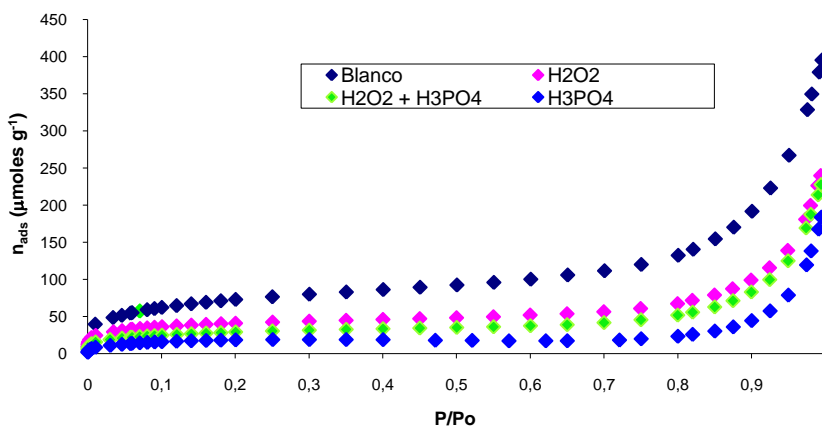
Región cm-1	Grupos funcionales	Fosfórico		Peróxido		Peróxido + fosfórico 30s		Peróxido + fosfórico 5 min	
		R	P	R	P	R	P	R	P
gradmin		0,226	0,480	0,715	0,11	0,608	0,2	0,545	0,263
Min CO 2- 3		-0,887	0,000**	-0,813	0,049*	-0,639	0,172	-0,873	0,023*
a1405	CO32- tipo B	-0,818	0,001**	-0,133	0,802	-0,453	0,367	-0,164	0,756
a1460	Amida III	-0,661	0,019*	0,388	0,447	0,709	0,115	0,381	0,456
a1550	Amida II	-0,092	0,775	0,292	0,574	-0,291	0,576	-0,273	0,601
a1660	Amida I	0,665	0,018*	-0,663	0,177	-0,36	0,483	-0,585	0,223
a956	HPO 2- (fosfatos poco cristalinos) 4	-0,472	0,122	0,72	0,107	0,544	0,265	0,864	0,026*
a985	HPO42-	---	---	-0,426	0,399	-0,138	0,794	0,051	0,924
a1005	Apatito poco cristalino	-0,489	0,106	0,282	0,589	0,308	0,553	0,296	0,569
a1030	Apatito altamente cristalino	0,81	0,001**	-0,619	0,191	-0,346	0,501	-0,924	0,008**
a1058	Apatito altamente cristalino	0,336	0,285	-0,583	0,224	-0,26	0,619	-0,892	0,017*
a1095	Apatito cristalino	-0,544	0,067	-0,681	0,137	-0,212	0,687	-0,922	0,009**
a1138	Apatito poco cristalino	-0,028	0,932	0,72	0,107	0,517	0,294	0,508	0,304
IC	Índice de cristalinidad	--	--	-0,306	0,555	-0,421	0,405	-0,417	0,411

En los análisis de superficie por adsorción de gases (tabla 4.15 y figura 4.42) se puede observar el efecto individual del peróxido de hidrógeno y del ácido fosfórico, así como del tratamiento consecutivo. Se comprueba a través de este método el grado de afectación que producen. Siendo el tratamiento individual con ácido fosfórico al 37% el que más disminuye la superficie específica de la muestra probablemente debido al aumento de tamaño de las cavidades y del tamaño del poro por aumento del espacio intercrystalino e interprismático, mientras que el de menor efecto es el producido por el peróxido de hidrógeno.

Tabla 4.15 Análisis comparativo de las isotermas de adsorción mediante el método BET y punto B para los tratamientos individuales y el tratamiento secuencial.

Muestra		BET		Punto B	
		n_m ($\mu\text{moles/g}$)	S (m^2/g)	n_B ($\mu\text{moles/g}$)	n_m/n_B
Blanco (1)	1	58,08	5,7	64,32	0,90
H ₂ O ₂ (20min)	8	31,74	3,1	33,54	0,94
H ₃ PO ₄ (30s)	2	14,08	1,4	15,79	0,89
H ₂ O ₂ (20min)+H ₃ PO ₄ (30s)	10	22,76	2,2	23,51	0,97

Figura 4.42 Isotermas de adsorción de N₂ de la muestra blanco y las tratadas con peróxido de hidrógeno al 30%, ácido fosfórico y ambos secuencialmente.



Estos hallazgos corroboraron las observaciones por SEM, que también evidenciaron que el tratamiento combinado produce mayor desorganización de la estructura y de espacios intercristalinos.

Los resultados anteriormente explicados y discutidos son novedosos en el ámbito científico, ya que no existe ninguna publicación hasta el momento que mencione y concluya tan claramente los efectos de aplicar ambos compuestos separada y secuencialmente.

5. CONCLUSIONES

TRATAMIENTO CON PEROXIDO DE HIDRÓGENO SEGUIDO DE GRABADO ACIDO

La cantidad de calcio extraído de muestras sólidas de esmalte aumenta a medida que aumenta la concentración y el tiempo de aplicación de la solución de peróxido de hidrógeno. Asimismo, la pérdida de calcio aumenta con el tiempo de grabado ácido con ácido fosfórico.

TRATAMIENTO CON ÁCIDO FOSFÓRICO

La capacidad de extracción de calcio del esmalte, tratado con ácido fosfórico, aumenta con el tiempo de tratamiento, siendo mayor a los 5 minutos.

Durante el tratamiento con ácido fosfórico al 37% y diferentes tiempos, el grado de mineralización no varía significativamente con el tiempo de exposición al ácido. Sin embargo, se observan otros cambios composicionales que indican que hay una pérdida selectiva de determinados componentes de la parte mineral y orgánica del esmalte. En particular, se observa que la parte mineral rica en fosfatos de baja cristalinidad/amorfo se pierde preferencialmente y selectivamente, así como la parte mineral rica en carbonatos. Estos componentes son más lábiles y solubles al estar en la parte superficial de los cristales de apatito del esmalte y son las principales fuentes del calcio movilizado. Los componentes orgánicos que contribuyen a la banda de 1460 cm^{-1} se pierden preferencialmente, quedando enriquecidos en amida I. Este resultado es muy interesante y puede indicar que se moviliza selectivamente los componentes orgánicos ricos en amelogeninas.

El tratamiento con ácido fosfórico produce una disminución de la superficie específica del esmalte, una mayor desorganización estructural y pérdida de sustancia interprismática.

TRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Durante el tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%, la cantidad de calcio extraído del esmalte aumenta con el tiempo de tratamiento siendo mayor a los 5 minutos.

Durante el tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%, el grado de mineralización, la cantidad relativa de fosfatos y el índice de cristalinidad no varían significativamente. Sin embargo se observa que hay un ataque selectivo y una pérdida de la parte mineral rica en carbonatos. Los componentes orgánicos que contribuyen a la banda *a1660* (amida I) disminuyen, aunque estos resultados no son estadísticamente significativos y no permiten extraer conclusiones definitivas.

El tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% produce una disminución de la superficie específica del esmalte sólido y una desorganización estructural y pérdida de sustancia interprismática.

TRATAMIENTO CON PEROXIDO DE HIDRÓGENO SEGUIDO DE ÁCIDO FOSFÓRICO

El tratamiento de peróxido de hidrógeno al 30% y posteriormente con ácido fosfórico al 37% produce una mayor pérdida de calcio que cualquiera de los tratamientos individuales anteriormente mencionados por separado.

En los tratamientos en los que se expuso el esmalte a peróxido de hidrógeno al 30% durante diferentes tiempos (5, 20, 60, 90 y 120 min) y a continuación ácido fosfórico durante 30 segundos y 5 minutos, no se observa una variación significativa en la cantidad

de la cantidad de calcio eliminado en función del tiempo de tratamiento.

El tratamiento del esmalte en polvo, con peróxido de hidrógeno al 30% y ácido fosfórico durante 30 segundos, no produce cambios notables de la composición del esmalte. Ninguno de los parámetros composicionales determinados mediante espectroscopia de infrarrojos muestra una relación definida con el tiempo de tratamiento con peróxido, sin embargo en el tratamiento en el que se utilizó un tiempo de exposición a ácido fosfórico durante 5 minutos, sí se observaron cambios en la composición del esmalte. En particular, se observa una pérdida gradual del mineral rico en carbonatos, en fosfatos altamente cristalinos a medida que aumenta el tiempo de exposición a la solución de peróxido. Como resultado de la pérdida selectiva de los anteriores componentes, el mineral remanente queda enriquecido en fosfatos de baja cristalinidad.

Los tratamientos en los que se trata esmalte en polvo, con peróxido de hidrógeno al 30% y ácido fosfórico producen una reducción mayor de la superficie específica del sólido que cualquiera de los tratamientos individuales por separado y una mayor desorganización estructural y pérdida de sustancia interprismática.

CONCLUSIONS

TREATMENT WITH HYDROGEN PEROXIDE FOLLOWED BY ETCHING WITH PHOSPHORIC ACID

The amount of calcium extracted from solid enamel samples increases with the concentration and the time of application of the hydrogen peroxide solution as well as with the time of etching with phosphoric acid.

TREATMENT WITH PHOSPHORIC ACID

The capacity of calcium extraction from enamel treated with phosphoric acid increases with the time of treatment, being greater at shorter times (5 minutes).

During treatment with phosphoric acid for different length of time, the degree mineralization does not vary significantly with the duration of exposition to the acid. Nevertheless, other compositional parameters determined did change with the treatment. These changes indicate that there is a selective loss of certain components of the mineral and the organic part of the enamel. In particular, it is observed that the mineral components rich in amorphous phosphates or with low cristallinity were preferential and selectively lost, along with the mineral part rich in carbonates. These mineral components are labile and soluble as they are located at the surface of apatite crystals constituting the enamel and are the main source of mobilized calcium. The organic components rich in amelogeninas are selectively removed from the enamel.

The treatment with phosphoric acid produces a reduction of the specific surface of the enamel as well as a greater structural disorganization and a loss of interprismatic substance.

TREATMENT WITH HYDROGEN PEROXIDE

During the treatment with hydrogen peroxide at 30%, the amount of calcium extracted of the enamel increases with time of treatment being greater at shorter times (5 minutes).

During the treatment with hydrogen peroxide at 30%, the mineralization degree, the relative amount of phosphates and the index of cristalinidad did not vary significantly with time of treatment. Nevertheless it is observed that there is a selective removal of the mineral component rich in carbonates. The organic components that contribute to the band ν_{1660} (amide I) diminish, although these results are not statistically significant and they do not allow to draw definitive conclusions.

The treatment with hydrogen peroxide at 30% produces a reduction of the specific surface of the solid enamel as well as a structural disorganization and loss of interprismatic substance.

TREATMENT WITH HYDROGEN PEROXIDE FOLLOWED BY PHOSPHORIC ACID

The treatment with hydrogen peroxide at 30% followed by etching with phosphoric acid produces a greater loss of calcium than any other of the individual treatments previously mentioned.

In these treatments, the enamel is first exposed to hydrogen peroxide at 30% during different length of times (5, 20, 60, 90 and 120 min) and afterward to acid phosphoric during either 30 seconds or 5 minutes. This treatment did not produce, a significant variation in the amount of calcium removed as a function of the time of treatment.

The treatment of the powder enamel, with hydrogen peroxide at 30% and phosphoric acid during 30 seconds, does not produce remarkable changes of the composition of the enamel. None of the compositional parameters determined by means of infrared

spectroscopy shows a defined relation with the time of treatment with peroxide. Nevertheless in the treatment in which the time of exposition to phosphoric acid is 5 minutes, there are significant changes in the chemical composition of the enamel. In particular, there is a gradual loss of mineral components rich in carbonate and highly crystalline phosphates, as the time of treatment with peroxide solution increases. As resulting from the selective loss of the previous components, the mineral is enriched in low crystalline phosphates.

APLICACIONES CLÍNICAS

Efecto del peróxido sobre la superficie afecta la estructura orgánica que juega un papel primordial en las propiedades físicas y mecánicas.
(1)

De acuerdo con resultados de este estudio, hemos encontrado que el tratamiento solo con ácido fosfórico ó peróxido ó el tratamiento secuencial de peróxido seguido por el ácido fosfórico induce pérdida de calcio y la alteración de la fase orgánica del esmalte bovino, lo que puede incrementar la susceptibilidad a la erosión y/o a la caries, la rugosidad superficial y reducir la resistencia a la microfractura y/o a la resistencia a la abrasión.

Debido a esto deben replantearse los protocolos clínicos y los tiempos de tratamiento de los agentes desmineralizantes. Podría pensarse en el uso de ácido fosfórico en un tiempo menor de 30 segundos ó el uso de otros ácidos alternativos, ó en su caso el uso de remineralizantes.

Con respecto al peróxido se propone el uso de agentes a más baja concentración, uso de agentes antioxidantes en el mismo tiempo de aplicación del peróxido, uso de coadyudantes cómo flúor en diferentes presentaciones y espaciar más los tiempos de aplicación para permitir que la saliva actúe e induzca la remineralización, por lo menos 3 días entre cita y cita.

Para el uso de peróxido seguido de ácido fosfórico, se debe tratar de seguir las recomendaciones anteriores y dejar tiempo entre el uso del peróxido y el ácido fosfórico mínimo 7 días con el fin de permitir los procesos de remineralización.

PROYECTOS FUTUROS

Los tratamientos clínicos de blanqueamiento dental y otros tratamientos con fines estéticos usan diferentes agentes químicos que inducen efectos no deseables en el esmalte y/o en la dentina. Estos tratamientos usan comúnmente peróxido de hidrógeno y ácido fosfórico que se aplican a diferentes tiempos y que producen entre otros efectos una alteración de la superficie y una descalcificación del esmalte. En esta tesis se ha descrito una serie de protocolos para evaluar los efectos que tienen estos agentes químicos en el esmalte. Para ello se han puesto a punto diferentes técnicas analíticas que permiten evaluar los cambios en la composición y microestructura del esmalte debido a la actuación de estos agentes.

Un siguiente paso sería estudiar la reversibilidad de las alteraciones que producen en la superficie externa e interna en el esmalte. Enfocamos nuestros próximos proyectos en varios tópicos:

Desarrollar estos mismos ensayos en dientes humanos bajo los mismos parámetros y compararlos con los resultados obtenidos en dientes bovinos.

Estudiar el efecto sobre el esmalte de los desmineralizantes (ácido fosfórico) y oxidantes (peróxido de hidrógeno) que actualmente se usan en la clínica con activación química, por calor y por láser, combinados con agentes antioxidantes (catalasa, ácido ascórbico, ascorbato de sodio, etc.) y remineralizantes (saliva humana/artificial y compuestos fluorados).

Estudiar in- vitro e in-vivo el uso de otros agentes desmineralizantes (ácido cítrico, ácido poliacrílico, ácido maleíco, ácido láctico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido acético, etc. y otras moléculas blanqueadoras (hipoclorito de sodio, perborato de sodio etc.), mediante diferentes técnicas ATR, FTIR, XRD, SEM, AFM etc.

Conocer mejor la capacidad regenerativa del esmalte afectado por tratamientos clínicos que producen una descalcificación y/o abrasión

de este tejido, intentando determinar qué componentes moleculares juegan importante en el proceso regenerativo.

Estudiar el efecto remineralizador de diferentes agentes comerciales que incluyen amelogeninas sobre muestras de esmalte sometidas a los tratamientos descritos en esta tesis.

Estudiar el control que ejercen diferentes proteínas sobre la formación y remineralización del esmalte. Para ello habría que combinar técnicas bioquímicas de caracterización y separación de proteínas y determinar su funcionalidad en ensayos de cristalización de fosfato cálcico. Este tipo de estudios es muy complejo pero permitiría conocer los procesos de biomineralización y diseñar agentes remineralizantes adecuados.

Investigar in-vitro la síntesis de moléculas biomiméticas y multifuncionales para tratamientos de remineralización bajo condiciones fisiológicas.

BIBLIOGRAFIA

1. Nanci A. 2003. TenCate's Oral Histology. Development, Structure and Function. 6ta. s.l. : Mosby.
2. Bachmann L, Craievich A F, Zezell D M. Crystalline structure of dental enamel after Ho:YLF laser irradiation. 2004, Arch Oral Biol;49:923-929.
3. . Fu-Zhai C, Jun G. New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale, J Tissue Eng Regen Med. 2007;1:185-191.
4. Wang X, Mihailova B, Klocke A, Fittschen UE, Heidrich S, Hill M, Stosch R, Güttler B, Broekaert JA, Bismayer U. Side effects of a non-peroxide-based home bleaching agent on dental enamel., J Biomed Mater Res A 2009;88(1):195-204.
5. Jodaikin A, Weiner S, Perl-Treves D, Traub W, Termine JD. Developing enamel matrix proteins: a conformation study of enamelines and amelogenins. Int J Biol Macromol 1987;9:166-168.
6. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of developing dental enamel matrix. J Struct Biol 1999;126: 270-299.
7. Fukumoto S, Yamada Y. Review: Extracellular matrix regulates tooth morphogenesis. Connect Tissue Res 2005;40:220-226.
8. Lowenstam H, Weiner S. On Biomineralization. Oxford New York : Oxford University Press, 1989.

9. Sun Z, Fan D, Fan Y, Du C, Moradian-Oldak J. Enamel proteasas reduce amelogenin-apatite binding. *J Dent Res* 2008;87(12):1133-1137.
10. Fan Y, Sn Z, Moradian-Oldak. Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials* 2009;30:478-483.
11. Jiang T, Yining Wang XM , Xinyu Shen H, Hu Y, Jiming H. Investigation of the effects of 30 % hydrogen peroxide on human tooth enamel by Raman scattering and laser-induced fluorescence. *J Biomed Opt* 2008;13(1):014019.
12. Brik A, Haskel E, Brik V, Scherbina O, Atanamenko O. Anisotropy effects of EPR signals and mechanisms of mass transfers in tooth enamel and bones . *Appl Radiat Isot* 2000;52:1077-83.
13. Fattibene P, Carosi A, De Coste V, Sacchetti A, Nucara A, Postorino P, Dore P. A comparative EPR, infrared and raman study of natural and deproteinated tooth enamel and dentin. *Phys Med Biol* 2005;50:1095-1108.
14. Lowenstam HA, Weiner S. Transformation of amorphous calcium phosphate to crystalline dahillite in the radicular teeth of chitons. *Science* 1985;227(4682):51-53.
15. Boskey Adele L. Biomineralization: An overview.. 2003, *Connective Tissue Research*, Vol. 44 (suppl:1), págs. 5-9.
16. Alvarez Lloret, Pedro. Alteración de la mineralización del hueso debida a la exposición a contaminantes organoclorados y metales pesados. Tesis Doctoral. Granada : s.n., 2008.

17. Freedman G. In-Office whitening systems. *Dent Today* 2005;24(12):110-5.
18. Markovic L, Jordan RA, Lakota N, Gaengler P. Micromorphology of enamel surface after vital tooth bleaching. *J Endod* 2007;33:607-610.
19. Feride S, Kurtulus G, Ayca D, Sukran B, Saadet G. Effects of in-office and at-home bleaching on human enamel and dentin: An in vitro application of fourier transform infrared study. *Appl Spectrosc* 2008;62(11):1274-1279.
20. 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.
21. Cavalli V, Giannini M, Carvalho R. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on tensile strength of human enamel. *Dent Mater* 2004;20:733-739.
22. Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GM, Heymann HO, Pimenta LA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. *Dent Mater* 2005;21(11):1059-1067.
23. Arends DE, Rich JJ, Healey HJ. A practical method of bleaching tetracycline-stained teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972;. 34: 812.
24. Carvalli V, Arrais CAG, Giannini & GMB, Ambrosano M. High-concentrated carbamide peroxide bleaching agents effects on enamel surface. *J Oral Rehabil* 2004;31:155-159.

25. Basting RT, Rodrigues AL, Serra MC. The effect of 10% carbamide peroxide, carbopol and/or glycerin on enamel and dentin microhardness. *Oper Dent* 2005;30(5):608-616.
26. Giniger M, MacDonald J, Spaid M, Felix H. A 180-day clinical investigation of the tooth whitening efficacy of a bleaching gel with added amorphous calcium phosphate. *J Clin Dent* 2005;16(1):11-16.
27. Attin T, Betke H, Schippan F, Wiegand A. Potential of fluoridated carbamide peroxide gels to support post-bleaching enamel re-hardening. *J Dent* 2007;Vol. 35:755-759.
28. Adebayo OA, Burrow MF, Tyas MJ. Effects of conditioners on microshear bond strength to enamel after carbamide peroxide bleaching and/or casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) treatment. *J Dent* 2007;35:862-870.
29. Sanae M, Rezende A, Freire L , Bovi G. Shear bond strength evaluation of composite resins on enamel and dentine after nonvital bleaching. *J Esthet Restor Dent* 2005;Vol. 17:22-29.
31. Attin T, Hanning C, Wiegand A, Attin R. Effect of bleaching on restorative materials and restorations. A systematic review. *Dent Mater* 2004;20:852-861.
32. Tezel H, Sogut Ertan O, Ozata F, Dalgic Hande, Onur Korkut Z. Effect of bleaching agents on calcium loss from the enamel surface. *Quintessence Int* 2007;38:339-347.
33. Attin T, Vollmer D, Wiegand A, Attin R, Betke H. Subsurface microhardness of enamel and dentin after different external bleaching procedures. *Am J Dent* 2005;18:8-12.

34. Baiping, Fu. Effects of dental bleaching on micro and nano morphological alterations of the enamel surface. *J Dent* 2007;20:35-40.
35. Jerindroba Faraoni R J, Pedroso Turssi C, Campos Serra M Concentration-dependent effect of bleaching agents on microhardness and roughness of enamel and dentine. *J Dent* 2007; 20:31-34.
36. Da Costa DB, Mazur RF. Effects of new formulas of bleaching gel and fluoride application on enamel microhardness: An in vitro study. *Oper Dent* 2007;32:589-594.
37. 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. *J Dent* 2007;35:845-850.
38. Basting RT, Rodrigues Jr AL, Campos Serra MC. Micromorphology and surface roughness of sound and desmineralized enamel and dentin bleached with a 10 % carbamide peroxide bleaching agent. *Am J Dent* 2007;20:97-102.
39. Sulieman M, Addy M, Macdonald E, Riss JS A safety study in vitro for the effects of in office bleaching system on the integrity of enamel and dentin. *J Dent* 2004;32:581-590.
40. Maia E, Baratieri LN, Amaral Caldeira de Andrada M, Monteiro S Jr, Cardoso Viera LC. The influence of two home-applied bleaching agents on enamel microhardness: an in situ study. *J Dent* 2008;26:2-7.

41. Tschoppe P, Neumann K, Mueller J, Kielbassa AM. Effect of fluoridated bleaching gels on the remineralization of predemineralized bovine enamel in vitro. *J Dent* 2009;37(2):156-162.
42. Lee KH, Kim HI, Kim KH, Kwon YH. Mineral loss form bovine enamel by a 30% hydrogen peroxide solution. *J Oral Rehabil* 2006;33:229-233.
43. De Madeiros CLSG, González López S, Bolaños Carmona MV, Sanchez Sanchez P, Bolaños Carmona J. Effects of phosphoric acid on bovine enamel bleached with peroxide de carbamide. *Eur J Oral Sci* 2008;116:66-71.
44. Jiang T, Ma X, Wang Z, Tong H, Hu J, Wang Y. Beneficial effects of hydroxiapatite on enamel subjected to 30% hydrogen peroxide. *J Dent* 2008;36:907-914.
45. Unlu N, Cobankara F K, Altinoz & F, Ozer C. Effects of home bleaching agents on the microhardness of human enamel and dentin. *J Oral Rehabil* 2004;31:57-61.
46. Efeoglu N, Woodb D, Efeoglu C. Microcomputerized tomography evaluation of 10% carbamide peroxide applied to enamel. *J Dent* 2005;33:561-567.
47. Jiang T, Ma X, Wang Y, Zhu Z, Tong H, Hu J. Effects of Hydrogen Peroxide on Human Dentin Structure. *J Dent Res* 2007 Nov;86(11):1040-5.
48. Rotstein I, Dankner E, Goldman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *J Endod* 1996;22(1):págs. 23-5.

49. Esteves Alfonso Camargo S, Carneiro Marcia V, Ribeiro Carmargo CH, Gasparoto Mancini MN, Maciel Meneses M. Penetration of 38% Hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod* 2007;33:1074-1077.
50. Gomez APA, Giraldo GMH, Arango LGH. Peróxido de hidrógeno al 35% y peróxido de carbamida al 10% para el blanqueamiento dental. *Univ Odontol* 1999;19:14-20.
51. D, Nathanson. Vital tooth bleaching: sensitivity and pulpal considerations. *J Am Dent Assoc* 1997;128:41S-44S.
52. Benneti A R, Valera M C, Mancini M N G, Miranda C B, Balduchi. & I. In vitro penetration of bleaching agents into pulp chamber. *Int Endod J* 2004;37:120-124.
53. Cohen SC, Chase C. Human pulpe response to bleaching procedures on vital teeth. *J Endod* 1979; 5:134-8.
54. Robertson WD, Melfi RC. Pulpal response to vital bleaching procedures. *J Endod* 1980;6:645-9.
55. Haywood VB. Nightguard vital bleaching: current concepts and research. *J Am Dent Assoc* 1997;128:19S-25S.
56. Turkun M, Kaya A D. Effect of 10 % sodium ascorbate on the shear bond strengt of composite resin to bleached bovine enamel. *J Oral Rehabil* 2004;31:1184-1191.
57. Perdigao J, Francci C, Swift EJ Jr, Ambrose WW, Lopes M. Ultra-morfological study of the interaction of dental adhesives with carbamide peroxide-bleached enamel. *Am J Dent* 1998;11:291-301.

58. Capelleto E, Pedroso C, Takeo A, Campos M. Influence of post-bleaching time intervals on dentin bond strenght. *Braz Oral Res.* 2004;18:75-79.
59. Sung EC, Chan SM, Mito R, Caputo AA. Effect of carbamide peroxide bleaching on the sheer bond strength of composite to dental bonding agent enhanced enamel. *J Prosthet Dent* 1999;82:595-9.
60. Bizhang M, Seemann R, Duve G, Römhild G, Altenburger MJ, Jahn KR, Zimmer S. Demineralization Effects of two bleaching procedures on enamel surfaces with and without post-treatment fluoride. *Oper Dent* 2006;31(6):705-709.
61. Chen H P, Chang C H, Liu J K, Chuang S F, Yang J Y. Effect of fluoride containing bleaching agents on enamel surface properties. *J of Dent* 2008;36:718-725.
62. Castieiras Lacambra MJ, Fuentes Arderiu X , Queraltó Compañó J M. *Bioquímica clínica y patología molecular.* vol 1. s.l. : Reverté S. A, 1998.
63. Broekaert J.A.C. *Analytical atomic spectrometry with flames and plasma.* 2. s.l. : Willey-VCH, 2002.
64. Watson J.T., Sparkman O. D. *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation applications, and atrategies for data interpretation.* 4th. s.l. : Jhon Wiley, 2007.
65. [aut. libro] Goberna C Faraldos M. *Técnicas de análisis y caracterización de materiales.* Madrid : s.n., 2002, págs. 329-393.
67. Chalmers J.M, Griffiths P. R. *Handbook of Vibrational Spectroscopy.* 5. s.l. : Jhon Wiley & Sons, 2002.

68. Michelson AA. On the application of interference methods to spectroscopic measurements. *Philosophical Magazine* 1981;31:338-346.
69. Clarke FJJ, Birch JR, Chunnillalland CJ, Smart MP. FTIR measurements—standards and accuracy. *Vibrational Spectroscopy* 2002;30:25-29.
70. Griffiths PR, De Haseth JA. *Fourier transform infrared spectrometry*. s.l. : Willey-Interscience, 2007.
71. Iijima M, Moradian-Oldak J. Control of apatite crystal growth in a fluoride containing amelogenin-rich matrix. *Biomaterials* 2005;26(13):1595-1603.
72. Rey C, Shimizu M, Collins B, Glimcher M. Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age. I: Investigations in the upsilon 4 PO₄ domain.. *Calcif Tissue Int.* 1990 Jun;46(6):384-94.
73. Miller L S, Vairavamurthy V, Chance M R, Mendelsohn R, Paschalis E P, Betts F, Boskey A L. In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the ν₄ PO₄- vibration. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001;1527:11-19.
74. Rey C, Renugopalakrishnan V, Shimizu M, Collins B, Glimcher M J. A resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of the CO₃²⁻ ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation. *Calcif Tissue Int* 1991;49(4):259-268.

75. Rey C, Collins B, Goehl T, Dickson I R, Glimcher M. The carbonate environment in bone mineral: a resolution enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Calcif Tissue Int* 1989;45:157-164.
76. Bohic S, Rey C., Legrand A, Sfihi H, Rohanzadeh R, Martel C, Barbier A, Daculsi G. Characterization of trabecular rat bone mineral: effect of ovariectomy and bisphosphonate treatment. *Bone* 2000;26:341-348.
77. Ou-Yang H, Paschalis E P, Mayo W E, Boskey A L, Mendelsohn R. Infrared microscopic imaging of bone: spatial distribution of CO₃-2. Infrared microscopic imaging of bone: spatial distribution of CO₃-2. *J Bone Miner Res*. 2001 16;893-900.
78. El Feki H, Rey C, Vignoles M. Carbonate ions in apatites: Infrared investigations in the ν₄ CO₃ domain. *Calcif Tissue Int*. 1991;49:269-274.
79. Paschalis E P, Jacenko O, Olsen B, Mendelsohn R, Boskey A L. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis identifies alterations in mineral properties in bones from mice transgenic for type X collagen. *Bone* 1996;19:151-156.
80. Boskey, A L. Mineralization, structure and function of bone. Dynamics of bone and cartilage metabolism. New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, San Diego : M. J. Seibel, Robins, S. P., Bilezikian, J. P Academic Press:, 1999, págs. 153-164.
81. Bohic S, Rey C, Legrand A, Sfihi H, Rohanzadeh R, Martel C, Barbier A, Daculsi G. Characterization of trabecular rat bone mineral: effect of ovariectomy and bisphosphonate treatment. *Bone* 2000;26:341-348.

82. Capítulo I: Fundamentos de Espectroscopía Raman. [En línea] [Citado el: 11 de Agosto de 2009.] www.tdx.cbuc.es/TESIS_UPC/.../TDX...//03Rpp03de11.pdf.
83. Penel G, Leroy G, Rey C, Bres E. Microraman spectral study of PO₄ and CO₃ vibrational modes in syntetic and biological apatites. *Calcif Tissue Int* 1998;63:475-481.
84. Rouquerol F, Rouquerol J, Sing K SW. Adsorption by powders and porous solids. Principles, methodology and applications. New York : Academic Press, 1999.
85. Gregg S J, Sing K S W. Adsorption, surface area and porosity. s.l. : Academic Press, 1982.
86. 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.
87. Wiegand A, Vollmer D, Foitzik M, Attin R, Attin T. Efficacy of different whitening modalities on bovine enamel and dentin. *Clin Oral Investig*. 2005;9(2):91-97.
88. Moriwaki Y, Kani T, Kozatani T, Tsutsumi S, Shimode N, Yamaga R. The cristallinity change of bovine enamel during maduration., *Japanese Journal of Dental Materials* 1968;9:78-85.
89. Acil Y, Mobasseri AE, Warnke PH, Terheyden H, Wiltfang J, Springer I. Deteccion of mature collagen in human dental enamel. *Calcifi Tissue Int* 2005;76(2):121-6.

90. Davison CL, Boom G, Arends J. Calcium distribution in human and bovine surface enamel. *Caries Res* 1973; 7:349-359.
91. Tarkany Basting R, Rodrigues Jr A L, Campos Serra M. Micromorphology and surface roughness of sound and desmineralized enamel and dentin bleached with a 10 % carbamide peroxide bleaching agent. *Am J Dent* 2007;20:97-102.
92. Rotstein, CD. Role of Catalase in the elimination of residual hydrogen peroxide following tooth bleaching. *J Endod* 1993;19(11):567-569.
93. Gotz H, Duschner H, White DJ, Klukowska MA. Effects of elevated hydrogen peroxide 'strip' bleaching on surface and subsurface enamel including subsurface histomorphology, micro-chemical composition and fluorescence change. *J Dent* 2007;35:457-466.
94. Efeoglu N, Wood D J, Efeoglu C. Thirty-five percent carbamide peroxide application. *Dent Mater* 2007;23(7):900-904.
95. Jackson M, Mantsch HH. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995;30 (2):95-120.
96. Ruse N D, Smith CC, Torneck C D, Titley K C. Preliminary surface analysis of etched, bleached, and normal bovine enamel. *J Dent Res* 1990;69(9):1610-1613.
97. Brunauer S, Demina L S, Demina W S, Teller E. On a theory of the van der Waals adsorption of gases. *J Am Chem Soc* 1940;62:1273.

98. Cheng ZH, Yasukawa A, Kandori K, Ishikawa T. FTIR study of adsorption of CO₂ on Nonstoichiometric calcium hydroxiapatite. *Langmuir* 1998;14:6681-6686.
99. 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(2):117-121.
100. Colthup N. B, Daly L H, Wiberley S E. Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy. 3rd Ed. New York : Academic Press, 1990.
101. Sanches RP, Otani C, Damiaõ AJ, Miyakawa W. AFM characterization of bovine enamel and dentine after acid-etching. *Micron* 2009;40(4):502–506.
102. Stumm W, Morgan J. Aquatic Chemistry, Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters. 3rd. s.l. : Jhon Wiley & Sons, Inc, 1996.
103. Margolis HC, Zhang YP, Lee CY, Kent RL Jr, Moreno EC. Kinetics of enamel demineralization in vitro. *J Dent Res* 1999;78(7):1326-35.
104. Fonseca RB, Haiter-Neto F, Carlo HL, Soares CJ, Sinhoreti MAC, Puppim-Rontani RM, Correr Sobrinho L. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varing bovine age. *Arch Oral Biol* 2008;53:1023-1029.
105. Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T. *Arch Oral Biol* 2005;50:541-552.
106. Cazalbou S, Combes C, Eichert D, Rey C, Glimcher MJ. Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo. *J Bone Miner Metab* 2004;22(4):310-7.

107. Rey M, Tyuterev VG Adiabatic and non-adiabatic corrections to rovibrational energies of diatomic molecules: variational calculations with experimental accuracy. *Phys Chem Chem Phys* 2007;9:2538-48.
108. Watari, F. In situ quantitative analysis of etching process of human teeth by atomic force microscopy. *J Electron Microsc* 2005;54(3):299-308.
109. Ushigome T, Takemoto S, Hattori M, Yoshinari M, Kawada E, Oda Y. Influence of peroxide treatment on bovine enamel surface - cross sectional analysis. *Dent Mater J* 2009;28(3):315-323.
110. Calzabou S, Eichert D, Ranz X, Drouet C, Combes C, Harmand MF, Rey C. Ion exchanges in apatites for biomedical application. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16(5):405-409.
111. Fleet ME, Liu X. Local structure of channel ions in carbonate apatite. *Biomaterials* 2005;26:7548-54.
112. Peroos S, Du Z, de Leeuw NH. A computer modelling study of the uptake, structure and distribution of carbonate defects in hydroxy-apatite. *Biomaterials* 2006; 27:2150-61.
113. Park HJ, Kwon TY, Nam SH, Kim HJ, Kim KH Changes in bovine enamel after treatment with a 30% hydrogen peroxide bleaching agent. *Dent Mater J* 2004;23(4):517-521.
114. Santini A, Pulham C R, Rajab A, Ibbetson R. The effect of a 10% carbamide peroxide bleaching agent on the phosphate concentration of tooth enamel assessed by Raman spectroscopy. *Dental Traumatology* 2008;24:220-223.

115. Cimilli H, Pameijer C H. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on the physical properties and chemical composition of enamel. *Am J Dent* 2001;14:63-66.

116. Cadenaro M, Breschi L, Nucci C, Antonioli F, Visintini E, Prati C, Matis BA, Lenarda R Di. Effect of two in-office whitening agents on the enamel surface in vivo: a morphological and non-contact profilometric study. *Oper Dent* 2008;33(2):127-134.

117. Mahringer C, Füreder M, Kastner M, Vitkow L, Hanning M, Kienberger F, Schilcher K. Examination of native and carbamide peroxide-bleached human tooth enamel by atomic force microscopy. *Ultrastruct Pathol* 2009;33:189-196.

ANEXO A

ARTICULO: DEMINERALIZATION EFFECTS OF PHOSPHORIC ACID ON SURFACE AND SUBSURFACE BOVINE ENAMEL BLEACHED WITH IN-OFFICE HYDROGEN PEROXIDE. ACCEPTED IN JOURNAL ADHESIVE DENTISTRY

Carolina Torres-Rodríguez¹, Santiago González-López², Victoria Bolaños-Carmona³, Purificación Sanchez-Sanchez⁴, Alejandro Rodríguez Navarro⁵, Thomas Attin⁶.

¹ C Torres-Rodríguez. Associate Professor. Department of Oral Health. Faculty of Dentistry. National University of Colombia.

² S González-López. PhD, Associate Professor, Pathology and Dental Therapeutics. Faculty of Dentistry. University of Granada, Spain.

³ V Bolaños-Carmona PhD, Associate Professor, Integrated Pediatric Dentistry. Faculty of Dentistry. University of Granada, Spain.

⁴ P Sanchez-Sanchez. PhD, Associate Professor, Department of Inorganic Chemistry. Faculty of Sciences. University of Granada, Spain.

⁵ A Rodríguez Navarro PhD, Associate Professor, Department of Mineralogy and Petrology. Faculty of Sciences. University of Granada, Spain.

⁶ T Attin. PhD, Professor. Department of Clinic for Preventive Dentistry, Periodontology and Cariology, University Zurich, Zurich, Switzerland.

Short title: Phosphoric acid effects on subsurface bleached enamel

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

FAX: (34) 958 240908
E-mail: sglopez@ugr.es

Abstract

Purpose: To measure the demineralization capacity of 37% phosphoric acid on surface and subsurface bovine enamel after bleaching with hydrogen peroxide (HP).

Materials and Methods: Three equally-sized sections with 16 mm² of exposed enamel surface were obtained from the enamel of ten bovine incisors. One specimen sample from each crown was assigned to one of three groups (n=10): Group I, no bleaching agent; Group II, bleached with 38% HP for 20 min; or Group III, 30% HP for 60 min. After 24 h, the thickness of specimens was measured, and they were immersed in 37% phosphoric acid solution, of which 5-mL aliquots were collected at 30 s and 60 s. Specimens were then ground to a depth of 25 µm and again immersed in 37% phosphoric acid solution. This procedure was repeated for enamel depths of 50 and 100 µm. Ca²⁺ concentrations in the phosphoric acid aliquots were measured by atomic absorption spectroscopy.

Results: No significant differences were found in the total amounts of extracted Ca²⁺ between bleached and unbleached specimens (F=0,142; p=0.869). The amount of Ca²⁺ extracted was similar among the four depth levels in the unbleached and in the 30% HP bleached specimens. A significantly larger amount of Ca²⁺ was obtained at 25 µm depth (subsurface) from specimens treated with 38% HP.

Conclusions:

Pre-bleaching with 38% HP significantly increased the decalcifying effect of phosphoric acid on subsurface enamel at a depth of 25 µm with respect to 100 µm, whereas pre-bleaching with 30% HP did not modify this effect at any level.

Key-words: hydrogen peroxide, decalcifying, subsurface enamel, phosphoric acid, enamel acid etching, atomic absorption spectroscopy.

Introduction

Numerous techniques have been used for vital dental bleaching. With the in-office technique, high concentrations of hydrogen or carbamide peroxide are applied during the clinical treatment session. With home tooth bleaching, the same peroxide-based gels are applied at lower concentrations, using custom-made trays¹⁷ or placing bleaching strips on the buccal surface of the teeth.¹⁴

The mechanisms underlying tooth bleaching have not been fully elucidated. However, it has been proposed that the strong oxidative action of the free radicals generated by hydrogen peroxide (HP) acts by breaking the polypeptide chain caused by the destruction of amino acids that are part of the composition of the organic substance, and the main agents responsible for tooth bleaching may be hydroxyl radicals.²¹

There is no general consensus on the negative effects of bleaching agents on enamel and dentine. Most studies have reported that peroxide-containing bleaching agents have no significant deleterious effects on the enamel or dentine surface or subsurface morphology, chemistry, microhardness, or ultrastructure.¹⁸ However, some researchers have claimed that tooth-whitening procedures irreversibly damage tooth structure and may cause changes in enamel microstructure, notably a demineralization that is similar to initial caries.²⁷ It was reported that the microhardness of enamel is reduced by in-office and at-home bleaching,³⁰ and that its nano-roughness is significantly increased by even a short (1-h) bleaching procedure. The organic material around the enamel rods is mobilized by the attack of free oxygen radicals, preferentially damaging the enamel sheath area and increasing the surface roughness.²⁴

It has been demonstrated that the peroxide readily diffuses through the enamel and dentine, reaching the pulp tissue.^{5,14} De Lima et al.⁷ found that CP gel extracts exerted dose-dependent cytotoxic effects on cultured pulp cells, even at low concentrations.

There is also controversy about whether it can affect subsurface as well as surface enamel. A recent study using confocal laser scanning microscopy (CLSM), scanning electron microscopy (SEM), and Raman spectroscopy plus CLSM technique found no significant ultrastructural or chemical effects on surface or subsurface enamel or dentin.¹⁶ However, other researchers have suggested that bleaching causes microstructural changes to surface and subsurface enamel layers²⁰ mainly localized in the outer enamel,^{11,19} which have been associated with a loss of calcium^{22,35} and a significant decrease in calcium/phosphate ratios.^{4, 5, 6}

Microcomputed tomography studies demonstrated post-bleaching demineralization of the enamel from 50 to 150 μm in depth.^{11, 12} It was observed that a larger amount of ions was released at higher HP concentrations,¹ which may be explained by changes in the chemical composition of dental enamel caused by the bleaching agents.⁹

Patients often need further interventions after bleaching in order to restore esthetic defects. Acid etching of the enamel is required shortly after bleaching in numerous clinical procedures, including composite restorations, replacement of old restorations, porcelain veneers, composite veneers, and bonding of orthodontic brackets. The acid etching of bleached enamel surfaces has been reported to produce a loss of prismatic shape, giving the surface an over-etched appearance.²⁰ A spectroscopy study found that a larger amount of Ca^{2+} was extracted from enamel by phosphoric acid after application of 30% CP and that this greater susceptibility to the action of the acid persisted for at least 1 wk after bleaching.⁸ In another similar study, the largest amount of Ca^{2+} was extracted by 37% phosphoric acid at 24 h after application of 30% peroxide, coinciding with a significant decrease in the shear bond strength of brackets to enamel. After one week, the shear bond strength with bleached enamel progressively recovered to reach the value observed with unbleached enamel and extracted Ca^{2+} values stabilized.¹⁵

Many clinical aesthetic procedures require bevels or some type of enamel preparation before acid etching, and subsurface decalcification caused by bleaching agents may influence the

effectiveness of the etching. The null hypothesis of the present study was that a bleaching treatment with 30% or 38% HP does not modify the decalcifying ability of phosphoric acid in enamel acid etching at either surface or subsurface level. Therefore, the objective of this *in vitro* study was to quantify, using atomic absorption spectroscopy, the amount of calcium extracted from surface and subsurface enamel (depths of 0, 25, 50, and 100 μm) by 37% phosphoric acid after its treatment with 30% and 38% HP.

Material and methods

After careful visual inspection, 10 bovine incisors with no signs of cracks or structural anomalies were selected and stored under refrigeration in solutions of distilled water and saturated thymol until their preparation for testing. All roots were sectioned at the cemento-enamel junction using an Accutom-50 diamond cutter (Accutom Hard Tissue Microtome). Crowns were polished with silicon carbide paper discs on a polisher (Exakt-Apparatebau D-2000, Norderstedt, Germany) to obtain a flat vestibular surface and a uniform substrate for bleaching. Each crown was then fixed with Coltene® utility wax (Whaledent. Inc, Mahwah, USA) to an acrylic base and cut into three 4x4 mm sections of equal size (sample specimens). Each specimen was then attached, with the enamel surface pointing downwards and using Coltene® utility wax (Whaledent. Inc, Mahwah, USA), to the central part of a 12x3 mm embedding mould that was then filled with Inplex® acrylic resin (Bayer MaterialScience, Leverkusen, Germany) until the whole specimen was covered. For every 10 ml of resin, 5 drops of accelerator and 10 drops of hardener were used. The exposed enamel surface of specimens was polished with 500-grit then 1200-grit silicon carbide paper discs to obtain a flat surface and remove possible excess resin, so that all specimens had the same surface area (16 mm²) of exposed enamel. The opposite end of the embedded specimen was also polished, obtaining two smooth and parallel surfaces. Specimens were stored in distilled water until the experimental procedure.

One sample specimen from each crown was assigned to one of three groups (n=10): Group I, no bleaching agent (control group); Group II, bleached with 38% HP (Opalescence® Boost, Ultradent, South Jordan, UT, USA, batch n° 5332) for 20 min; and Group III, bleached with 30% HP (Iluminé™ Office, Dentsplay de Trey GmbH, Konstanz, Germany, batch n° 0708001853) for 60 min, replacing all of the gel at 30 min as per manufacturer's instructions.

After the whitening treatment, specimens were stored in distilled water for 24 h and then dried with absorbent paper. Next, the thickness at the central part of the exposed enamel area was measured with a micrometer (Mitutoyo 350-MHN1-25-DM), which has a ratchet stop to ensure a constant measuring force, preventing transmission to the sample of the pressure exerted by the micrometer. Subsequently, specimens were immersed in 20 ml of 37% phosphoric acid solution, which was prepared by dissolving 311 ml of 85% phosphoric acid (Scharlan Cemise SA., Barcelona, Spain) at a concentration of 1.71 g/ml in 689 ml distilled water to obtain 1000 ml of 37% acid solution with pH 0.14, measured with a Micro pH 2000 pH-meter (Crisol, Alella, Spain).

A blank 5-mL sample of phosphoric acid solution and another blank with phosphoric acid solution plus embedding material alone were prepared in order to determine Ca^{2+} levels in absence of the specimen. All unbleached and bleached specimens underwent the same experimental procedure, i.e., immersion in 20 ml of phosphoric acid solution followed by constant agitation using a magnetic multi-stirrer (SBS A-09 series C, Barcelona, Spain) to uniformly mix the Ca^{2+} extracted into the solution. At 30 s and 60 s, 5-mL aliquots were drawn using a calibrated micropipette with a disposable tip that was replaced after each extraction. Extracts were placed in hermetically-sealed, labeled glass tubes. Hence, two extracts were obtained for each sample specimen.

After specimens were removed from the phosphoric acid solution, they were washed with abundant distilled water and dried with absorbent paper. Specimens were then ground with 1200-grit silicon carbide paper discs until the enamel depth was reduced by 25 μm .

Specimens were washed again with abundant distilled water, dried with absorbent paper, and immersed in the phosphoric acid solution followed by constant agitation using a magnetic multi-stirrer, collecting 5-mL aliquots at 30 s and 60s. The same procedure was repeated after reducing the enamel depth by 50 and 100 microns with respect to the initial dimensions. Hence, two aliquots were obtained for each specimen (at 30 and 60 s) at enamel depths of 0, 25, 50, and 100 μm (Fig. 1).

Ca^{2+} concentrations in solutions were determined by atomic absorption spectroscopy (Perkin Elmer mod. 5100ZL, Massachusetts, USA) using the flame technique. Extract readings were expressed in ppm and subsequently transformed into mg of Ca^{2+} lost per area of specimen by applying the following formula:⁸

$$\text{mg Ca}^{2+} = [(\text{ppm Ca}^{2+}) \cdot 10^{-3}\text{L/mL} \cdot V] / A$$

Where ppm Ca^{2+} are ppm of Ca^{2+} in each time period, V is volume of solution in ml (at 30 s, V1; and at 60 s, V2), and A is the area of the sample in mm^2 . The volume was 20 ml, at 30 s and 15 ml at 60 s (due to the removal of 5 ml from V1 for testing). Therefore, the mg of Ca^{2+} corresponding to 5 mL of V1 solution were added to the mg of Ca^{2+} obtained at 60 s. Likewise, since the volume at 60 s was 15 cc, the mg of Ca^{2+} corresponding to 5 mL of V1 solution plus 5 mL of V2 solution were added to those obtained at 60 s. By this means, we obtained the mg of Ca^{2+} passing into the solution per mm^2 of specimen, expressing the values in micrograms due to the low values found.

Statistical analysis

We used a full factorial model of analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, with two within-subject factors (subsurface level of enamel depth [0, 25, 50 or 100 μm] and immersion time in 37% phosphoric acid [30 or 60 s]) and a between-subject factor (treatment [control, 38%HP, 30%HP]).

The repeated-measures ANOVA revealed that the enamel depth and 37% phosphoric acid application time and their first-order interactions with the enamel treatment were all significant. Next, repeated-measures ANOVA was independently applied for each treatment group. Enamel depth and acid etching time entered this model as predictive variables. A second model explored only the enamel depth in each etching time and treatment group. In case of significance, pair comparisons were performed using the Bonferroni *post-hoc* procedure. The Kolmogorov-Smirnov test was applied to examine the normal distribution of extracted calcium values in the study groups. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Kolmogorov-Smirnov's test results were no significant for any study group, showing the normal data distribution. Results were comprised between $Z = 1.06$; $p = 0,28$ for the treatment with 30% HP at a depth of 25 μm , etching time 60 s and $Z = 0.34$, $p = 0.99$, in the control group at the superficial level (0 μm depth), etching time 30 s.

Table 1 shows the amounts of Ca^{2+} extracted from the enamel specimens (after subtracting the amount of Ca^{2+} in the specimen-free solution) for each whitening treatment and each enamel depth studied. Significant differences (ANOVA, $p < 0.05$) were found in the amount of Ca^{2+} present in the solution of phosphoric acid as a function of: enamel depth ($F = 5.564$; $p = 0.026$), interaction between enamel depth and bleaching treatment ($F = 5.197$; $p = 0.012$), phosphoric acid application time ($F = 45.853$; $p = 0.000$) and interaction between application time and bleaching treatment ($F = 3.506$; $p = 0.044$). First-order interactions between phosphoric acid etching time and enamel depth and second-order interactions between etching time, enamel depth and bleaching treatment were not significant. Hence, the effects of enamel depth and phosphoric acid application time are mutually independent but are not independent of the bleaching treatment applied.

No significant difference was detected in the global amount of Ca^{2+} extracted between bleached and unbleached specimens ($F= 0.142$; $p=0.869$) (between-subject factor). The effects of enamel depth and phosphoric acid immersion time were therefore analyzed for each bleaching treatment. In all treatment groups, Ca^{2+} extraction by 37% phosphoric acid was significantly influenced by the enamel depth and acid etching time, and these variables were independent of each other. In the unbleached control group and the group bleached with 30% HP, no differences in the amount of Ca^{2+} extracted was observed among the four enamel depths. The Bonferroni test verified that only the use of 38% HP produced significant differences in extracted Ca^{2+} among the different enamel depths (Fig. 2). Thus, the amount extracted at 25 μm was significantly greater than at 100 μm and was more than extracted at any depth in the other groups.

The separate analysis of extracted Ca^{2+} in the three treatment groups for each phosphoric acid application time showed similar results, with a larger amount of Ca^{2+} extracted after 30 s of acid etching at 25 μm than at 100 μm in the 38% HP group.

Acid etching time significantly influenced the amount of Ca^{2+} extracted for all treatment groups and depth levels. Thus, significantly more Ca^{2+} was obtained after 60 s than after 30 s immersion in phosphoric acid, except at a depth of 25 μm in the 38% HP group and at depths of 25 and 50 μm in the 30% HP group, where no significant difference in Ca^{2+} extraction was observed between 30 and 60 s of acid etching.

Discussion

Bleaching agents usually contain either HP or CP. The concentrations and conditions of vital tooth bleaching systems vary considerably. In the present study, we used 30% HP for 60 min and 38% HP for 20 min in a single application on the enamel of bovine teeth. Bovine enamel was used in this study because it has been proposed as a reliable substitute for human teeth in research.^{29,31,32} SEM observations revealed the similar morphology of bovine and human

teeth and of their enamel after etching with 35% H₃PO₄.²⁹ Although bovine enamel undergoes faster demineralization in comparison to human enamel¹³ and suffers greater erosion and erosion-abrasion,² it can be accepted as a suitable substitute to evaluate enamel demineralization.²⁶

The repercussions of bleaching agents on the structure of hard dental tissues remain controversial. It has been reported that even over bleaching produced no changes in observed subsurface enamel or dentin ultrastructure or architecture.³⁷ Conversely, it has been reported that continued bleaching caused a progressive demineralization of enamel and the concomitant enamel matrix degradation of a layer that is probably only a few microns deep.³³ Many HP bleaching systems are formulated at extremely low pHs (often below 4) to ensure stability.²⁸ The combination of low pH and high peroxide levels might be expected to affect the surface and subsurface integrity of dental tissue and react with tooth mineral substrates including both surface and subsurface structures.³ These deleterious effects are not evident when the pH is above 5.5, which can be considered a critical cut off point.³⁴ The pH of both agents used is above this point.

In a recent study, a larger amount of Ca²⁺ was extracted from enamel by phosphoric acid after the application of 30% CP for 90 min,⁸ contrasting with the present finding of no significant differences in the global amount of Ca²⁺ extracted between bleached and unbleached specimens. However, although we used high concentrations, they were applied on the enamel for a short time. Bistey et al.³ and Lee et al.²² reported that bleaching-induced structural changes to surface enamel were proportionally more severe with longer treatment times and higher HP concentrations. An increase in the quantity of ions released was also reported with higher HP concentrations.¹ It is therefore necessary to explore the amount of Ca²⁺ extracted by phosphoric acid after the prolonged application of HP.

HP has a high capacity for diffusion,³⁶ and it is known that post-bleaching intervals will influence the amount of Ca²⁺ extracted by

phosphoric acid. In a previous study, De Medeiros et al.⁸ found no significant difference in Ca²⁺ loss between an unbleached control group and a group etched immediately after bleaching, whereas significantly more Ca²⁺ was extracted from the bleached group at 24 h after bleaching, explaining our choice of this interval for our experiment.

The acid etching time significantly influenced the amount of Ca²⁺ extracted for all treatment groups and depth levels. Thus, significantly more Ca²⁺ was obtained after 60 s than after 30 s of immersion in phosphoric acid, although this difference was not evident at an enamel depth of 25 µm.

In the unbleached control group and the group bleached with 30% HP, the amount of Ca²⁺ extracted by phosphoric acid was the same at all four enamel depths studied. It should be borne in mind that the manufacturer's label describes this product as 30% HP, but the mixed gel has a concentration of only 15% (manufacturer's information). We highlight that Ca²⁺ extraction was higher at 25 and at 100 µm (although without significant differences). This could be explained by the enamel microstructure, where Retzius lines have a regular periodicity (of around 30 µm),¹⁰ alternating light and dark bands and with a lower crystal concentration in the dark bands.²³

The amount of Ca²⁺ extracted at 25 µm was only significantly higher than that obtained at 100 µm depth when 38% HP was applied. It can be speculated that there may be a critical point at which there is a correlation among final HP concentration, application time, and delay time (post-bleaching period). Our results confirm the possible decalcifying effect of HP, because a higher Ca²⁺ loss was detected at a depth of 25 µm level when a high HP concentration applied for a short time. Enamel demineralization of 50 µm¹¹ and 150µm¹² has been reported with the use of low and high HP concentrations, respectively.

In a Raman spectroscopy study, Götz et al.¹⁶ found no alterations of phosphate bands, which were similar to synthetic pure hydroxyapatite after the chemical removal (by acetone or hydrazine

extraction) of the organic constituents. Peroxides are known to produce the whitening effect by destroying one or more of the double bonds in the conjugated chain of chromophore.¹⁹ It is possible that peroxides only affect the organic matrix of enamel, facilitating the detachment of calcium phosphates and their extraction by phosphoric acid. Raman spectroscopy and Infrared Spectroscopy can determine qualitative changes due to modifications in bonds of functional groups but do not quantify mineral losses, whereas Ca^{2+} losses can be measured using spectroscopy. An absence of alterations in hydroxyapatite composition may be compatible with a greater release of Ca^{2+} , since more unaltered hydroxyapatite may become detached if peroxides affect the organic matrix. It is therefore of interest to study changes in bands corresponding to amides in order to detect whether alterations are produced in the enamel organic matrix.

McCracken et al.²⁵ used atomic absorption spectroscopy and demonstrated that CP has an intrinsic demineralizing effect. Carbamide peroxide causes local microstructural and chemical changes in enamel that are similar to those of initial caries. Electron probe microanalysis showed reduced concentrations of Ca and P and a lower Ca:P ratio. Some Ca and P were also reported in the bleaching gel after use.²⁷

The null hypothesis of our study must be partially accepted. Within the limitations of our *in vitro* study, we can conclude that the amount of Ca^{2+} extracted by phosphoric acid from groups bleached with 30% and 38% HP for a short application time is the same as that extracted from unbleached teeth. Previous whitening with 30% HP does not influence the amount of Ca^{2+} extracted by phosphoric acid at the four enamel depths levels studied (from 0 to 100 μm). A significantly higher calcium extraction was only observed at a depth of 25 μm when 38% HP was used.

Conclusions

Within the limitations of our *in vitro* study and taking due caution in extrapolating results from bovine to human teeth, we can conclude that pre-bleaching with 38% HP significantly increases the decalcifying effect of phosphoric acid on subsurface enamel at a depth 25 μm with respect to 100 μm , whereas pre-bleaching with 30% HP does not modify this effect at any level.

Clinical Relevance: 38% HP increases the decalcifying capacity of phosphoric acid at subsurface level.

References

1. Al Salehi SK, Wood DJ, Hatton PV. The effect of 24h non-stop hydrogen peroxide concentration on bovine enamel and dentine mineral content a microhardness. *J Dent* 2007;35:845-850.
2. 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;35:773-7.
3. 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.
4. Bizhang M, Seemann R, Duve G, Römhild G, Altenburger MJ , Jahn KR et al. Demineralization Effects of 2 Bleaching Procedures on Enamel Surfaces With and Without Post-treatment Fluoride Application. *Oper Dent* 2006;31:705-709.

5. Camargo SE, Valera MC, Camargo CH, Gasparoto Mancini MN, Menezes MM. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *J Endod* 2007;33:1074-1047.
6. Cavalli V, Giannini M, Carvalho RM. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on tensile strength of human enamel. *Dent Mater* 2004; 20:733-739.
7. De Lima AF, Lessa FC, Gasparoto Mancini MN, Hebling J, de Souza Costa CA, Marchi GM. Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;90:907-12.
8. De Medeiros CL, 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.
9. Dishman MV, Covey DA, Baughan LM. The effects of peroxide bleaching on composite to enamel bond strength. *Dent Mater* 1994; 10:33-36.
10. Dowker SE, Elliott JC, Davis GR, Wilson RM, Cloetens P. Synchrotron x-ray microtomographic investigation of mineral concentrations at micrometre scale in sound and carious enamel. *Caries Res* 2004;38:514-522.
11. Efeoglu N, Wood D, Efeoglu C. Microcomputerised tomography evaluation of 10% carbamide peroxide applied to enamel. *J Dent* 2005;33:561-567.

12. Efeoglu N, Wood DJ, Efeoglu C. Thirty-five percent carbamide peroxide application causes in vitro demineralization of enamel. *Dent Mater* 2007;23:900-904.
13. Featherstone JD, Mellberg JR. Relative rates of progress of artificial carious lesion in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res* 1981;15:109-114.
14. Gokay O, Mujdeci A, Algin E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J* 2005;38:516-520.
15. González-López S, de Medeiros CL, Camejo-Aguilar D, Bolaños-Carmona MV, Sanchez-Sanchez P, Menendez-Nuñez M. Demineralization effects of hydrogen peroxide on bovine enamel and relation of shear bond strength of brackets. *J Adhes Dent* 2009;11:461-7.
16. 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.
17. Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int* 1989;20:173-176.
18. Joiner A. Review of the effects of peroxide on enamel and dentine properties. *J Dent* 2007;35:889-896.
19. Joiner A. The bleaching of teeth: a review of the literature. *J Dent* 2006;34:412-419.

20. Josey AL, Meyers IA, Romaniuk K, Symons AL. The effect of vital bleaching techniques on enamel surface morphology and the bonding of composite resin to enamel. *J Oral Rehabil* 1996;23:244-250.
21. Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod* 2004;30:45-50.
22. Lee KH, Kim HI, Kim KH, Kwon YH. Mineral loss from bovine enamel by a 30% hydrogen peroxide solution. *J Oral Rehabil* 2006;33:229-233.
23. Li C, Risnes S. SEM observations of Retzius lines and prism cross-striations in human dental enamel after different acid etching regimes. *Arch Oral Biol* 2004;49:45-52.
24. Mahringer C, Fureder M, Kastner M, Ebner A, Hinterdorfer P, Vitkov L et al. Examination of native and carbamide peroxide-bleached human tooth enamel by atomic force microscopy. *Ultrastruct Pathol* 2009;33:189-96.
25. McCracken MS, Haywood VB. Demineralization effects of 10 percent carbamide peroxide. *J Dent* 1996;24:395-398.
26. Mellberg JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Dent Res* 1992;71:913-919.
27. Potočnik I, Kosec L, Gašperšič D. Effect of 10% carbamide peroxide bleaching gel on enamel microhardness, microstructure and mineral content. *J Endod* 2000;26:203-206.

28. Price RB, Sedarous M, Hiltz GS. The pH of tooth-whitening products. *J Can Dent Assoc* 2000;66:421-426.
29. 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;6:117-21.
30. Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GM, Heymann HO, Pimenta LA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. *Dent Mater* 2005;21:1059-67.
31. Ruse ND, Smith CC, Torneck CD, Titley KC. Preliminary surface analysis of etched, bleached, and normal bovine enamel. *J Dent Res* 1990;69:1610-13.
32. Sanches RP, Otani C, Damiaõ AJ, Miyakawa W. AFM characterization of bovine enamel and dentine after acid-etching. *Micron* 2009;40:502-6.
33. Santini A, Pulham CR, Rajab A, Ibbetson R. The effect of a 10% carbamide peroxide bleaching agent on the phosphate concentration of tooth enamel assessed by Raman spectroscopy. *Dent Traumatol* 2008;24:220-223.
34. 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.
35. Tezel H, Ertas OS, Ozata F, Dalgac H, Korkut ZO. Effect of bleaching agents on calcium loss from the enamel surface. *Quintessence Int* 2007;38:339-347.

36. Wattanapayungkul P, Yap AU. Effects of in-office bleaching products on surface finish of tooth-colored restorations. *Oper Dent* 2003;28:15-19.
37. White DJ, Kozak KM, Zoladz JR, Duschner HJ, Götz H. Effects of Crest Whitestrips bleaching on subsurface microhardness and ultrastructure of tooth enamel and coronal dentin. *Am J Dent* 2004;17:5-11;88.

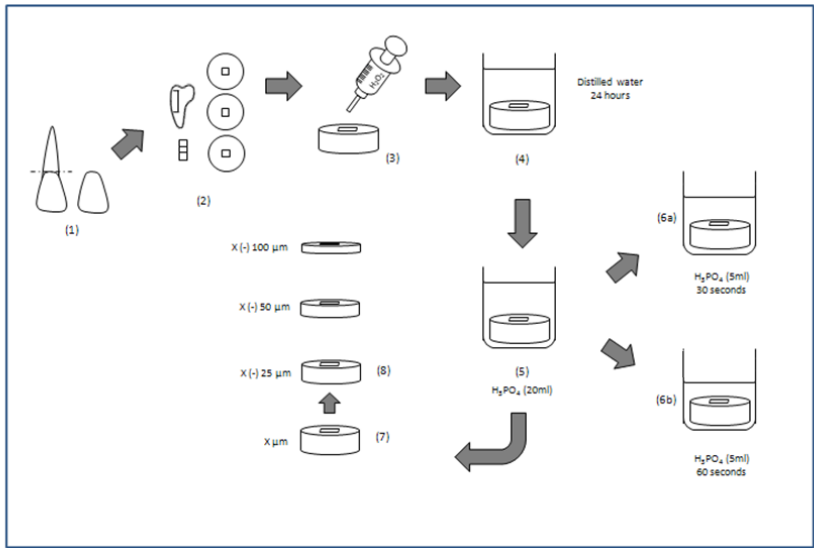


Figure 1. The root was sectioned at the cementoamel junction - 2. The crown was cut into three 4x4 mm sections and included in acrylic resin. 3. The specimen was bleached with HP. 4. The specimen was stored in distilled water for 24 h. 5. The specimen was immersed in 37% phosphoric acid solution. 6. At 30 s and 60 s, 5-mL aliquots were drawn with a calibrated micropipette. 7. The thickness of the specimen was measured with a micrometer. 8. The specimen was ground to a depth of 25 μm and again immersed in 37% phosphoric acid solution. This procedure was repeated for enamel depths of 50 and 100 μm .

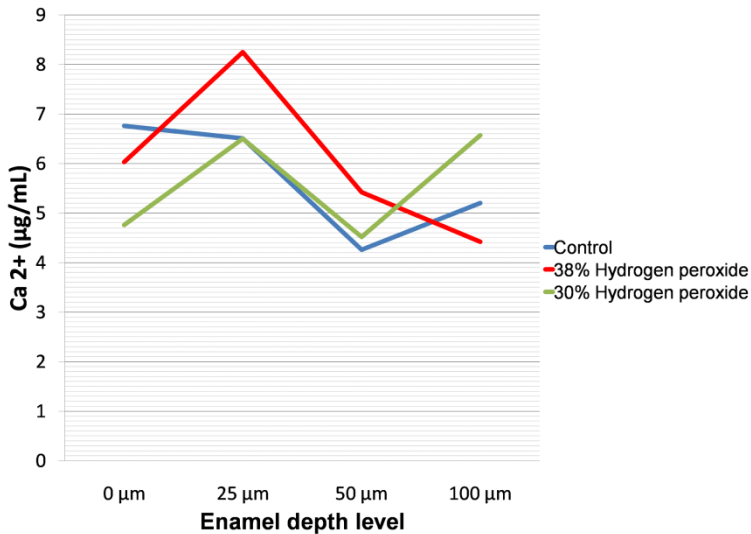


Figure 2. Mean values of Ca^{2+} extracted ($\mu\text{g/mL}$) by enamel depth.

Table 1. Ca^{2+} extracted by etching time and enamel depth level ($\mu g/mL$). Mean (sd). The same superscripts represent statistically significant differences ($p < 0.05$) between enamel depth levels in the experimental group treated with 38% HP.

Depth	0 μm			25 μm			50 μm			100 μm		
Etching time	30 s	60 s	Mean	30 s	60 s	Mean	30 s	60 s	Mean	30 s	60 s	Mean
Control	6.33 (2.64)	7.19 (2.63)	6.76 (2.63)	6.05 (2.35)	6.97 (2.80)	6.51 (2.57)	3.89 (3.56)	4.63 (4.26)	4.26 (3.91)	4.82 (3.03)	5.58 (3.57)	5.20 (3.29)
38% Hydrogen peroxide	5.51 (1.69)	6.55 (2.54)	6.03 (2.05)	8.17 (3.70) ^a	8.32 (3.94)	8.25 (3.79) ^b	5.24 (0.79)	5.60 (0.92)	5.42 (0.81)	4.28 (0.86) ^a	4.57 (0.89)	4.42 (0.87) ^b
30% Hydrogen peroxide	4.66 (1.50)	4.86 (1.62)	4.76 (1.56)	6.25 (2.25)	6.75 (2.74)	6.50 (2.46)	4.41 (1.31)	4.63 (1.59)	4.52 (1.43)	6.73 (2.12)	6.76 (2.50)	6.57 (2.31)

2. ARTÍCULO: SELECTIVE DEMINERALIZATION OF BOVINE ENAMEL BY PHOSPHORIC ACID. EN REVISIÓN

Carolina Torres-Rodríguez¹, Alejandro B. Rodríguez Navarro², Purificación Sánchez-Sánchez³, Santiago González-López⁴

¹Department of Oral Health. Faculty of Dentistry. National University of Colombia. Colombia

²Department of Mineralogy and Petrology. Faculty of Science. University of Granada. Spain.

³Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science. University of Granada. Spain

⁴Department of Pathology and Dental Therapeutics. Faculty of Dentistry. University of Granada. Spain.

Running title: Selective demineralization of enamel

Corresponding author:

Dr. Santiago González López

Department of Pathology and Dental Therapeutics, Faculty of Dentistry, Campus de Cartuja, University of Granada, 18071, Granada, Spain. Fax: + 34 958240908 email: sglopez@ugr.es

Abstract

The aim of this study was to investigate the behavior of the chemical composition of bovine enamel during phosphoric acid-induced demineralization. Enamel samples were ground into a fine powder, selecting the 150- and 200- μm fractions. They were immersed in diluted phosphoric acid (0.1%) for increasing time intervals ranging from 1 to 1440 min. The chemical composition of the solution and enamel powder was determined after each sequential treatment by means of atomic absorption (AA) and Fourier transformed infrared (FTIR) spectrometry. AA data revealed that the amount of calcium mobilized to the solution by the acid treatment was higher at shorter exposure times.

However, FTIR data showed that the degree of mineralization of the enamel remained constant during the treatment, indicating that the mineral and organic components were lost at the same rate. Interestingly, poorly crystalline phosphate and carbonate-rich mineral components were preferentially removed and were presumably the main source of calcium released by the acid exposure. FTIR results also demonstrated that organic components rich in hydrophobic groups were preferentially removed during acid treatment. Etching with phosphoric acid produces a non-homogeneous demineralization of bovine enamel, with the selective removal of poorly crystalline mineral and hydrophobic organic components.

Keywords: Calcium, demineralization, FTIR, hydroxyapatite, phosphoric acid.

Introduction

Enamel is a highly mineralized layer covering and protecting the teeth. It is made of carbonated hydroxyapatite microcrystals (95%) embedded in an organic framework; these are long ribbon-like crystals packed in parallel arrays or rods and arranged in a complex microstructure that endows the enamel with outstanding mechanical properties. The organic matrix comprises two main groups of noncollagenous proteins (1): A) hydrophobic proteins of low molecular weight designated amelogenins, which surround the rods and fill the voids between enamel crystals; and B) nonamelogenin proteins, acidic glycoproteins known as enamelines. Enamelins are intimately associated with the mineral phase and can only be extracted after complete enamel demineralization (2).

During enamel formation, organic matrix components are progressively removed and replaced with water and the growing crystals. The main organic matrix components during enamel formation are amelogenins, which are selectively removed during enamel maturation, leaving enamelins as the major organic component in mature enamel. Simultaneously, enamel crystals grow thicker and fill the space previously occupied by water and

organic matter, forming the fully dense mature enamel. Crystal nucleation and growth during enamel mineralization are thought to be regulated by complex processes in which the organic components, i.e., proteins, play an important role (3). However, there is still no complete understanding of the precise mechanisms by which the organism controls the growth of enamel crystals and directs the ordered assemblage of crystals and organic matrix to form the complex microarchitecture of enamel.

Investigation of acid-induced demineralization of teeth is of major clinical relevance. Enamel caries lesions are produced by this process (4), and chemical agents with demineralization capabilities are commonly applied in clinical treatments. Phosphoric acids have been used for decades to bond resin-based materials to enamel by the infiltration of resin into surface porosity created by acid etching (5). Demineralization is the result of specific interactions of acid species with the enamel mineral (6). It has been reported that mineral loss rates largely depend on the pH and type of acid (5), but no detailed study has been published on this process at molecular level.

We undertook an investigation of the phosphoric acid-induced demineralization of enamel, including molecular analyses, using atomic absorption (AA) and Fourier transform infrared (FTIR) spectrometry techniques to follow any changes in chemical composition of the enamel during this process.

Materials and methods

2.1 Sample selection

After careful visual inspection, bovine incisors with no signs of cracks or structural anomalies were selected and stored in a solution of distilled water and saturated thymol at 6^o C in a fridge.

2.2 Sample preparation

Teeth were sectioned at the cement-enamel junction, using a diamond saw (Accutom-50 Hard Tissue Microtome Struers Germany), and the crowns were then sagittally sectioned to obtain two surfaces (vestibular and palatine). Next, the enamel was mechanically and carefully separated from the crown dentin with a high-speed dental drill under an optical microscope. Each enamel sample was dried in an oven at 150° C for 24 h and ground with an agate mortar into a fine powder, which was then separated into four size fractions using 250 µm, 200 µm, 150 µm and 100 µm mesh sieves. The 150 and 200 µm fractions were selected for study.

2.3 Sample treatment

A 30-mg sample of enamel powder was immersed in 1 mL of 0.1% H₃PO₄ solution (Panreac 50% PA, Barcelona, Spain) for 1, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 or 1440 min; 0.5 ml of the solution was then withdrawn and transferred to a test tube (Eppendorf-Madrid Spain) using a calibrated micropipette (BOE 9220500 Boeco Germany) with a filter to prevent removal of solid phase. The remaining powder solution was rinsed twice with 10 mL of bidistilled water and centrifuged (EBA 21 Hettich Zentrifugen Germany) at 2000 rpm for 2 min. The supernatant was discarded and the powder was recovered and dried at 120° C for 24 h. Each experimental condition was repeated three times in replicated experiments.

2.4 Chemical analysis

2.4.1 Absorption Atomic Spectrometry

After adding 4.5 mL of bidistilled water to the 0.5 mL solution withdrawn from each experiments, the calcium concentration was measured with an AA spectrometer (AAS 1100B, Perkin-Elmer Waltham, IL).

2.4.2 FTIR Spectrometry

For the FTIR analyses, 2 mg of enamel powder recovered from each experiment was mixed with 95 mg of FTIR-grade KBr and pressed into a disk. Infrared spectral data were collected on a

Fourier Transform Infrared Spectrometer (Magna IR200, Nicolet, USA) at 2 cm⁻¹ resolution over 128 scans. The amounts of phosphate, carbonate, and organic matrix in enamel were determined from the peak area of absorption bands associated with phosphate, carbonate and amide groups in the infrared spectra (Table and Fig. 1). Overlapping peaks under these bands were resolved and their integrated areas were measured using curve fitting software (Peakfit v4.12, SeaSolve Software Inc.), applying a second derivative methodology. The procedure is more fully described elsewhere (7). This methodology yields a detailed and quantitative analysis of the molecular constituents of the mineralized tissue.

Different compositional parameters were determined to follow the chemical composition of the enamel during demineralization. Areas of isolated peaks were measured, labeling them with "A" followed by the peak or band position in cm⁻¹ (e.g., A1660, A1405). We also evaluated the contribution of individual components associated with different molecular environments in a specific region (e.g., H₃PO₄ within the ν₁, ν₃ PO₄³⁻ band region) (Fig. 1) by normalizing deconvoluted peak areas to the area of the band region from which they derived (e.g., A900_1200). These peak area ratios are designated "a" followed by the peak position (e.g., a953, a985, a1010).

We also measured the degree of enamel mineralization, defined as the ratio between the peak area of phosphate and amide bands: A1200-900/(A1700-1400).

Carbonate in enamel mineral (minCO₃²⁻) was defined as the ratio of the peak area for 1405 cm⁻¹ (carbonate type B substitution) to the phosphate band area:

$$\text{Min CO}_3^{2-} = \text{A1405} / \text{A900-1200}$$

The composition of the organic matrix was studied by calculating the relative proportion of amide bands as the ratio of each individual amide band to the total amide band:

$$\text{a1660} = \text{A1660} / (\text{A1700-1400})$$

$$a_{1560} = A_{1540} / (A_{1700} - A_{1400})$$
$$a_{1460} = A_{1460} / (A_{1700} - A_{1400})$$

Results

Calcium extracted by acid treatment

Figure 1 shows the cumulative amounts of Ca^{2+} extracted from the enamel powder by exposure to diluted acid for increasing time intervals. The amount of Ca^{2+} mobilized to the solution rapidly increased with longer time during the first 5 min of exposure and then stabilized at a constant maximum value for longer exposure times.

Evolution of chemical composition of enamel

Figure 2 shows the region of FTIR spectra used to characterize the chemical composition of the enamel. Figures 3 to 6 depict the behavior over time of the most relevant compositional parameters determined by FTIR. Table 2 summarizes the results of the correlation analyses between FTIR-determined enamel composition results and length of exposure to the acid solution. Exposure to the diluted acid solution modified the composition of mineral and organic parts of enamel samples in a well-defined manner. The degree of mineralization (phosphate: total amide ratio) did not significantly change as a function of exposure time (Fig. 3), indicating that the mineral and organic parts were lost at the same time and at the same rate during the acid exposure, maintaining the mineral: total amide ratio relatively constant. With respect to the mineral part, the acid exposure time was positively correlated with a_{1030} values (peak area corresponding to highly crystalline phosphate) and negatively correlated with a_{985} values (peak area corresponding to poorly crystalline phosphate), indicating that phosphate from poorly crystalline/amorphous environments is preferentially and selectively removed by the diluted acid solution during the demineralization process. The percentage of carbonate in the mineral (CO_3^{2-} min) was also negatively correlated with the exposure time indicating that carbonate-rich mineral

components are also preferentially and selectively removed by the acid attack.

The composition of the organic matrix, characterized by the area of absorption peaks associated with different amide bands also changed in a well-defined manner during the course of the acid exposure. A positive correlation was found between the peak area of amide I groups (ν_{1660}) and acid exposure time and a negative correlation between the peak area of the band at 1460 cm^{-1} and acid exposure time, indicating that the organic components contributing to the band at 1460 cm^{-1} are preferentially lost, while the matrix becomes enriched in amide I groups. No significant change was observed in the position of the amide I band, indicating that the conformation and denaturalization of the proteins were not modified.

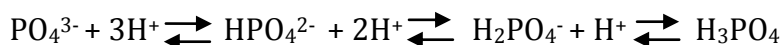
Discussion

This study showed, using AA and FTIR spectrometry, that poorly crystalline phosphate and carbonate-rich mineral linked to hydrophobic groups in the organic matrix was preferentially removed by phosphoric acid etching and was presumably the main source of calcium released by acid exposure.

Powdered enamel was used for this study because it is a more homogeneous material in comparison to bulk enamel and offers a substantially higher surface area for exposure to the acid. By this means, we avoided the dilution effect encountered with the analysis of bulk samples, in which only the outer accessible surface is exposed to the acid. We studied bovine teeth, which are reported to be a reliable substitute for human teeth in research (8,9,10) and whose enamel was shown by SEM studies to have a similar morphology to that of human tooth enamel after etching with 35% H_3PO_4 (9). Nevertheless, due caution should be taken in extrapolating results from bovine to human teeth.

Our absorption atomic spectrometry data showed that the amount of Ca^{2+} mobilized by the phosphoric acid treatment rapidly increased during the first 5 min of exposure and then

became constant. These findings indicate that the Ca^{2+} component of the mineral part of the enamel is mainly dissolved by the acid during the initial stages of phosphoric acid exposure. The saturation of Ca^{2+} removal rates results from the capacity of phosphate minerals (11) to neutralize acid according to the following chemical equilibrium for dissolved phosphate species:



Phosphate ions released from the enamel mineral neutralize the acid in solution and slow down the removal of Ca^{2+} .

FTIR analysis directly and simultaneously yields quantitative information on the molecular constituents of the mineral and organic parts of the enamel with no need for costly and time-consuming separation or extraction techniques (12). FTIR also has the potential to provide important structural data on the configuration of the mineral and organic matter (13). Our FTIR studies showed that poorly crystalline and carbonate-rich mineral is preferentially removed from enamel and is presumably the main source of Ca^{2+} released by acid exposure. The selective removal of these mineral components can be explained by the dissolution of outer layers of apatite crystals, which are thought to be rich in poorly crystalline phosphate and in carbonate. These components are more exposed to acid attack and are more reactive and easier to dissolve (14,15). In contrast, the inner part of apatite crystals is formed by more crystalline apatite, which is more resistant to the acid attack and remains in the enamel.

.Our FTIR data also show that the relative area of the peak at 1460 cm^{-1} decreased with shorter exposures to phosphoric acid (Fig. 6), suggesting that the associated organic components are preferentially removed during acid exposure. The main contributors to this band are CN and CH groups from proteins and lipids (13,16); these components are associated with proteins of the amelogenin family, which are rich in proline amino acids and hydrophobic (3,16). These proteins are distributed in the intercrystalline space and around the enamel crystals (2). Hence, they are more accessible and more easily exposed to the chemical attack, explaining their more ready

removal in comparison to non-amelogenic organic matter (i.e., enamelin), which is more intimately associated with the apatite crystals.

It is known that amelogenins are progressively replaced by enamelin during enamel maturation at the same time as crystals grow and replace water and organic matter. Hence, the effects of etching enamel may differ according to the degree of maturation of enamel, which may have clinical relevance. Amelogenins are known to play an important role during enamel mineralization and are thought to regulate apatite crystal nucleation and growth (17). In fact, they have been applied to facilitate the remineralization of enamel *in vitro* (18). Hence, the selective removal of these components by phosphoric acid attack could decrease the capacity of enamel to be remineralized *in vivo*. Clinical treatment with phosphoric acid etching or the intake of carbonated drinks containing phosphoric acid may not only induce the demineralization of enamel but may also prevent restorative remineralization by saliva. At any rate, it is of great importance to know the capacity of chemical agents used in clinical treatments to remove specific organic or mineral components of enamel and matter and to determine their effect on protein structure.

Conclusion

Etching with phosphoric acid produces a non-homogenous remineralization of bovine enamel, with the selective removal of poorly crystalline mineral and hydrophobic organic components. The loss of calcium decreases after the first 5 min of phosphoric acid treatment due to the capacity of dissolved phosphate species to neutralize acid. Further research is required to confirm these findings and their clinical implications.

References

1. Lowenstam H, Weiner S. *On Biomineralization*. New York. Oxford University Press, 1989.
2. Fattibene P, Carosi A, De Coste V, Sacchetti A, Nucara A, Postorino P, Dore P. A comparative EPR, infrared and raman study of natural and deproteinated tooth enamel and dentin. *Phys Med Biol* 2005; 50: 1095-108.
3. Nanci A. Ten Cate A. R. *Ten Cate's. Oral histology: Development, structure and function*. 6a Ed. St Louis: Mosby, 2003.
4. Yagi N, Ohta N, Matsuo T, Tanaka T, Terada Y, Kamasaka H, To-o K, Kometani T, Kuriki T. Evaluation of enamel crystallites in subsurface lesion by microbeam X-ray diffraction. *J Synchrotron Radiat* 2009; 16: 398-404.
5. 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: 541-52.
6. Margolis HC, Zhang YP, Lee CY, Kent RL Jr, Moreno EC. Kinetics of enamel demineralization in vitro. *J Dent Res* 1999; 78: 1326-35.
7. Rodríguez Navarro AB, Romanek CS, Alvarez Lloret P, Gaines KF. Effect of in ovo exposure to PCBs and Hg on clapper rail bone mineral chemistry from a contaminated Salt Marsh in Coastal Georgia. *Env Sci & Tech* 2006; 40: 4936-42.

8. Ruse ND, Smith CC, Torneck CD, Titley KC. Preliminary surface analysis of etched, bleached, and normal bovine enamel. *J Dent Res* 1990; 69: 1610-13.
9. 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: 117-21.
10. Sanches RP, Otani C, Damiaõ AJ, Miyakawa W. AFM characterization of bovine enamel and dentine after acid-etching. *Micron* 2009; 40: 502-6.
11. Stumm W, Morgan JJ. *Aquatic chemistry: an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. 2a ed. Toronto : Wiley-Interscience, 1981.
12. Colthup NB, Daly LH, Wiberley SE. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. 3rd Ed. New York : Academic Press, 1990.
13. Jackson M, Mantsch HH. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30: 95-120.
14. Cazalbou S, Combes C, Eichert D, Rey C, Glimcher MJ. Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo. *J Bone Miner Metab* 2004; 22: 310-7.
15. Rey M, Tyuterev VG. Adiabatic and non-adiabatic corrections to rovibrational energies of diatomic molecules: variational calculations with experimental accuracy. *Phys Chem Chem Phys* 2007; 9: 2538-48.

16. Jodaikin A, Weiner S, Perl-Treves D, Termine J D, Traub W. Developing enamel matrix proteins: a conformation study of enamelin and amelogenin. *Int J Biol Macromol* 1987; 9: 166-8.
17. Iijima M, Moradian-Oldak J. Control of apatite crystal growth in a fluoride containing amelogenin-rich matrix. *Biomaterials* 2005; 26: 1595-603.
18. Fan Y, Sun Z, Moradian-Oldak J. Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials* 2009; 30: 478-83.

Figure Captions and Tables:

Figure 1. Accumulative amounts of Ca^{2+} extracted from enamel powder by the exposure to diluted phosphoric acid for increasing time intervals.

Figure 2. Infrared spectrum of the sample of enamel in the region between $1700\text{-}800\text{ cm}^{-1}$.

Figure 3. Mineralization degree as a function of time of treatment with phosphoric acid.

Figure 4. Relative area of peak at 954 cm^{-1} associated with poorly crystalline phosphate. It decreases with the duration of treatment with phosphoric acid.

Figure 5. Carbonate in mineral as a function of time of treatment with phosphoric acid.

Figure 6. Relative area of peak at 1460 cm^{-1} associated with poorly crystalline phosphate as a function of the duration of treatment with phosphoric acid.

Table 1. Spectral assignment of IR spectra in control enamel.

Table 2. Correlation analyses of different enamel properties (inferred from FTIR) with time of treatment.

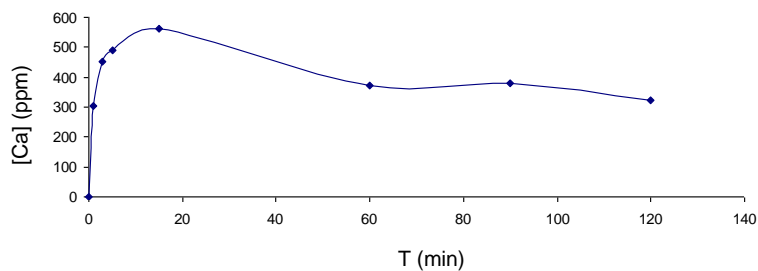


Figure 1. Accumulative amounts of Ca^{2+} extracted from enamel powder by the exposure to diluted phosphoric acid for increasing time intervals.

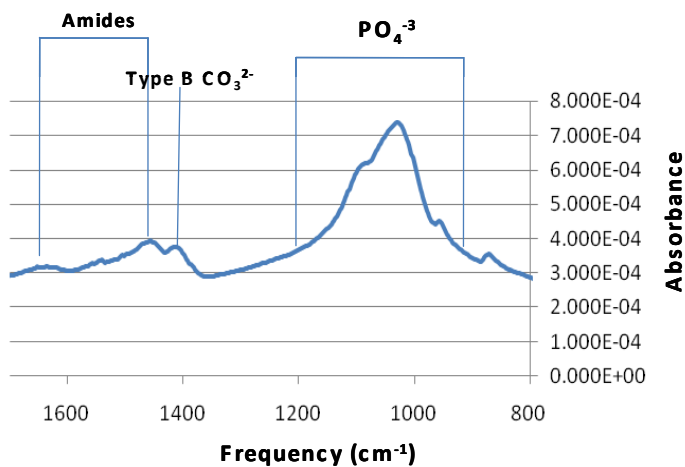


Figure 2. Infrared spectrum of the sample of enamel in the region between 1700-800 cm^{-1} .

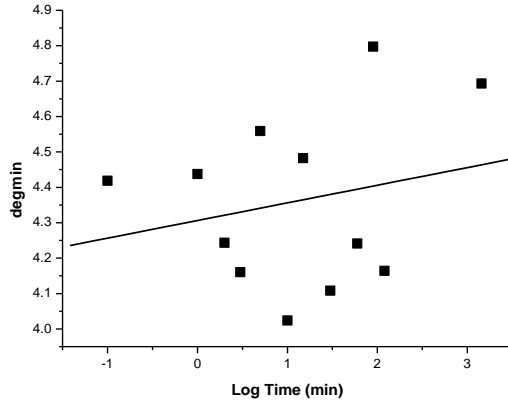


Figure 3. Mineralization degree as a function of time of treatment with phosphoric acid.

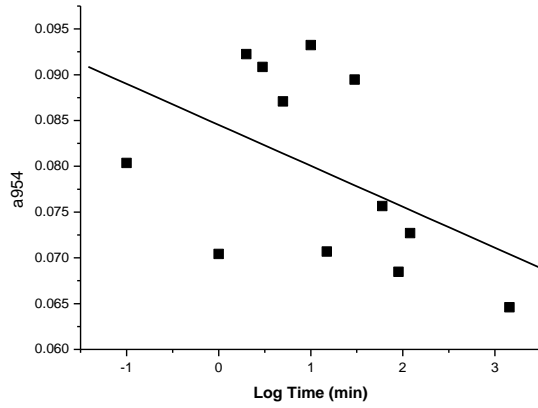


Figure 4. Relative area of peak at 954 cm^{-1} associated with poorly crystalline phosphate. It decreases with the duration of treatment with phosphoric acid.

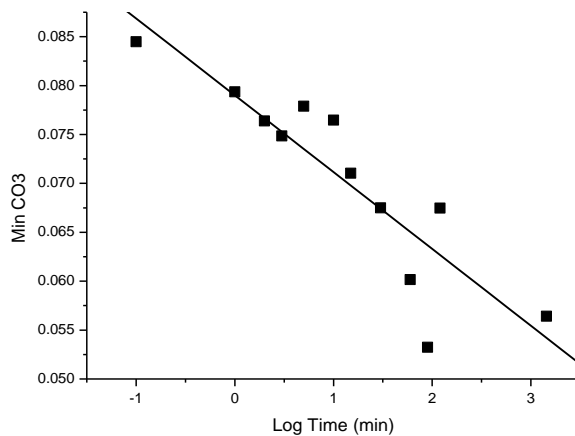


Figure 5. Carbonate in mineral as a function of time of treatment with phosphoric acid.

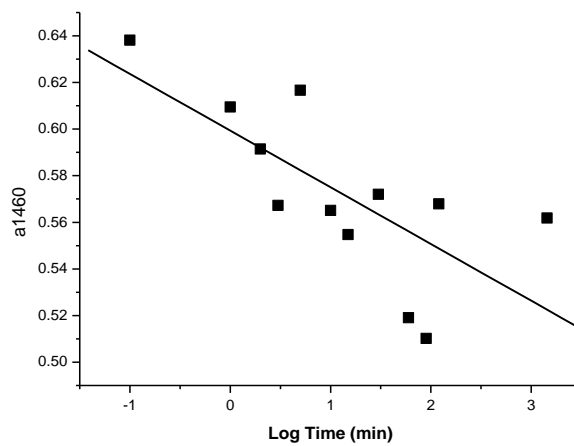


Figure 6. Relative area of peak at 1460 cm⁻¹ associated with poorly crystalline phosphate as a function of the duration of treatment with phosphoric acid.

Nº	Enamel frequency (cm ⁻¹)	Definitions of spectral assignment
1	3570-3450	Intramolecular H bonding
2	3500-3300	Amide A (protein N-H stretching)
3	1637	Amide I (protein C=O stretch)
4	1544	Amide II (protein N-H bend, C-N stretch), ν_3 CO ₃ ²⁻ (mineral)
5 - 7	1200-900	ν_1, ν_3 PO ₄ ³⁻ stretching (mineral)
8	1410	Type-B CO ₃ ²⁻ (mineral)
9-10	1460	C-N, C-H from proteins and lipids

Table 1. Spectral assignment of IR spectra in control enamel

Log Time (min)			
	R	P	N
Deg. Min.	0.226	0.479	12
Min CO ₃ ²⁻	-0.887	0.000**	12
a1460	-0.661	0.019*	12
a1550	-0.092	0.775	12
a1660	0.665	0.018*	12
a1030	0.81	0.001*	12
a1058	0.336	0.285	12
a1099	-0.544	0.067*	12
a1145	-0.028	0.932	12
a1001	-0.489	0.106	12
a954	-0.471	0.121	12

Table 2. Correlation analyses of different enamel properties (inferred from FTIR) with time of treatment. Deg. Min. = degree of mineralization, R = values of Pearson correlation coefficients, differences at $p < 0.05$ are highlighted in bold, N = number of samples.

ANEXO B

1. MEMORIA FINAL DE LA ESTANCIA BREVE

CENTRO DE LA ESTANCIA BREVE:

Nombre del Organismo: UNIVERSIDAD DE ZURICH	
Centro: FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, CLINICA DE PREVENTIVA, PERIODONTOLOGIA Y CARIOLOGIA	
Ciudad: ZURICH	País: SUIZA
Investigador responsable de la estancia: THOMAS ATTIN	
Cargo/categoría: PROF. DR. (DIRECTOR)	

DURACIÓN DE LA ESTANCIA BREVE O TRASLADO:

Periodo de traslado en el centro extranjero: Fecha inicio: 1 junio 2009 Fecha fin: 31 agosto 2009

MEMORIA:

TÍTULO DEL PROYECTO DE TESIS: Efectos microquímicos del peróxido de hidrógeno de alta concentración y el ácido fosfórico sobre la capa superficial - subsuperficial del esmalte bovino.

INTRODUCCIÓN

Muchos pacientes necesitan tratamientos odontológicos y estéticos que combinan el blanqueamiento y la colocación de materiales restaurativos.

El agente blanqueador, como por ejemplo el peróxido de hidrógeno, genera alteraciones de la estructura química y de las propiedades físico- mecánicas debido a la pérdida de minerales como calcio y fosfatos, carbonato y la desnaturalización de las proteínas de su matriz orgánica. A su vez, sí este esmalte alterado se acondiciona para un proceso de adhesión con ácido fosfórico, se aumenta la pérdida del contenido de calcio, fosfatos y carbonatos, disminuyendo adicionalmente la fuerza de unión de los materiales restauradores al esmalte.

Hemos comprobado los efectos del peróxido de hidrógeno y/o el ácido fosfórico a través de nuestros ensayos realizados mediante análisis microquímico en la Universidad de Granada y hemos coincidido con los resultados obtenidos por diversos autores. Los daños se limitan principalmente en la capa superficial del esmalte (hasta 50 micras) a pesar de que se conoce que el peróxido de hidrógeno tiene una alta capacidad de difusión a través de todo su espesor.

Es por esto que nos planteamos la elaboración y el desarrollo de un protocolo de remineralización con el fin de conocer los efectos de la saliva y de los agentes antioxidantes sobre la estructura microquímica del esmalte afectado debido a procesos de desmineralización por peróxido de hidrógeno y ácido fosfórico.

Este ensayo fue desarrollado parcialmente durante mi estancia en el Laboratorio de Investigación Departamento PPK y con el grupo de investigación del Profesor Thomas Attin, que tiene una amplia trayectoria investigativa en procesos y protocolos de remineralización.

Con los resultados de estos estudios podríamos plantearnos posibles propuestas de moléculas blanqueadoras de baja capacidad de difusión, diseñar protocolos clínicos cíclicos y productos químicos que ayuden en los procesos de remineralización.

OBJETIVOS

General

Estudiar el efecto de agentes remineralizantes y/o antioxidantes como coadyudantes en la remineralización de esmalte bovino tratado con peróxido de hidrógeno y ácido fosfórico.

Específicos

Estudiar el efecto de saliva sobre esmalte bovino tratado con ácido fosfórico y/o peróxido de hidrógeno en la composición y microestructura utilizando técnicas IR y FTIR.

Estudiar el efecto de 2 antioxidantes ascorbato de sodio y catalasa sobre esmalte tratado con ácido fosfórico y/o peróxido de hidrógeno en la composición y microestructura del esmalte bovino utilizando técnicas IR y FTIR.

MATERIALES Y METODOS.

Obtención de los especímenes: Se hizo exodoncia de 160 dientes anteriores superiores bovinos. Después de la remoción de tejido blando y lavado con agua destilada fueron almacenados en solución salina que contenía cristales de timol a 4°C. De la superficie vestibular de cada diente, se obtuvo un espécimen cilíndrico de esmalte de 5 mm de diámetro.

Montaje: cada espécimen fue montado en resina acrílica STYCAST dejando 1,5 mm de la superficie vestibular de esmalte libre. Los bordes fueron aislados con esmalte de uñas, dejando únicamente la superficie para interactuar con el ácido.

Tratamiento de la superficie: los 160 especímenes fueron divididos en 4 grupos para el tratamiento de desmineralización. Grupo 1: sin tratamiento (N=40), grupo 2: tratamiento con ácido fosfórico al 37% durante 30 segundos (N=40), grupo 3: tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% durante 20 minutos (N=40), grupo 4 tratamiento

con peróxido de hidrógeno al 30% durante 20 minutos y ácido fosfórico al 37% durante 30 segundos. Cada grupo de tratamiento (N=40) fue dividido en 4 subgrupos y se sometieron a 4 diferentes tratamientos de remineralización. Tratamiento 1: sin tratamiento (N=10), tratamiento 2: saliva artificial a 37°C (N=10), tratamiento 3: ascorbato de sodio al 10% durante 1 minuto, lavado con agua destilada, secado durante 1 minuto y almacenaje en saliva artificial a 37°C, tratamiento 4: catalasa 10 mg/mL durante 1 minuto, lavado con agua destilada, secado durante 1 minuto y almacenaje con saliva artificial a 37°C. Cuando se terminaron los tratamientos de remineralización los especímenes fueron lavados con agua destilada y almacenados a 4°C.

Recolección del polvo de esmalte: finalmente la superficie tratada de cada espécimen fue desgastado mediante una técnica especial usando tiras de lija de diamante tratadas previamente con ácido perclórico al 3% durante 8 horas para eliminar las trazas de fluoruro. Después de secar las tiras de lija fueron eliminadas las capas superficiales de esmalte (50 micras) de cada espécimen, con un aparato especial que permitió controlar el espesor del esmalte desgastado. Se uso una tira de lija por cada espécimen. El polvo de esmalte fue colectado, almacenado y rotulado en Eppendorf.

Los polvos de esmalte fueron trasladados al Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada para fabricación de las pastillas y análisis por IR-FTIR.

CRONOGRAMA

1. Rediseño y reestructuración del protocolo de experimentación, implementando otras técnicas de tratamiento y de desgaste de esmalte desmineralizado y remineralizado.
2. Adquisición de maxilares superiores bovinos, exodoncia de los dientes anteriores, limpieza ó debridación, corte y pulpectomía.
3. Almacenaje a 4°C.
4. Entrenamiento y corte de cada diente en el micrótopo.
5. Entrenamiento en la máquina y obtención de 200 cilindros de esmalte, con las mismas dimensiones en diámetro.

6. Control de calidad a través del microscopio óptico.
7. Confección de 3 moldes en silicona para realizar un montaje diario de 25 especímenes.
8. Montaje de 200 especímenes en resina acrílica.
9. Aislamiento de la parte lateral de cada espécimen con esmalte de uñas.
10. Aplicación del tratamiento de desmineralización y remineralización continua a 160 muestras.
11. Entrenamiento con la máquina de desgaste para la obtención de polvo.
12. Preparación de 160 tiras de lija en ácido perclórico al 3% durante 8 horas.
13. Obtención y recolección de 160 muestras en polvo de esmalte con tratamiento.
14. Rotulación y empaque.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Klimek J, Hellwing E, Ahrens G.** Fluoride taken up by plaque, by the underlying enamel and by clean enamel from three fluoride compounds in vitro. *Caries Research* 1982, Vol. 16, págs. 156-61.
2. **Lai S.C.N, Mak Y.F, Cheung G.S.P, Osorio R, Toledano M, Carvarlho R.M, Tay F.R, Pashley D.H.** Reversal of compromised bonding to oxidized etched dentin. *J Den Res* 2001, Vol. 10, págs. 1919-1924.
3. **Rotstein, CD.** Role of Catalase in the elimination of residual hydrogen peroxide following tooth bleaching. *Journal of Endodontics* 1993 Vol. 19 (11) págs. 567-569.
4. **Muraguchi K, Shigenobu S, Suzuki S, Tanaka T.** Improvement of bonding to bleached bovine tooth surfaces by ascorbic acid treatment. *Dental Materials Journal* 2007 Vol. 26(6) págs. 875-881.

NOTA

Los resultados de este ensayo se encuentran en análisis estadístico en el Departamento de Petrología y Mineralogía, Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y serán reflejados en una publicación.

