

**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN  
MECÁNICA  
DEL ESMALTE TRATADO  
CON PERÓXIDO DE  
HIDRÓGENO  
A ALTA CONCENTRACIÓN**

ISABEL GIRÁLDEZ DE LUIS

Madrid 2014



Universidad  
Rey Juan Carlos



Universidad  
Rey Juan Carlos

Caracterización mecánica del esmalte  
tratado con peróxido de hidrógeno  
a alta concentración

Isabel Giráldez de Luis

Madrid, 2014

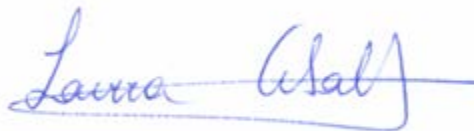


LAURA CEBALLOS GARCÍA, PROFESORA TITULAR DEL  
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA Y ENFERMERÍA DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD REY  
JUAN CARLOS

CERTIFICA:

Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada:  
“CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DEL ESMALTE TRATADO CON PERÓXIDO  
DE HIDRÓGENO A ALTA CONCENTRACIÓN” presentada por Dña. Isabel  
Giráldez de Luis, han sido realizados bajo mi codirección y supervisión,  
reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación  
para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste donde proceda, firmo la presente en Alcorcón  
(Madrid) a de 2014



Fdo.: Profa. Laura Ceballos García



MIGUEL ÁNGEL GARRIDO MANEIRO, PROFESOR TITULAR DEL  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE LOS MATERIALES DE LA  
ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS EXPERIMENTALES Y  
TECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS

CERTIFICA:

Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada:  
“CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DEL ESMALTE TRATADO CON PERÓXIDO  
DE HIDRÓGENO A ALTA CONCENTRACIÓN” presentada por Dña. Isabel  
Giráldez de Luis, han sido realizados bajo mi codirección y supervisión,  
reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación  
para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste donde proceda, firmo la presente en Alcorcón  
(Madrid) a de 2014



Fdo.: Prof. Miguel Ángel Garrido Maneiro



“Nadie ha cometido un error mayor que el que no hizo nada porque sólo podía hacer poco”.  
Edmund Burke

## Agradecimientos

A mi directora la Dra. Laura Ceballos, que me ha enseñado tanto en lo profesional como en lo personal y que siempre tendrá un lugar especial en mi corazón.

Al Departamento de Ingeniería de los Materiales de Móstoles, en especial a mi codirector el Dr. Miguel Ángel Garrido, por tener una paciencia infinita y acompañarme en tantas horas de laboratorio.

A todos mis compañeros de la Unidad de PTD, en especial a la Dra. Nuria Escribano que siempre me ha ofrecido su consejo y su cariño.

A mis padres, por inculcarme la perseverancia, trabajo y compañerismo, a ellos les debo todo lo que soy.

A María, mi hermana, mi apoyo y eterna compañera de viaje.

A Jaime, por hablar cuando hacen falta palabras y guardar silencio cuando no.

A mis amigos, que nunca dudaron en que este día llegaría.





*a Gal·la*





# ÍNDICE



<b>I. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>15</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>21</b>
<b>2.1. COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DEL ESMALTE</b>	<b>23</b>
2.1.1. AMELOGÉNESIS	24
2.1.2. MATRIZ INORGÁNICA	25
2.1.3. MATRIZ ORGÁNICA	26
2.1.4. AGUA	31
2.1.5. UNIDAD ESTRUCTURAL BÁSICA DEL ESMALTE	31
2.1.6. ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DEL ESMALTE	36
2.1.6.1. Estrías transversales	36
2.1.6.2. Estrías de Retzius	37
2.1.6.3. Penachos adamantinos o de Linderer	37
2.1.6.4. Bandas de Hunter-Schreger	38
2.1.6.5. Esmalte nudoso	38
2.1.6.6. Husos adamantinos	39
2.1.6.7. Periquematías y líneas de imbricación de Pickerill	39
2.1.6.8. Línea neonatal	40
2.1.6.9. Laminillas o microfisuras del esmalte	40
2.1.6.10. Microfisuras primarias	41
2.1.6.11. Microfisuras secundarias	41
<b>2.2. PROPIEDADES DEL ESMALTE</b>	<b>42</b>
2.2.1. DUREZA	43
2.2.2. MÓDULO DE ELASTICIDAD	47
2.2.3. TENACIDAD DE FRACTURA	50
2.2.4. COLOR Y TRANSLUCIDEZ	52
2.2.5. PERMEABILIDAD	52
2.2.6. RADIOPACIDAD	53
<b>2.3. BLANQUEAMIENTO DENTAL</b>	<b>53</b>
2.3.1. COMPONENTES DE LOS GELES DE BLANQUEAMIENTO	56
2.3.2. MECANISMO DE ACCIÓN DEL BLANQUEAMIENTO DENTAL	60
2.3.3. EFECTOS DEL BLANQUEAMIENTO SOBRE EL ESMALTE	65

2.3.4. EFECTOS DEL BLANQUEAMIENTO SOBRE LA ADHESIÓN DE LOS MATERIALES DE RESTAURACIÓN AL ESMALTE	74
2.3.5. EFECTOS DEL BLANQUEAMIENTO SOBRE LA PULPA: SENSIBILIDAD DENTARIA	76
2.3.6. OTROS EFECTOS SECUNDARIOS DEL BLANQUEAMIENTO	78
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>79</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>83</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>87</b>
5.1. MATERIAL	89
5.2. MÉTODOS EXPERIMENTALES	90
5.2.1. ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN DE LA TOPOGRAFÍA Y MORFOLOGÍA SUPERFICIAL DEL ESMALTE	92
5.2.2. ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO MECÁNICO DEL ESMALTE	96
5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	127
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>129</b>
6.1. EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AL 38% EN LA TOPOGRAFÍA SUPERFICIAL DEL ESMALTE	131
6.2. EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AL 38% EN EL COMPORTAMIENTO MECÁNICO DEL ESMALTE	141
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>153</b>
7.1. CAMBIOS EN LA TOPOGRAFÍA SUPERFICIAL DEL ESMALTE EXPUESTO A PEROXIDO DE HIDRÓGENO AL 38%	155
7.2. CAMBIOS EN EL COMPORTAMIENTO MECÁNICO DEL ESMALTE EXPUESTO A PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AL 38%	161
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>175</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>179</b>
<b>10. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA</b>	<b>213</b>



# JUSTIFICACIÓN





En los últimos años, la estética es uno de los valores que imperan en nuestra sociedad.

En lo que a la apariencia bucodental atañe, el blanqueamiento ha supuesto una solución para la eliminación de determinadas discromías como las generadas por agentes químicos, tratamientos con tetraciclinas y oscurecimiento por envejecimiento.

El blanqueamiento obtiene resultados rápidos y predecibles. El procedimiento clínico depende, en gran medida, del origen de la discromía así como del grado de coloración de partida de los dientes, de manera que ambos determinan los tiempos de aplicación.

Una de las características del blanqueamiento que más demandan los pacientes es obtener resultados en poco tiempo.

Muchas casas comerciales y odontólogos han aprovechado esta demanda para aumentar la concentración del agente activo del blanqueamiento, el peróxido de hidrógeno, hasta alcanzar un 40%. Estas concentraciones permiten al odontólogo realizar el tratamiento en consulta en una o dos sesiones, obteniendo resultados más rápidos, lo que revierte en un incremento de las ganancias.

Como contrapartida, el aumento de la concentración del agente blanqueante podría implicar daños permanentes en la estructura dentaria. Muchos investigadores han realizado estudios sobre los cambios en la microestructura, en el comportamiento químico y mecánico del esmalte tras la exposición al peróxido de hidrógeno a altas concentraciones obteniendo resultados en los que la alteración del esmalte queda reflejada.

Las principales técnicas utilizadas en estos trabajos han sido el microscopio electrónico de barrido para constatar los cambios en la composición química y la topografía del esmalte, así como los ensayos de microdureza para evidenciar la disminución de su resistencia a la indentación o deformación.

Sin embargo, la incorporación de ensayos más novedosos y precisos, como es el microscopio de fuerzas atómicas y la nanoindentación, permitiría un mejor conocimiento de dichas propiedades, así como evaluar otras, tal y como la rugosidad superficial, el módulo de elasticidad y la tenacidad de fractura.

Por último, dado que las alteraciones producidas por el blanqueamiento van reduciéndose tras su aplicación, será relevante su caracterización a distintos tiempos.



# INTRODUCCIÓN



## **2.1. COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DEL ESMALTE**

La función más importante de los dientes es triturar los alimentos, es por ello que su estructura y composición debe estar diseñada para soportar las fuerzas masticatorias. Por esta razón, el diente se encuentra recubierto por una envoltura denominada esmalte, cuyo espesor varía según su localización a lo largo del eje longitudinal del diente, alcanzando su valor máximo en el borde incisal y en las cúspides, desde donde va disminuyendo hacia la línea cervical.

El esmalte es el tejido más duro del organismo, es de origen ectodérmico y cubre la corona anatómica del diente. Estructuralmente está constituido por cristales de hidroxiapatita que se encuentran unidos entre sí mediante una interfase proteínica. Es por tanto, un tejido epitelial que se caracteriza por presentar una estructura organizada en niveles jerárquicos de complejidad creciente.

En lo que se refiere a su composición química, el esmalte está compuesto por una matriz inorgánica (95%), por una matriz orgánica (1-2%), y agua (3-5%) (Bhaskar, 2000; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009). Esto le permite tener una elevada resistencia al desgaste y, sin embargo, poca capacidad para soportar fuerzas de compresión sin que se produzca daño. Por tanto, el esmalte requiere de la dentina, que se caracteriza por tener menor módulo de elasticidad y dureza pero mayor ductilidad. De esta manera, el diente en su conjunto es capaz de soportar las sollicitaciones a las que va a estar sometido sin fallo.

A pesar de ser un tejido altamente mineralizado, el esmalte está dotado de cierta porosidad y permeabilidad, permitiendo un gradiente de fluidos entre la pulpa y el medio oral. Esta permeabilidad es selectiva, ya que

permite el paso de agua e iones y evita el paso de moléculas de mayor tamaño (Oktar, 2007; Yeau-Ren y cols., 2011)

### **2.1.1. AMELOGÉNESIS**

La amelogénesis es el mecanismo de formación del esmalte. Dicho mecanismo se produce en dos etapas. En la primera se elabora la matriz orgánica extracelular, y en la segunda, tiene lugar un proceso de mineralización casi inmediato. La etapa de mineralización es regulada por un conjunto de células, denominadas ameloblastos, que se diferencian a partir del epitelio interno del órgano del esmalte, alcanzando un alto grado de especialización (Bhaskar, 2000; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

En dicho proceso de mineralización, los ameloblastos atraviesan por una serie de fases en las que sufren cambios estructurales, citoquímicos y ultraestructurales.

1. Fase presecretora: los ameloblastos se diferencian, adquieren el fenotipo, cambian la polaridad, desarrollan el mecanismo de síntesis de proteínas (tuftelina, sialofosfoproteína dentinaria y ATPasa dependiente del calcio) y se preparan para secretar la matriz orgánica.
2. Fase secretora: los ameloblastos elaboran y organizan un tejido altamente ordenado, constituyendo una estructura de soporte a modo de andamiaje.

Los ameloblastos, tras completar la formación del esmalte involucionan y desaparecen durante la erupción dentaria, no existiendo crecimiento ni nueva aposición de esmalte después de la misma.

## 2.1.2. MATRIZ INORGÁNICA

Está constituida por sales minerales cálcicas de fosfato y carbonato (hidroxiapatita carbonatada). Dichas sales se depositan en la matriz del esmalte dando lugar a un proceso de cristalización transformando la masa mineral en cristales de hidroxiapatita cuya composición química es  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , aunque en realidad los distintos elementos que forman parte de su composición se encuentran en forma iónica (Bachmann, Craievich y Zzell, 2004).

Los cristales de hidroxiapatita presentan una morfología hexagonal alargada cuando se seccionan perpendicularmente al eje longitudinal del cristal y una morfología rectangular cuando se cortan paralelamente al mismo eje. Sus dimensiones oscilan entre los 30-70nm de espesor, 100-1000nm de longitud y una altura de 10-40nm (Fu-Zhai y Jun, 2007). (Figura 1).

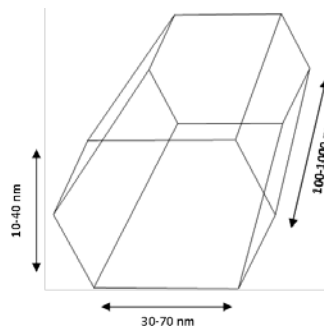


Figura 1. Esquema tridimensional de un cristal de hidroxiapatita



Los cristales de hidroxiapatita están constituidos por la agregación de celdillas unitarias, que son las unidades básicas de asociación iónica de las sales minerales (Bhaskar, 2000; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

Estas celdillas unitarias asociadas, que conforman el cristal, poseen una configuración química y cristalográfica hexagonal, en cuyos vértices existen iones calcio y en cuyo centro se localiza un ión hidroxilo. Además, dispuesto en la periferia del hidroxilo, existe un grupo de iones calcio. A su vez, entre los iones de calcio que ocupan los vértices del hexágono extremo se localizan los iones fosfatos (Figura 2). (Bhaskar, 2000; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

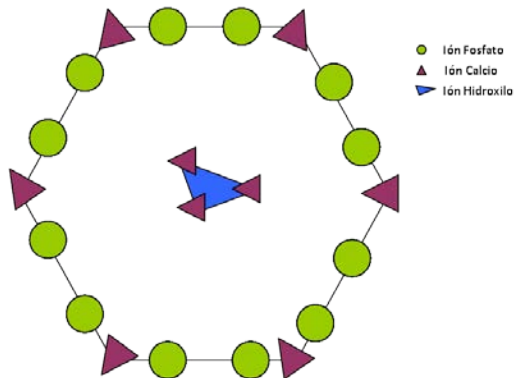


Figura 2. Esquema de la disposición de los iones en el cristal de hidroxiapatita.

Esta disposición permite que se pueda producir un intercambio entre iones de los cristales e iones del medio, pudiendo dar lugar a una sustitución de iones  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y los iones  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{OH}^-$  por  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (Bachmann Craievich y Zezell, 2004).

Esto hace que la apatita dental pueda tener un exceso de iones como  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{HPO}_4$  y, que a su vez, tenga demanda de iones  $\text{OH}^-$ . Estas pequeñas imperfecciones hacen que la apatita sea soluble, permitiendo ser depósito y fuente de iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Así, un exceso de iones carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) puede sustituir a los iones  $\text{OH}^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  a medida que es captado en la superficie de los cristales. Ello hace que aumente la capacidad de disolución del mineral (Bachmann Craievich y Zzell, 2004).

Por el contrario, la incorporación de fosfato incrementa el tamaño y consecuentemente reduce la solubilidad de los cristales de apatita en el medio. Los iones  $\text{F}^-$  pueden sustituir a los grupos hidroxilo en una proporción 1 cada 40 en el cristal de hidroxiapatita y convertirlo en un cristal de fluorhidroxiapatita que lo hace más resistente a la acción de los ácidos. El contenido del flúor en el esmalte varía en función de factores biológicos como el contenido del flúor en el agua bebida o en los alimentos. Generalmente, se presenta en grandes concentraciones en las  $50\mu\text{m}$  más superficiales del esmalte, disminuyendo hasta 20 veces su concentración en las zonas más profundas (Davis, 1986).

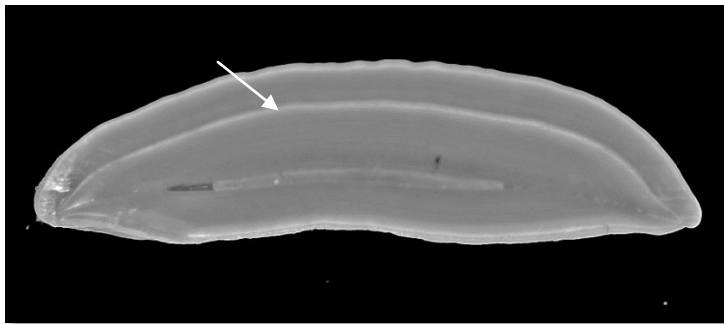
Estas sustituciones modifican la red cristalina propia de la apatita, lo que conlleva una alteración del tamaño cristalino, de la tasa de disolución y de otras propiedades como la dureza y estabilidad térmica (Bachmann Craievich y Zzell, 2004).

Estos cristales de hidroxiapatita se unen entre sí, a través de una retícula o matriz polimérica, para formar una estructura más compleja, denominada prisma y que constituye la unidad estructural básica del esmalte.

El conjunto de prismas del esmalte forma el denominado esmalte prismático que constituye la mayor parte de esta matriz extracelular

mineralizada. En la periferia de la corona y en la unión amelodentinaria existe el denominado esmalte aprismático en el que la sustancia adamantina mineralizada no constituye ni configura prismas.

Los millones de prismas altamente mineralizados recorren todo el espesor del esmalte, desde la unión amelodentinaria (Figura 3) a la superficie externa o libre.



**Figura 3.** Corte sagital de incisivo bovino en el que se observa la unión amelodentinaria.

### **2.1.3. MATRIZ ORGÁNICA**

La matriz orgánica está constituida fundamentalmente por agua, lípidos y proteínas mediante una compleja red de multiagregados polipéptidos ricos en prolina, glutámico, histidina, leucina y glicina. Su misión principal es la de permitir la unión de los cristales de hidroxiapatita.

Las proteínas, que son el principal componente de esta matriz orgánica, se pueden agrupar en dos categorías: amelogeninas y no amelogeninas.

Las proteínas denominadas amelogeninas constituyen el 90% de la matriz orgánica. Son moléculas hidrofóbicas, fosforiladas y glicosiladas de 5 a

45kDa, ricas en prolina, glutámico, histidina y leucina. Son las más abundantes al comenzar la amelogenénesis y disminuyen progresivamente a medida que madura el esmalte. Son segregadas por los ameloblastos y constituyen la estructura primaria del esmalte (Jodaikin y cols., 1987; Zalzal, Smith y Nanci, 2008).

Las amelogeninas se localizan entre los cristales de hidroxiapatita sin estar ligadas a ellos. La formación de la matriz orgánica del esmalte ocurre de forma simultánea al crecimiento y la maduración de los cristales de apatita. Se cree que la maduración de las amelogeninas es uno de los factores clave en el control del crecimiento cristalino (He y Swain, 2008). Estas proteínas son las encargadas de controlar la morfología, organizar los cristales para garantizar el soporte físico y regular el espesor del esmalte. De manera que el crecimiento de los cristales corre a cargo de las proteínas amelogeninas (Finchman, Moradian-Oldak y Simmer, 1999).

Las proteínas clasificadas como no amelogeninas son las enamelinas, las ameloblastinas o amelinas y la tuftelina.

Las enamelinas son moléculas hidrofílicas glicosiladas, con un peso molecular de 70kDa, se caracterizan por su naturaleza ácida al ser ricas en ácido glutámico, ácido aspártico, serina y glicina. Se localizan en la periferia de los prismas del esmalte, formando las proteínas de cubierta y no se liberan hasta que los cristales se disuelven. Representan el 2-3% de la matriz orgánica del esmalte. Este tipo de proteínas se expresa durante el desarrollo del esmalte en la fase secretora desde la unión amelodentinaria hacia la superficie (Thesleff y cols., 1995).

Las ameloblastinas se localizan en las capas más superficiales del esmalte y en la periferia de los cristales. Son las glicoproteínas más abundantes de las

proteínas no amelogeninas y representan el 5% del componente orgánico. Su presencia es más abundante en la fase secretora de los ameloblastos y empiezan a disminuir en la fase de maduración. Constituyen un elemento fundamental para la diferenciación de los ameloblastos dentro de la fase de secreción y para la adhesión celular (Finchman, Moradian-Oldak y Simmer, 1999).

Las amelinas forman agregados supramoleculares llamados nanoesferas que rodean los cristales por su eje axial, siendo visibles mediante microscopio electrónico. Dichas nanoesferas organizan la microestructura de la matriz creando espacios iniciales de 20nm entre los cristales e impidiendo que se fusionen lateralmente (He y Swain, 2008).

La última de las proteínas no amelogeninas, denominada tuftelina, pesa 50-70kDa y se localiza en la zona de la unión amelodentinaria al comienzo del proceso de formación del esmalte. Es la encargada de la nucleación de los cristales del esmalte durante la biomineralización. Histológicamente se muestra como fallas que forman bandas sinuosas de fibras en la unión amelodentinaria y representa el 1-2% del componente orgánico (Finchman, Moradian-Oldak y Simmer, 1999).

Aunque la cantidad de componente orgánico presente en el esmalte es mínima en comparación con el contenido mineral, el efecto en sus propiedades mecánicas es bastante importante. En primer lugar, dicha interfase define planos tridimensionales que permiten desviar las grietas lateralmente y así evitar que éstas avancen directamente a través de esmalte, aumentando de esta manera la energía necesaria para su propagación. En segundo lugar, su presencia limita el movimiento diferencial entre los cristales adyacentes garantizando su integridad estructural (White, Luo y Pine, 2001).

#### **2.1.4. AGUA**

Es el tercer componente de la composición química del esmalte. Se localiza en la periferia del cristal constituyendo la denominada capa de hidratación, o capa de agua adsorbida. Por debajo y más hacia el interior, en el cristal, se ubica la denominada capa de iones y compuestos adsorbidos, en la que el catión  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser sustituido por  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , el catión  $\text{H}_3\text{O}^+$  y el anión  $\text{OH}^-$  por  $\text{F}^-$  y  $\text{Cl}^-$ . El porcentaje de agua en el esmalte disminuye progresivamente con la edad (Bhaskar, 2000; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

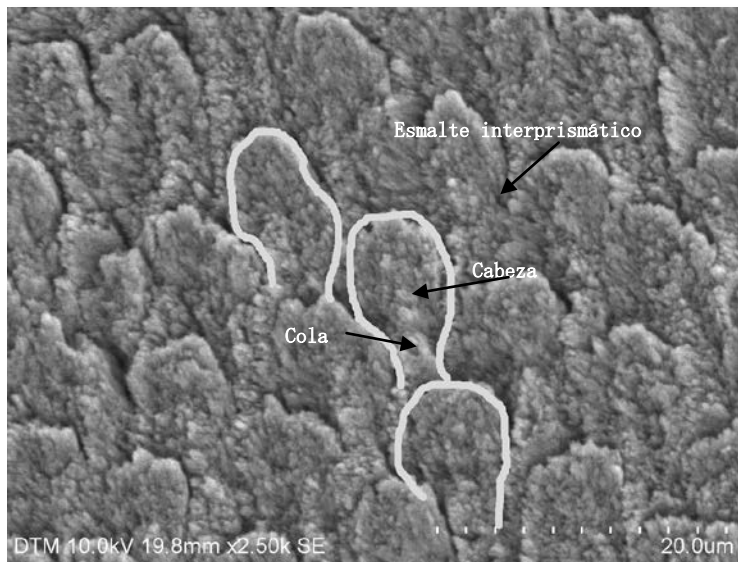
#### **2.1.5. UNIDAD ESTRUCTURAL BÁSICA DEL ESMALTE**

La unidad estructural básica son los prismas de esmalte, estructuras compuestas por cristales de hidroxiapatita que se organizan entre sí gracias a la red de interfase proteínica.

El diámetro de un prisma varía entre 4-10 $\mu\text{m}$ , siendo menor en su punto de origen y aumentando gradualmente a medida que se acerca a la superficie libre. La concentración de prismas en el esmalte varía entre 5 y 12 millones dependiendo del tamaño de la corona (Bhaskar, 2000; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

El prisma del esmalte presenta un diseño hexagonal en forma de “ojo de cerradura” en el que se pueden distinguir dos regiones: la “cabeza”, en forma esférica que se estrecha a nivel medio y que vuelve a ensancharse constituyendo la segunda región denominada “cola del prisma”, con terminación irregular (Figura 4). Sin embargo, en los cortes histológicos transversales es usual que dichos prismas presenten una morfología hexagonal irregular, ovoide o en forma de “escamas de pescado”, como

consecuencia de la distinta inclinación del plano de corte con respecto al eje longitudinal de los prismas. Este fenómeno se puede observar mediante microscopio electrónico de barrido (MEB) (Figura 5). En cambio, en cortes longitudinales, el aspecto es de bastones irregularmente paralelos. Esta morfología se debe a la diferente orientación que tienen los numerosos cristales de hidroxiapatita que forman cada prisma (He y Swain, 2008; He y Swain 2009).



**Figura 4. Disposición de los prismas del esmalte.**

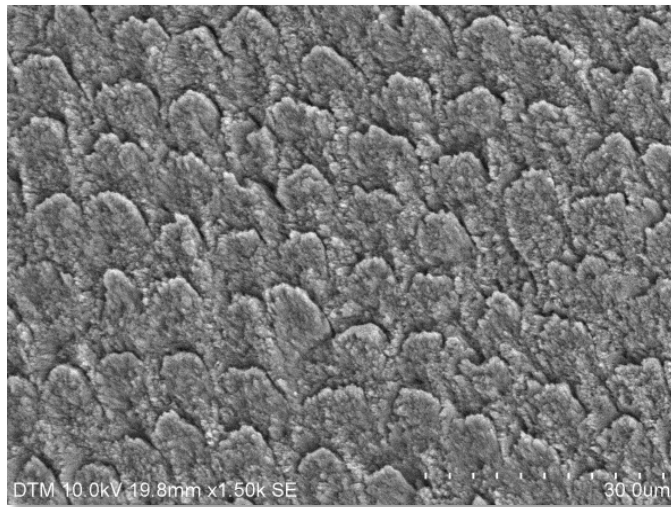


Figura 5. Imagen de MEB en la que se muestra la estructura en “escama de pescado” del esmalte.

La cabeza corresponde a la región más ancha del prisma con  $5\mu\text{m}$  de longitud ofreciendo un contorno circular irregular u ovoideo (Figura 6) (He y Swain, 2008).

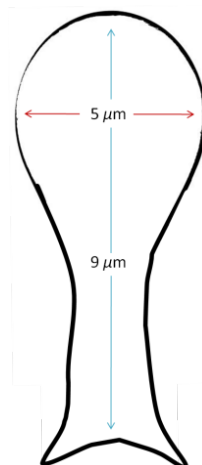
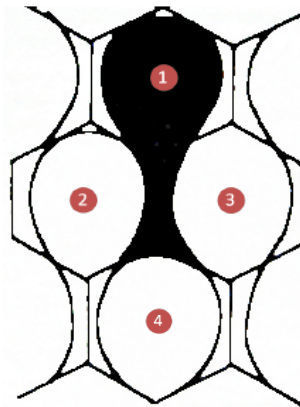


Figura 6. Dimensiones de la cabeza y la cola de un prisma de esmalte.

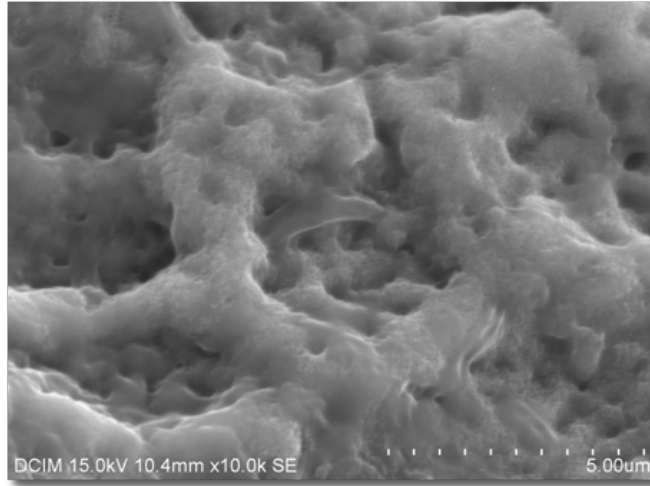


Las células encargadas de la formación y organización del esmalte, es decir, los ameloblastos, son los responsables de esta morfología tan característica y de que los prismas se encuentren estrechamente ligados entre sí (Figura 7). Un ameloblasto forma la cabeza del prisma (número 1 en la Figura 7), una porción de otros dos ameloblastos forma el cuello (números 2 y 3 en la Figura 7) y el cuarto ameloblasto forma la cola del prisma (número 4 en la Figura 7).



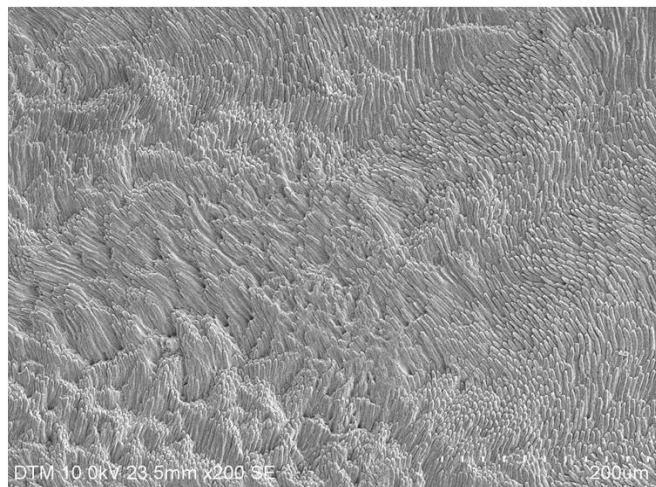
**Figura 7. Diagrama con disposición de un prisma formado por cuatro ameloblastos (hexágonos numerados).**

De esta manera, el material orgánico se localiza fundamentalmente en la periferia de la cabeza y cola de los prismas contribuyendo de manera decisiva en la formación de la estructura en ojo de cerradura, tal y como se muestra en la Figura 8.



**Figura 8. Detalle de la vaina de los prismas de esmalte observados con MEB.**

La orientación de los prismas no sigue una trayectoria rectilínea a través del espesor del esmalte, sino que experimentan una trayectoria sinuosa con entrecruzamientos (Figura 9). Desde la superficie de la dentina hacia la superficie externa del diente, los prismas se organizan en planos circunferenciales alrededor del eje mayor del diente (Habelitz y cols., 2001).



**Figura 9. Imagen con MEB de un corte longitudinal del esmalte en el que se muestra el curso sinuoso de los prismas.**

En los anillos circunferenciales de los prismas que configuran el esmalte, cada uno de los prismas ofrece un transcurso ondulante tanto en el plano transversal como en el longitudinal (Figura 4) (Braly y cols., 2007).

Finalmente, cabe destacar la presencia del esmalte aprismático que se localiza en la superficie externa del esmalte prismático y, como su propio nombre indica, consiste en un material adamantino carente de prismas.

### **2.1.6. ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DEL ESMALTE**

Las unidades secundarias se definen como aquellas estructuras o variaciones estructurales que se originan a partir de las unidades estructurales primarias como resultado de varios mecanismos: el diferente grado de mineralización; el cambio en el recorrido de los prismas; y la interrelación entre el esmalte y la dentina subyacente o la periferia medioambiental. Entre las unidades que surgen por el primer mecanismo encontramos las estrías de Retzius y los penachos de Linderer; entre las que surgen por el segundo las bandas de Hunter-Schreger y el esmalte nudoso y, entre las que lo hacen por el tercero, la unión amelodentinaria, los husos adamantinos, las periquematías, las líneas de imbricación de Pickerill y las fisuras o surcos del esmalte. Algunas unidades estructurales secundarias como las laminillas o microfisuras del esmalte se originan como resultado de varios de los mecanismos anteriormente descritos.

#### **2.1.6.1. Estrías transversales:**

Son estriaciones periódicas que se muestran a intervalos de 2,5 a 7 $\mu$ m coincidiendo con la velocidad diaria de formación del esmalte. Cruzan los

prismas formando un ángulo recto con sus ejes longitudinales y son visibles en cortes histológicos (Smith, 2006).

#### **2.1.6.2. Estrías de Retzius:**

Son series de bandas oscuras de color parduzco (con luz transmitida) o claras (con luz reflejada) que siguen un trayecto oblicuo a través del esmalte desde la unión amelodentinaria hasta la superficie. Entre ellas existen intervalos de 20 a 80 $\mu$ m, siendo más numerosas en la región cervical. Existe una estría más sobresaliente que las demás, y que coincide con el nacimiento, llamada línea neonatal (línea Rushton-Orban) (Smith, 2006).

Se considera que las estrías de Retzius corresponden a líneas de incremento que marcan la aposición de capas de tejido durante la formación de la corona a intervalos de aproximadamente 8-9 días (Reid y Ferrell, 2006).

La disposición de las estrías es diferente en las distintas regiones del diente. En los bordes incisales y en las cúspides se extienden desde la unión amelodentinaria a la unión amelodentinaria del lado opuesto. En las caras laterales de la corona, se extienden de forma oblicua desde la unión amelodentinaria hacia la superficie externa con un ligero arqueado hacia oclusal o incisal. En cortes transversales, las estrías de Retzius aparecen como anillos concéntricos.

#### **2.1.6.3. Penachos adamantinos o de Linderer:**

Sólo se observan en la zona más cercana al límite amelodentinario en intervalos de aproximadamente 100 $\mu$ m. Son estructuras muy semejantes a

las microfisuras del esmalte. Cada penacho tiene una anchura equivalente a varios prismas. Se despliegan desde el límite amelodentinario en forma de arbusto, correspondiendo a zonas de prismas menos mineralizadas, conteniendo por tanto más contenido orgánico que el resto del esmalte. Se forman durante el desarrollo del diente, debido a cambios bruscos en la dirección de grupos de prismas localizados en distintas regiones del límite amelodentinario (Bhaskar, 2000; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

#### **2.1.6.4. Bandas de Hunter-Schreger:**

Los prismas del esmalte se inclinan tanto hacia la unión amelodentinaria como hacia la superficie del esmalte formando ángulos inferiores a 90°. Su orientación refleja los movimientos de los ameloblastos durante la formación del esmalte. Su trayectoria cambiante da lugar a unas bandas claras y otras oscuras alternantes, de anchura variable (aproximadamente 50 $\mu$ m) y límites imprecisos, denominadas respectivamente parazonas y diazonas (Osborn, 1990).

En la zona más externa del esmalte, estas bandas están ausentes debido a que los prismas a este nivel se alinean en paralelo. Además, en los bordes incisales y cúspides, el esmalte puede presentar áreas con marcadas decusaciones de los prismas, observándose una estructura conocida como esmalte nudoso.

#### **2.1.6.5. Esmalte nudoso:**

Se localiza en las regiones de las cúspides dentarias y bordes incisales. Está formado por una compleja interrelación de los prismas adamantinos.

Esta configuración se debe al entrecruzamiento de los planos circunferenciales de los prismas con sus ondulaciones. Este hecho hace que el esmalte sea más resistente en las zonas más expuestas a la acción masticatoria (Bhaskar, 2000; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

#### **2.1.6.6. Husos adamantinos:**

Son estructuras cilíndricas con forma de bastón que se extienden desde la dentina penetrando de 10 a 40 $\mu$ m en el esmalte.

Corresponden a formaciones tubulares con fondo ciego que alojan en su interior las prolongaciones de los odontoblastos que discurren por los túbulos dentinarios.

La penetración de las prolongaciones de los odontoblastos en los husos del esmalte se realiza previamente a la mineralización del mismo, ubicándose y persistiendo en el interior del esmalte cuando éste se mineraliza.

Su orientación es similar a la del proceso odontoblástico del que provienen y no guardan relación con los prismas vecinos, son perpendiculares a la unión amelodentinaria y oblicuos respecto a los prismas (Bhaskar, 2000; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

#### **2.1.6.7. Periquematías y líneas de imbricación de Pickerill:**

Entre los surcos, la superficie del esmalte forma unos rodetes, crestas bajas o rebordes transversales, denominadas periquematías. Son más marcadas en los dientes permanentes recién erupcionados y tienen tendencia a desaparecer con la edad debido al desgaste fisiológico.

Las líneas de imbricación son surcos poco profundos existentes en la superficie del esmalte, generalmente en el tercio cervical de la corona. Están íntimamente relacionadas con las estrías de Retzius y con el medio oral (Bhaskar, 2000; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

#### **2.1.6.8. Línea neonatal:**

La alteración que supone el nacimiento determina la formación de una estría muy marcada denominada línea neonatal. Estas líneas se observan en todos los dientes que se están formando en el momento del nacimiento, por lo que pueden verse en todos los dientes temporales y en los primeros molares permanentes (Bhaskar, 2000; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

#### **2.1.6.9. Laminillas o microfisuras del esmalte:**

Se extienden en longitudes variables dentro del espesor del esmalte desde la superficie externa de éste, atravesándolo en su totalidad la mayoría de las veces.

Las microfisuras o grietas del esmalte están presentes en el 80% de los incisivos centrales de ambas arcadas. Se organizan, en general, según las direcciones principales de tensión de la estructura del esmalte. Se ha demostrado que en las laminillas hay paso de fluido a su través en ambas direcciones (Hodson, 1953).

Se forman por la mineralización incompleta de grupos de prismas que pueden provocar la aparición de grietas en el esmalte (durante el

desarrollo o después de la erupción) en las que se acumula material orgánico.

Existen dos tipos de clasificación de las microfisuras. Una primera clasificación divide las microfisuras en primarias y secundarias, mientras que la segunda clasificación las divide en tipo A, B y C.

**2.1.6.IO. Microfisuras primarias:**

Se producen en el diente antes de la erupción. Están constituidas bien por matriz del esmalte no mineralizada o bien por células que proceden del órgano del esmalte (Smith, 2006).

**2.1.6.II. Microfisuras secundarias:**

También denominadas laminillas posteruptivas; se generan básicamente por traumas y cambios rápidos de temperatura. Debido a que el coeficiente de expansión térmica lineal del esmalte es el doble que el de la dentina, cualquier cambio brusco de temperatura origina deformaciones térmicas muy diferentes en el esmalte y en la dentina, lo que puede producir la generación de microgrietas en la interfase de unión entre ambas (Smith, 2006).

○ **Tipo A:**

Se forman antes de la erupción siendo más numerosas en la zona cervical de la corona; son zonas hipomineralizadas, determinadas por segmentos de prismas poco mineralizados (Smith, 2006).



○ **Tipo B:**

Se forman antes de la erupción, pero son zonas sin esmalte, ocupadas por células degeneradas. Sus paredes están formadas por esmalte de mineralización normal o levemente hipomineralizado, pudiendo llegar a atravesar la unión amelodentinaria (Smith, 2006).

○ **Tipo C:**

Se forman después de la erupción dentaria pudiendo atravesar la dentina. Son zonas sin esmalte ocupadas por restos orgánicos provenientes de la saliva (Smith, 2006).

## **2.2. PROPIEDADES DEL ESMALTE**

El conocimiento de las propiedades de los dientes humanos es de suma importancia para entender su función como dispositivo mecánico sometido a procesos de masticación, corte, desgarrado y trituración de los alimentos (Kishen, Ramamurty y Asundi, 2000).

Además, conocer a fondo las propiedades del esmalte, puede aportar información sobre las alteraciones que determinados tratamientos, empleados en consulta y fuera de ella, generan en su estructura y, por tanto, en su comportamiento (Spears, 1997; Kinney y cols., 1999; Cuy y cols., 2002).

A continuación, se hace una breve descripción de las propiedades más relevantes del esmalte.

## 2.2.1. DUREZA

Como ya se ha descrito anteriormente, la función más importante de los dientes es triturar los alimentos, de ahí que el esmalte constituye la estructura más dura del cuerpo humano, capaz de soportar las fuerzas de la masticación.

La dureza es una propiedad mecánica de los materiales determinada por la resistencia superficial que oponen a ser rayados o sufrir deformaciones permanentes en su superficie mediante la penetración de una punta o indentador (Malzbender, 2003).

El ensayo para determinar la dureza recibe el nombre de acuerdo a la morfología de indentador que utiliza. Puede ser: tipo Brinell (indentador en forma de esfera), Rockwell (indentador en forma de cono), Vickers (indentador piramidal cuadrado con las cuatro caras iguales) y Knoop (indentador piramidal alargado) (Figura 10).

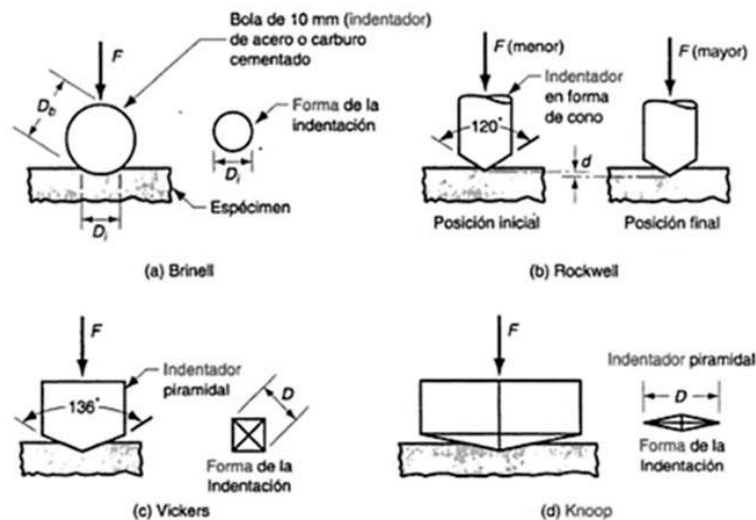


Figura 10. Métodos de ensayo de la dureza: (a) Brinell; (b) Rockwell; (c) Vickers; y (d) Knoop.

El concepto básico empleado es la evaluación de la deformación del material como resultado de la carga normal aplicada sobre su superficie mediante el indentador. Si el material es duro, la indentación será relativamente pequeña o poco profunda mientras que, si el material es blando, la huella del indentador será bastante grande o profunda (Cheng y Cheng, 2004).

Después de aplicar la carga, se mide la huella residual, obteniendo un valor de área residual. El cociente entre la carga aplicada y dicho valor de área, proporciona un valor de dureza.

Estos ensayos suelen clasificarse de dos maneras: o bien según el rango de fuerzas aplicadas o bien según el método de medición empleado. El prefijo “macro” se utiliza para referirse a aquellos ensayos donde la carga es superior a 1kgf; mientras que para el caso de ensayos en una escala “micro”, la carga será inferior a 0.5kgf. Adicionalmente, algunos equipos son capaces de aplicar cargas tan bajas como los 0.01gf y, comúnmente, se refiere a ellos con el prefijo “nano”. Los ensayos Rockwell pertenecen a la escala macro, mientras que los ensayos Knoop se emplean a escala micro. El ensayo Vickers y los tipo Brinell, pueden usarse tanto en rangos micro como macro (Cheng y Cheng, 2004).

En el caso del esmalte, es común recurrir a ensayos de dureza para cuantificar el efecto de diferentes tratamientos clínicos (Sakar-Deliormanli y Güden, 2006; Myoung y cols., 2009; Venasakulchai y cols., 2010; Eimar y cols., 2012; Rivera, Arola y Ossa, 2013).

Dada las dimensiones microestructurales del esmalte, la microindentación ha sido el método más utilizado en los estudios para la determinación de la

dureza mediante los ensayos tipo Vickers y Knoop designadas mediante las siglas HV y HK, respectivamente (Cheng y Cheng, 2004).

La necesidad creciente de caracterizar las propiedades mecánicas a la escala nanométrica ha favorecido el desarrollo del ensayo de nanoindentación instrumentada. En los ensayos de nanoindentación se mide de manera continua la carga aplicada y la profundidad de penetración del indentador en el material durante un ciclo de carga y descarga. El análisis de las curvas de descarga permite determinar el área de contacto entre el indentador y el material ensayado y cuantificar las propiedades mecánicas del material, fundamentalmente dureza y módulo elástico. Se ha convertido en una excelente herramienta para el estudio de las alteraciones microestructurales gracias a que el tamaño de la indentación o huella puede llegar a ser menor que el tamaño de aquella estructura cuyas propiedades se quiere determinar (Habelitz y cols., 2001; Finke y cols., 2001).

Además, al tratarse de un ensayo instrumentado, el área o tamaño de huella de indentación se determina de manera indirecta, con lo que se evita el tener que medirla. Así, en el caso del esmalte, esta técnica permite poder realizar mediciones en la “cola” o la “cabeza” de los prismas (Meredith y cols., 1996; Cuy y cols., 2002; Ge y cols., 2005).

Un gran número de estudios establecen los valores promedios de dureza del esmalte entre 3,1 y 4,7GPa, tal y como se puede observar en la Tabla 1. Esta discrepancia en los valores de dureza puede estar asociada, en muchas ocasiones, a distintas condiciones en los parámetros de ensayo (Cuy y cols., 2002; Oyen, 2006).

**Tabla 1. Valores de dureza (GPa) para el esmalte mediante diferentes métodos de medición.**

Dureza del esmalte a diferentes cargas				
Autores	Superficie	Método de test	Carga empleada	Dureza (GPa)
Habelitz y cols., 2001	Sección longitudinal	Nanoindentación	500 $\mu$ N	3.4 $\pm$ 0.4
	Sección transversal			2.9 $\pm$ 0.4
Marshall y cols., 2002	Sección transversal	Nanoindentación	1500 $\mu$ N	3.2 $\pm$ 0.4
Zantner y cols., 2007	Superficie vestibular	Microindentación	1N	2.4 $\pm$ 0.6
Tantbirojn y cols., 2008	Sección longitudinal	Microindentación	50g	2.9 $\pm$ 0.1
Brauer y cols., 2008	Sección transversal	Nanoindentación	2000 $\mu$ N	4.1 $\pm$ 3.8
Azer y cols., 2009	Superficie vestibular	Nanoindentación	20mN	4.8 $\pm$ 0.3
He y cols., 2010	Superficie vestibular	Microindentación	50g	4.2 $\pm$ 0.1

En la década de los 90, numerosos investigadores modelaron el esmalte considerándolo un material homogéneo (Remizov, Prujansky y Matveevsky, 1991; Willems y cols., 1993). Sin embargo, algunos estudios han obtenido cambios significativos en las propiedades mecánicas del esmalte al variar la localización del ensayo. Por ejemplo, se han observado variaciones apreciables si las mediciones se realizan en la superficie externa del esmalte a nivel cuspídeo o en la subsuperficie. De tal forma que, dichos valores de dureza aumentan de forma continua desde la unión amelodentinaria a la superficie externa adamantina (Park y cols., 2008).

Basándose en que el esmalte es anisótropo, es decir, que el valor de una determinada propiedad depende de la dirección del material en la que se mida, algunos autores establecen que las variaciones de estos valores de dureza son debidas a las diferencias en la estructura y organización cristalográfica (Fong y cols., 2000; Braly y cols., 2007).

Otros autores (Habelitz y cols., 2001; Cuy y cols., 2002) proponen que las variaciones de la dureza y módulo de elasticidad se deben a variaciones químicas locales que se producen en el esmalte. Estas variaciones químicas se producen en el contenido mineral, orgánico y de agua desde la superficie oclusal hasta la unión amelodentinaria. Habelitz y cols., 2001, mostraron que tanto los valores de dureza como de módulo de elasticidad eran más bajos en la zona interprismática que en la cabeza del prisma de esmalte. Estas diferencias en las propiedades mecánicas fueron atribuidas al elevado contenido de tejido orgánico en el área interprismática. Cuy y cols., 2002, apoyaron estos resultados al encontrar una correlación entre la disminución de los valores de módulo de elasticidad y dureza y el contenido de ciertos minerales como  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$ , y  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

### **2.2.2. MÓDULO DE ELASTICIDAD**

La rigidez es una propiedad intrínseca que caracteriza el comportamiento de un material elástico según la dirección en la que se aplica una fuerza. Este comportamiento fue observado y estudiado por el científico inglés Thomas Young. Para un material elástico lineal e isótropo, dicha propiedad queda definida por el módulo de Young o módulo de elasticidad, que resulta ser una constante independiente del esfuerzo, siempre que no exceda un valor máximo denominado límite elástico.

El módulo de elasticidad del esmalte es una propiedad intrínseca que depende de la densidad de sus prismas, del contenido de agua y de la presencia de la fase proteínica. Ha sido considerada una propiedad básica del esmalte por diversos autores a lo largo de décadas y, por tanto, objeto de su estudio y determinación (Meredith y cols., 1996; Habelitz y cols., 2001; Ang, Scholz y Klocke, 2009).

Al igual que la dureza, el valor del módulo de elasticidad del esmalte es muy variable. Debido a su alto contenido mineral, se considera que el esmalte es un tejido friable, con tendencia a las macro y microfracturas. (Bhaskar, 2000; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

Los valores documentados en los diversos estudios varían dependiendo de la técnica empleada y de la dirección de los prismas medida. En general, los valores medios del módulo de elasticidad oscilan entre 72,7 y 87,5GPa cuando las mediciones se realizan en paralelo o perpendiculares al eje de los prismas, respectivamente. Según esta orientación, el módulo de elasticidad es menor en la zona de la cola y en la vaina de los prismas por el mayor contenido en sustancia orgánica. En la Tabla 2 se muestra una comparación de los valores de módulo de elasticidad medidos por diversos investigadores empleando distintas técnicas y sobre diferentes regiones del esmalte.

En dicha tabla se observa que la tendencia general es que el módulo de elasticidad sea mayor en la superficie vestibular del esmalte que en una sección transversal. Además, cuanto menor es la escala de medida, el módulo de elasticidad es mayor, por lo que los ensayos realizados a escala macroscópica obtienen valores inferiores a los que se obtienen a micro o nano escala. Esta variación se cree que es debida a la anisotropía del esmalte (Zhou y Hsiung, 2007; He y Swain, 2008).

**Tabla 2. Módulo de elasticidad (GPa) del esmalte mediante diferentes métodos de medición**

Módulo de elasticidad de diferentes métodos de medición				
Autor (s)	Superficie y región	Método de test	Carga empleada	Módulo de elasticidad (GPa)
Stanford y cols., 1960	Sección transversal	Compresión	***	33 ± 2.1
Craig y cols., 1961	Superficie vestibular	Compresión	***	84.1 ± 6.2
Reich y cols., 1967	Superficie vestibular	Impedancia acústica	***	76.5
Staines y cols., 1981	Superficie vestibular	Indentación esférica	> 800N	83 ± 8
Willems y cols., 1993	Superficie vestibular	Nanoindentación	10mN	90.59 ± 16.13
Xu y cols., 1998	Superficie vestibular	Vickers modificada	1.9N	94 ± 5
	Sección transversal	Indentación		80 ± 4
Poolthong, 1998	Superficie vestibular	Nanoindentación	50 y 150mN	90.79 ± 2.2
	Cúspide			83.83 ± 6.3
Cuy y cols., 2002	Sección transversal	Nanoindentación	Control de profundidad 400 y 800nm	47-120
Ge y cols., 2005	Prisma	Microscopio de fuerzas atómicas (AFM)	1mN	83.4 ± 7.1
	Superficie interprismática		0.3mN	39.5 ± 4.1
He y cols., 2006	Superficie vestibular	Nanoindentación	1 a 450mN	60-100
	Sección transversal			40-80
Braly y cols., 2007	Sección transversal	Nanoindentación	Control de profundidad 200nm	120
Zhou y Hsiung, 2007	Superficie vestibular	Nanoindentación	Control de profundidad 100 a 2000nm	70-104
Azer y cols., 2009	Superficie vestibular	Nanoindentación	20mN	105.2 ± 4.3
Huang y cols., 2010	Superficie vestibular	Nanoindentación	25mN	70.4-89.7



### **2.2.3. TENACIDAD DE FRACTURA:**

La tenacidad de fractura ( $K_{Ic}$ ) es la resistencia que un material presenta a la propagación de una grieta.

De acuerdo con las solicitaciones a las que está sometido el esmalte, conocer el efecto que distintos tratamientos tienen sobre la tenacidad de fractura es de especial interés. Muchos autores han tratado de calcular la tenacidad de fractura del esmalte utilizando diferentes ecuaciones semiempíricas relacionadas con la morfología de las fisuras generadas mediante ensayos de flexión e indentación (Baldassarri, Margolis y Beniash, 2008; Lawn, Evans y Marshall, 2009).

En la actualidad existe cierta discrepancia en el valor de tenacidad de fractura del esmalte (Zheng y cols., 2013). La causa puede estar relacionada con su naturaleza anisótropa, que parece tener una importancia relevante tanto en la generación como en la posterior propagación de las grietas.

La determinación de la tenacidad de fractura ( $K_{Ic}$ ) del esmalte mediante técnicas de indentación, está basada en la medición del tamaño de las grietas generadas durante el ensayo. Se ha tratado de establecer empleando diferentes indentadores y técnicas de análisis de grietas, sin embargo, los valores obtenidos muestran una elevada variabilidad (Tabla 3).

Esto puede deberse por un lado, a la dificultad que se encuentra en la medición de la longitud de las grietas que se generan mediante la indentación y, por otro lado, a la incertidumbre en la forma en la que se desarrolla la grieta durante el ensayo de indentación (Michel y cols., 2006; Chen y Bull, 2006).

De hecho, la morfología final de la grieta generada por la indentación depende, fundamentalmente, de la carga aplicada, la geometría de la punta, la microestructura del material y de sus propiedades mecánicas (Lawn, Evans y Marshall, 1980; Niihara, Morena y Hasselman, 1983).

**Tabla 3. Resumen de ecuaciones empleadas y valores obtenidos (MPa√m) de la tenacidad de fractura para el esmalte.**

Autores	Tenacidad (MPa√m)	Fórmula empleada
Şakar-Deliormanli y Güden, 2006	0.7 MPa√m	$K_{IC} = 0.0154 \left(\frac{E}{HV}\right)^{1/2} \left(\frac{P}{c^{3/2}}\right)$
		$K_{IC} = 0.0095 \left(\frac{E}{HV}\right)^{2/3} \left(\frac{P}{c^{3/2}}\right)$
		$K_{IC} = 0.028 (H_v \alpha^{1/2}) \cdot \left(\frac{E}{HV}\right)^{1/2} \left(\frac{c}{a}\right)^{-1.5}$
Xu y Smith, 1998	1.55 MPa√m	$T = x P / c^{3/2}$
Rizkalla y Jones, 2004	1.37 MPa√m	$K_{IC} = \frac{H_0 \sqrt{a}}{\varphi} \left[ 0.055 \log \left\{ \frac{8.4c}{a} \right\} \left\{ \frac{H_0}{E_\varphi} \right\}^{-0.4} \right]$
Ang, Schulz y Klocke, 2011	0.8-1.5 MPa√m	$K_{I0} = \sqrt{(E/(1 - \nu^2))} \cdot \sigma_{br} \cdot \delta$
Bajaj y Arola, 2009	2.5 MPa√m	$\begin{aligned} & K_I \\ & = \\ & \frac{P}{B \cdot \sqrt{W}} \sqrt{\frac{B+1}{B+1}} (1.69 - 8.01 \alpha + \\ & 12.53 \alpha^2) [MPa m^{0.5}] \end{aligned}$
Bechtle, Habelitz y Klocke, 2010	4.4 MPa√m	$K_{I,II} = \sigma \sqrt{\pi a} F_{I,II}$
Saber-Samandari y Gross, 2009	0.45 MPa√m	$K_{IC} = \psi \left(\frac{E}{H}\right)^{1/2} \left(\frac{P}{c^{3/2}}\right)$
Park y cols., 2008	0.67 MPa√m	$K_C = 0.0084 \left(\frac{E}{HV}\right)^{2/5} \left(\frac{2P}{L}\right) \frac{1}{c^{1/2}}$
Baldassarri, Margolis y Beniash, 2008	0.65-2.5 MPa√m	$K_{IC} = Q_{\sigma 0} \alpha^{1/2}$

#### **2.2.4. COLOR Y TRANSLUCIDEZ**

El esmalte es translúcido. La translucidez puede atribuirse a variaciones en el grado de calcificación y homogeneidad del esmalte. A mayor mineralización, mayor translucidez (Bhaskar, 2000; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009). La presencia de color se debe a la dentina. El color del esmalte, varía entre el blanco-amarillento, en las zonas de menor espesor como la región cervical, a un blanco-grisáceo presente en las cúspides debido a su mayor grosor en esta región. El blanqueamiento genera cambios en el color del esmalte, mientras que en la translucidez parece no haber consenso entre los autores (Ma y cols., 2009; Dietschi, Benbachir y Krejci, 2010; Li y cols., 2010; Ma y cols., 2011; Caneppele, Borges y Torres, 2013).

#### **2.2.5. PERMEABILIDAD**

El esmalte actúa como una membrana semipermeable permitiendo la difusión de agua y de algunos iones presentes en el medio bucal.

Existen vías microscópicas de transporte molecular, en el que el agua actúa como agente transportador de iones en la matriz adamantina (Borggreven, Van Dijk y Driessens, 1980).

Esta permeabilidad se aprovecha en muchos procesos clínicos, como por ejemplo los tratamientos de blanqueamiento ya que permite que el gel de blanqueamiento penetre dentro de los tejidos dentales. En algunos estudios han comprobado que a medida que se incrementa la concentración de peróxido de hidrógeno, la permeabilidad del esmalte y dentina también lo hace. Esto puede generar riesgos puesto que este

aumento de la permeabilidad podría permitir que el gel de blanqueamiento llegue a tejidos más internos como la cámara pulpar (Benetti y cols., 2004; Berger y cols., 2013).

### **2.2.6. RADIOPACIDAD**

La radiopacidad se define como la cualidad de no ser atravesado por los rayos X. En el caso del esmalte es muy alta constituyendo la estructura más radiopaca del organismo humano por su alto grado de mineralización (Bhaskar, 2000; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

### **2.3. BLANQUEAMIENTO DENTAL**

El blanqueamiento dental representa una solución estética para los pacientes que presentan alteraciones del color dentario. El color natural de los dientes depende fundamentalmente de las propiedades de reflexión y transmisión de la luz de los tejidos duros dentales. Este color natural puede verse modificado por alteraciones intrínsecas o extrínsecas de las estructuras que conforman el diente.

Las discromías intrínsecas se deben a cambios en la naturaleza molecular, en la estructura, o en el grosor de la dentina y del esmalte. Las tinciones extrínsecas son superficiales y se producen por el depósito de cromógenos de la dieta y de otros elementos externos sobre la superficie del esmalte o su inclusión en la placa dental (Hattab, Qudeimat y al-Rimawi, 1999).

El diagnóstico de estas discromías dentales es esencial porque su tratamiento adecuado depende totalmente de su etiología. Por tanto, el blanqueamiento estará indicado para las discromías intrínsecas de origen preruptivo como las enfermedades hematológicas y de hígado, uso de tetraciclinas y tinciones por flurosis, o posteruptivas como los traumatismos, el envejecimiento, el tabaquismo, agentes químicos, cambios funcionales y parafuncionales (Minoux y Serfaty, 2008).

El blanqueamiento dental puede realizarse de forma intracoronal en dientes endodonciados (blanqueamiento dental no vital o blanqueamiento interno) o externamente (blanqueamiento dental en dientes vitales o blanqueamiento externo) (Plotino y cols., 2008). A pesar del elevado número de métodos que se han descrito en la literatura para el blanqueamiento externo de dientes vitales, todos ellos se basan en el empleo directo de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o de un precursor, el peróxido de carbamida.

Básicamente, existen tres métodos fundamentales para el blanqueamiento dental en dientes vitales: blanqueamiento en la consulta, blanqueamiento con férula nocturna y supervisión clínica (también llamado blanqueamiento domiciliario), y el uso de productos de blanqueamiento de venta libre (Haywood, 1996; Heymann, 2005).

En la técnica de férula nocturna o domiciliario, generalmente se emplea peróxido de carbamida a una concentración relativamente baja (10% al 18%), lo que corresponde a una concentración de peróxido de hidrógeno del 3% al 7% (Suliman, 2005). Por el contrario, en la técnica de blanqueamiento en consulta, se emplea una concentración más elevada de peróxido de hidrógeno (25% a 40%) durante un período de tiempo más corto (Joiner, 2006).

Existe un uso excesivo de productos blanqueadores sin la supervisión del dentista debido a la gran demanda de la estética dental. Esto ha generado que los pacientes soliciten en las consultas tratamientos de blanqueamiento que acorten tiempos y aumenten los resultados finales. Esto hace que la técnica de blanqueamiento en consulta sea la más requerida.

Aunque el tratamiento blanqueador se considera una terapéutica no destructiva para eliminar las tinciones dentales, el mecanismo por el que se produce el blanqueamiento no se conoce claramente todavía (Joiner, 2007).

Algunos investigadores no han observado ningún efecto deletéreo sobre el esmalte o la dentina después de aplicar altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Suliman y cols., 2004; Lee y cols., 2006; Sa y cols., 2012).

Sin embargo, numerosos estudios (Rodrigues y cols., 2001; Araujo y cols., 2003; Lewinstein y cols., 2004; Basting, Rodrigues y Serra, 2005; Hairul Nizam y cols., 2005) *in vitro* han observado efectos negativos sobre las propiedades físicas, la integridad superficial del esmalte, el color de los materiales restauradores, la vitalidad pulpar y la sensibilidad dentaria. Por tanto, no hay consenso sobre la inocuidad de los agentes blanqueadores sobre el esmalte.

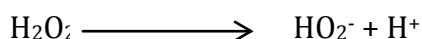
### 2.3.1. COMPONENTES DE LOS GELES DE BLANQUEAMIENTO

#### ~ **Peróxido de Hidrógeno:**

La mayoría de los agentes blanqueadores contienen peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como agente activo, con una concentración que puede variar del 3 al 40%.

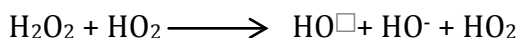
Son varias las reacciones que pueden ser responsables de la eficacia del blanqueamiento, dependiendo de las condiciones ambientales, como temperatura, pH, luz ultravioleta (UV) y presencia de algunos iones (Joiner, 2006).

En condiciones alcalinas, el peróxido de hidrógeno puede sufrir una disociación iónica que da lugar a la formación del anión perhidróxilo (Ecuación 1).



**Ecuación 1. Reacción que ocurre bajo condición alcalina**

El anión perhidróxilo ( $HO_2^-$ ) por sí mismo puede ser un elemento activo en el proceso de blanqueamiento (Korytowski y Sarna, 1990) pero también puede convertirse en un donante de electrones iniciando la formación de radicales libres (Ecuación 2).



**Ecuación 2. Reacción que ocurre bajo condición alcalina donando electrones.**

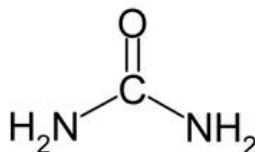
El mecanismo de acción del blanqueamiento se debe a que el peróxido, dado su bajo peso molecular, puede difundir a través del esmalte y de la

dentina. Además, su habilidad para formar radicales libres de oxígeno, hace que puedan interactuar con macromoléculas y pigmentos coloreados que han sido absorbidos, oxidándolos y dividiéndolos en moléculas más pequeñas y decoloradas (Markovic y cols., 2007; Feride y cols., 2008).

El peróxido de hidrógeno, puede cambiar la estructura de la apatita, donde el ión fosfato ( $\text{PO}_4^-$ ) puede ser reemplazado. La otra sustitución coordinada de los ligandos que puede ocurrir en la hidroxiapatita es la formación de complejos metálicos como hierro (Fe) o cuando el  $\text{CO}_3^{2-}$  es reemplazado por el  $\text{OH}^-$  liberado del peróxido de hidrógeno. Se cree que estas sustituciones son débiles y el proceso puede ser reversible gracias a la acción del fluoruro presente en la saliva (Bistey y cols., 2007).

~ **Peróxido de Carbamida:**

El peróxido de carbamida  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$  se descompone, un tercio en peróxido de hidrógeno y dos tercios en urea, cuando entra en contacto con el tejido blando o la saliva a temperatura oral (Ecuación 3). El peróxido de hidrógeno difunde 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 ( $\text{NH}_4^+$ ) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (Haywood y Heymann, 1991; Goldstein y Garber, 1995), lo que contribuyen a la elevación del pH.



**Ecuación 3. Fórmula estructural del peróxido de carbamida.**

La urea es capaz de penetrar dentro del esmalte afectando a la región interprismática. A pesar de que la urea puede contribuir a los cambios



estructurales y de rugosidad del esmalte, también puede tener efectos beneficiosos al descomponerse en amonio y dióxido de carbono, ya que aumenta el pH y controla así la acidez de la placa dental (Price, Sedarous y Hiltz, 2000).

### ~ **Perborato de sodio:**

Este agente blanqueante está disponible en forma de polvo con una concentración del 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 (37%) y oxígeno. Su uso está indicado en el tratamiento de dientes no vitales (Sulieman, 2008; Palo y cols., 2010).

En general, para aumentar la eficacia y eficiencia de los agentes blanqueadores, se suele añadir a su composición ciertas sustancias con fines específicos. De entre todas ellas cabe destacar las siguientes.

### ~ **Agentes aglutinantes:**

*Carbopol (carboxipolipropileno).* El carbopol aumenta la viscosidad del material blanqueador. La naturaleza tixotrópica del carbopol permite una mejor retención del gel en la férula requiriéndose así una menor cantidad de gel en cada aplicación. La viscosidad también mejora la adherencia al diente y evita que la saliva degrade el peróxido de hidrógeno lográndose resultados más eficaces (Soldani, Amaral y Rodrigues, 2010).

Se trata de un polímero del ácido poliacrílico. La tolamina, que es un agente neutralizante, a menudo se añade al carbopol para modificar el pH de los geles a 5-7 (Basting, Rodrigues y Serra, 2005b).

Las soluciones que contienen carbopol liberan oxígeno lentamente, mientras que aquellas que no lo tienen liberan oxígeno con rapidez. Las soluciones que liberan oxígeno rápidamente, lo hacen liberando la máxima cantidad de éste en menos de 1 hora, mientras que las soluciones lentas requieren 2-3 horas para la máxima liberación de oxígeno, pero permanecen activas durante casi 10 horas (Matis BA y cols. 1999).

El carbopol es el agente espesante más utilizado en los sistemas de blanqueamiento y ha demostrado que, por sí mismo, puede causar una disminución en la microdureza del esmalte (Basting, Rodrigues y Serra, 2003).

Algunos estudios sugieren que tanto la pérdida mineral como las alteraciones morfológicas del esmalte podrían estar relacionadas no sólo con la aplicación de peróxidos sino también con los efectos de excipientes como el carbopol (Basting, Rodrigues y Serra, 2003).

~ **Vehículo:**

*Glicerina*. Actúa como una barrera para el efecto desmineralizante del agente blanqueador. Aumenta la viscosidad del producto facilitando su manipulación, no obstante, puede deshidratar el diente (Basting, Rodrigues y Serra, 2005b).

~ **Conservantes:**

Todas las soluciones blanqueantes contienen un conservante, como puede ser la citroxaína, el ácido fosfórico, el ácido cítrico o el estaño sódico (Lyon, Parker y Barnes, 1991). Estos conservantes secuestran metales transicionales como hierro, cobre y magnesio, los cuales aceleran la descomposición de peróxido de hidrógeno. Estas soluciones ácidas brindan

una mayor durabilidad y estabilidad a los geles. Por tanto, tienen un pH ácido moderado (Sensabaugh y Sagel, 2009).

~ **Aromatizantes:**

Los aromatizantes se utilizan en los materiales blanqueantes para aumentar la gama de selección del agente blanqueador y mejorar así la aceptación del producto por parte del paciente (Croissant y cols., 2009).

~ **Desensibilizantes:**

Para disminuir la sensibilidad dental después del procedimiento y remineralizar las posibles lesiones erosivas producidas, muchos de los blanqueamientos incorporan en su formulación nitrato potásico y fluoruro de sodio además de xilitol, fosfato cálcico amorfo – fosfopéptido de la caseína (Adebayo, Burrow y Tyas, 2007; Chen y cols., 2008; Tschoppe y cols., 2009; Basting y cols., 2012).

## 2.3.2. MECANISMO DE ACCIÓN DEL BLANQUEAMIENTO DENTAL

El proceso de blanqueamiento dental es una reacción química de oxidación por la que el material orgánico se transforma en dióxido de carbono y agua, por tanto, el peróxido de hidrógeno actúa como un oxigenador y un oxidante (Joiner, 2006).

El esmalte es una membrana semipermeable. Las soluciones de peróxido fluyen libremente a través del esmalte y la dentina a causa de la porosidad y permeabilidad de estas estructuras. El libre movimiento se debe al peso molecular relativamente bajo de la molécula de peróxido y a la naturaleza penetrante del oxígeno y los radicales libres (Fuhrer, Churaru y Cardash,

2004; Joiner, Thakker y Cooper, 2004; Lewinstein y cols., 2004; Sun y cols., 2011).

Los pigmentos dentales de la dentina están compuestos por macromoléculas de carbono. Mediante oxidación, se modifica el tipo, número y la posición relativa de los átomos que componen estas moléculas, que se dividen a su vez dando lugar a compuestos intermedios. Este proceso continuado de fragmentación de las macromoléculas tiene como consecuencia una pérdida de coloración de los pigmentos naturales de la dentina. Por ello este proceso se denomina blanqueamiento dental (Goldstein y cols., 1989; Rodrigues, Oliveira y Amaral, 2007).

Estos compuestos con cadenas de carbono de longitud intermedia se fragmentan progresivamente hasta su transformación en agua y dióxido de carbono, que se libera gradualmente junto con el oxígeno (Goldstein y cols., 1989).

Se conoce como punto de saturación al momento en el que el blanqueador alcanza su máxima actividad. A partir de ese momento, la acción blanqueadora deja de producirse y el agente blanqueador empieza a actuar sobre otros compuestos que presentan cadenas de carbono, como las proteínas de la matriz del esmalte (Rodrigues, Oliveira y Amaral, 2007).

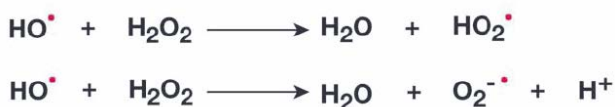
Alguno de los agentes blanqueantes son de activación química pero otros requieren la activación por luz y calor para acelerar la descomposición del peróxido de hidrógeno. La activación por luz se realiza mediante fuentes halógenas, lámparas de arco de plasma (xenón), LED o láser de argón. El calor y las técnicas de blanqueamiento activadas por luz pueden causar potencialmente daño o irritación pulpar (Kashima-Tanaka y cols., 2003; Buchalla y Attin, 2007).

Además de la disociación aniónica, el peróxido de hidrógeno puede sufrir también un fenómeno conocido como fragmentación homolítica (Kashima-Tanaka y cols., 2003). Esta reacción es promovida fundamentalmente por las temperaturas elevadas y por la luz ultravioleta dando lugar a la aparición de un potente agente oxidante denominado radical hidroxilo (HO) (Ecuación 4).



**Ecuación 4. Reacción que sufre el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en presencia de calor o luz ultravioleta.**

Tras ello, se produce una reacción en cadena con los nuevos radicales libres de hidroxilo, pudiéndose formar radicales perhidróxilo (HO<sub>2</sub>) o aniones superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) dependiendo de la reacción que tenga lugar (Ecuación 5) (Poole, 2004).



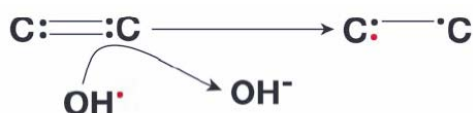
**Ecuación 5. Reacción que sufre el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en presencia de calor o luz ultravioleta.**

Hasta el momento sigue siendo discutible si la activación del blanqueamiento mediante luz o calor aumenta el brillo en comparación con las técnicas que no emplean las fuentes de luz o calor. Por tanto, estos

procedimientos deben ser críticamente ponderados teniendo en cuenta la implicación física, fisiológica y fisiopatológica anteriormente mencionada. Si se aplica una fuente de luz o calor, se deberá seguir rigurosamente las recomendaciones del fabricante con una duración limitada para evitar respuestas pulpares no deseadas (Buchalla y Attin, 2007).

Los radicales libres son muy inestables debido a que contienen uno o más electrones libres en su orbital atómico. Para estabilizar su estructura molecular tienen tendencia a ganar un electrón de un compuesto adyacente. Por tanto, se convierten en fuertes agentes oxidativos. Los dobles enlaces conjugados con átomos de carbono, nitrógeno y oxígeno son poderosos donantes de electrones y representan el principal objetivo de la acción del peróxido. Estos dobles enlaces son esenciales en las moléculas orgánicas que generan el color y que conocemos como cromóforos (Kashima-Tanaka y cols., 2003).

Los radicales libres cambian la energía de absorción de la molécula (Ecuación 6) dificultando la conjugación de electrones de los dobles enlaces. Esto da lugar a una desviación del espectro de absorción visible del compuesto de una longitud de onda más larga a una más corta, conduciendo así a la producción de compuestos menos cromatogénicos (Seghi y Denry, 1992).



**Ecuación 6. Ruptura de los dobles enlaces por los radicales libres. Para estabilizar su estructura molecular, los radicales libres ganan un electrón de los dobles enlaces conjugados. La ruptura resultante de estos dobles enlaces conduce a la producción de moléculas menos cromatogénicas.**

**C: carbono; H: hidrógeno; O: oxígeno. El punto rojo representa los electrones sueltos de los radicales libres.**

No se conoce todavía bien la naturaleza molecular precisa de los cromóforos localizados dentro del diente; por lo tanto en estas moléculas cromatogénicas sólo puede hacerse una extrapolación del mecanismo general de acción del peróxido de hidrógeno (Seghi y Denry, 1992).

La seguridad, efectividad y los efectos secundarios de los productos de blanqueamiento en las estructuras intraorales han sido investigados y muchos de ellos han sido aceptados por la Asociación Americana Dental para el blanqueamiento dental (Li, 1998).

Someter a los dientes y los tejidos bucales a un pH bajo durante un período prolongado de tiempo puede causar efectos secundarios adversos (Titley, Torneck y Ruse, 1992; Price, Sedarous y Hiltz, 2000). Se ha documentado que a mayor concentración de peróxido, más ácido es su pH (Weiger, Kuhn y Lost, 1993). Por tanto, muchos de los blanqueamientos que se administran en consulta que contienen un 35% de peróxido de hidrógeno, poseen un pH bajo (Price, Sedarous y Hiltz, 2000). Cuando el pH cae por debajo de un rango entre 5.2 y 5.8, se puede producir desmineralización en el esmalte y reabsorciones radiculares (Price, Sedarous y Hiltz, 2000).

### **2.3.3. EFECTOS DEL BLANQUEAMIENTO SOBRE EL ESMALTE**

No existe un acuerdo general sobre los efectos de los agentes blanqueadores sobre las estructuras dentales (Joiner, 2007).

La variabilidad de los resultados obtenidos por los diferentes estudios que han analizado los efectos de los productos de blanqueamiento sobre la estructura del esmalte, puede explicarse por la metodología empleada: tipo de dientes, medio de almacenamiento, tiempo de exposición, composición de los agentes de blanqueamiento comercializados, y pH de las soluciones (Lopes y cols., 2002).

Los efectos descritos con más frecuencia son la pérdida del contenido mineral y los cambios en la morfología superficial (McGuckin, Babin y Meyer, 1996; Mccracken y Haywood, 1996; Lippert, Parker y Jandt, 2004; Hanning y cols., 2005; Lee y cols., 2006; Markovic y cols., 2007; Li y cols., 2010; Ogura y cols., 2013), además de la disminución de su dureza (Finke y cols., 2001; Riodrigues y cols., 2001; de Freitas y cols., 2002; Lopes y cols., 2002; Lewinstein y cols., 2004; Joiner, Takker y Cooper, 2004; Fuhrer, Churaru y Cardash, 2004; Jerindroba y Pedrosa, 2007; Maia y cols., 2008; Sunil y cols., 2012; Zuryati, Qian y Dasmawati, 2013).

Se ha demostrado que los radicales libres, además de afectar a las moléculas pigmentadas, pueden afectar también a los lípidos y proteínas que forman parte del contenido orgánico de los tejidos dentales (Hegedus y cols., 1999). De forma detallada, los efectos descritos de los radicales libres son: la pérdida del contenido mineral del esmalte, de calcio, fosfato, potasio, magnesio, flúor y disminución de la relación calcio-fosfato, así como el incremento de las reacciones radicalarias (Lee y cols., 2006; Al-Salehi SK, Wood y Hatton, 2007; Attin y cols., 2007; Tschoppe y cols., 2009).



De ahí que uno de los posibles efectos adversos atribuidos a los productos de blanqueamiento sea la alteración de la composición química del esmalte, la cual sería directamente proporcional a la concentración y tiempo de exposición del agente blanqueador (Cakir y cols., 2011).

Perdigão y cols., (1998), verificaron que el blanqueamiento con peróxido de carbamida al 10% disminuía las concentraciones relativas de calcio y fósforo produciendo alteraciones morfológicas en la mayor parte de los cristales superficiales del esmalte, con puntos de densidad electrónica reducida y disminución del material cristalino.

Sin embargo, Unlü y cols., (2004), comprobaron que la disminución del calcio y de los fosfatos no era significativa. En su estudio expusieron el esmalte a peróxido de carbamida al 10 y 15% durante 28 horas concluyendo que los radicales no generaban una alteración relevante en la composición del esmalte.

En previsión de que las alteraciones en la composición podían estar ligadas a la concentración y tiempo de exposición del agente blanqueador, Tezel y cols., (2007), realizaron un estudio sobre la pérdida de calcio del esmalte tras la aplicación de peróxido de carbamida al 10%, peróxido de hidrógeno al 35% con activación por luz y 38% sin activación con luz. Las medidas las realizaron a los 4, 8, 12 y 16 días desde la exposición al agente blanqueante permaneciendo las muestras durante ese período almacenadas en saliva artificial. Concluyeron que la pérdida de calcio era más significativa cuando se usaba peróxido de hidrógeno al 35% y 38% que cuando se aplicaba peróxido de carbamida al 10%.

En el mismo año, Bistey y cols., (2007), alcanzaron conclusiones similares al analizar los cambios estructurales del esmalte mediante espectroscopía de infrarrojos transformada de Fourier (FTIR) después del tratamiento con

peróxido de hidrógeno al 10%, 20% y 30% por un tiempo de 30, 60 y 120 minutos. Llegaron a la conclusión de que los cambios estructurales irreversibles en la superficie del esmalte podían deberse a las alteraciones en los valores de los niveles de los fosfatos, siendo esta alteración proporcional a la concentración del peróxido de hidrógeno y al tiempo de tratamiento, de manera que la exposición de peróxido de hidrógeno al 30% durante 120 minutos fue la que mostró las alteraciones más severas.

Por otro lado, estos efectos adversos durante el blanqueamiento podrían estar asociados con el pH ácido que presentan los blanqueamientos a elevada concentración de peróxido de hidrógeno (Joiner, 2007; Ren, Amin y Malmstrom, 2009) habiéndose descrito que la adición de pequeñas cantidades de calcio a las soluciones ácidas puede disminuir la pérdida de esmalte hasta en un 50% (Hughes, West y Parker, 2000).

La hidroxiapatita es una sal alcalina, la cual puede incrementar el valor del pH de la solución de peróxido de hidrógeno haciéndola menos ácida. Jiang y cols., (2008a) llegaron a esta conclusión al evaluar en su estudio los efectos de la combinación de hidroxiapatita con el 30% de peróxido de hidrógeno. Las partículas de hidroxiapatita se adherían uniformemente a la superficie del esmalte formando una capa protectora bajo el esmalte aminorando el contacto directo del peróxido de hidrógeno con la superficie del esmalte.

Estas conclusiones fueron ratificadas por Sa y cols., (2012a), que compararon dos geles de blanqueamiento al 30% de peróxido de hidrógeno cuya única diferencia radicaba en el valor del pH, uno neutro y el otro ácido. En su estudio observaron que ambos productos obtenían la misma eficacia blanqueadora pero en el caso del gel con pH ácido la desmineralización sobre el esmalte se hizo patente.

En relación a los cambios morfológicos, la mayoría de los estudios concluyen que los agentes blanqueadores causan modificaciones en la superficie y subsuperficie del esmalte, como poros, cráteres, depresiones, microfracturas y erosión asociada a la desmineralización de la sustancia interprismática e intraprismaática, pérdida de la capa aprismaática de la superficie y desorganización de los cristales (McGuckin, Babin y Meyer, 1992; Cavalli y cols., 2004a; Sulieman y Addy, 2004; Efeoglu, Wood y Efeoglu, 2007; Berger y cols., 2010a; Sun y cols., 2011; Magalhães y cols., 2012; Sa y cols., 2012).

Las alteraciones morfológicas de la superficie del esmalte se han evaluado mediante diferentes técnicas, fundamentalmente mediante MEB y análisis perfilométrico, lo que sumado al uso de diferentes concentraciones hará que no sea fácil extraer conclusiones definitivas de los resultados reportados y que, incluso, sean contradictorios.

Si nos centramos en los geles de blanqueamiento de baja concentración y, por tanto, de uso domiciliario, hay estudios que revelan cambios de la micromorfología del esmalte (Haywood y cols., 1990; Lopes y cols., 2002), tales como la alteración de la rugosidad de la superficial (McGuckin, Babin y Meyer, 1992; Bitter, 1992; Türkun y cols., 2002; Basting y cols., 2005; Sasakiy y cols., 2009; Azrak y cols., 2010), aumento en la profundidad de las grietas (Ernst, Marroquin y Willershausen-Zonnchen, 1996) y aumento no uniforme de la porosidad superficial (Ben-Amar y cols., 1995; Yeh y cols., 2005).

Cavalli y cols., (2004b) realizaron un estudio para determinar si la aplicación de peróxido de carbamida al 10%, 15%, 16% y 20% sobre el esmalte afectaba a su resistencia a la tracción. El análisis con MEB demostró que el esmalte blanqueado presentaba un aspecto más poroso

que el de los especímenes no blanqueados y que el tratamiento parecía atacar preferentemente los límites entre los prismas del esmalte y la sustancia interprismática.

Años más tarde Chen y cols., (2008) llegaron a la misma conclusión tras analizar mediante MEB los cambios en la superficie del esmalte producidos por la exposición de peróxido de carbamida al 10% durante 14 días. El análisis con MEB mostró un esmalte erosionado con depresiones en los núcleos de los prismas.

Contradiendo a los anteriores autores, hay estudios en los que no se obtuvieron resultados relevantes en la variación de la rugosidad superficial del esmalte cuando se aplicó peróxido de carbamida al 10 y 16% (Abouassi, Wolkewitz y Hahn, 2011; Zuryati, Qian y Dasmawati, 2013).

Son escasos los trabajos que analizan la micromorfología del esmalte tras ser sometido a una elevada concentración de peróxido de hidrógeno. De los estudios documentados, se ha determinado que cuando la concentración del peróxido de hidrógeno aumenta al 30%, el efecto nocivo sobre la integridad de la superficie del esmalte aparece con más evidencia.

Tras un análisis mediante AFM de la superficie del esmalte tratado con peróxido de hidrógeno al 30% durante un total de 28 horas, Hegedüs y cols., (1999) concluyeron que el peróxido a esta concentración no sólo afectaba a la estructura superficial sino también a la superficie interna del esmalte debido a su bajo peso molecular y su capacidad oxidativa. La apariencia del esmalte resultó ser más porosa y con la profundidad de los surcos mucho más marcada.

Unos años más tarde, Kwon y cols., (2002) obtuvieron conclusiones similares al observar mediante MEB una superficie no uniforme y más porosa del esmalte tras la aplicación del blanqueamiento con 30% de peróxido de hidrógeno.

Yurdukoru, Akoren y Unsal (2003) lo corroboraron en su estudio cuando aplicaron sobre el esmalte 35% de peróxido de hidrógeno y posteriormente ácido ortofosfórico al 37%. Las imágenes de MEB mostraron un aumento de la irregularidad de la superficie del esmalte que en el esmalte al que sólo se le aplicó el grabado ácido.

Lo mismo sucedió al comparar los efectos en la superficie del esmalte cuando se aplicó peróxido de hidrógeno al 35% a un esmalte previamente tratado con peróxido de carbamida 10% y a otro esmalte al que no se aplicó previamente peróxido de hidrógeno al 10%. El análisis del MEB determinó que en ambos casos aumentó la densidad de la porosidad del esmalte (Spaldin, Taveira y Assis, 2003).

La medición de la microdureza es una de las técnicas más empleadas para medir los posibles efectos del peróxido de hidrógeno sobre el esmalte. La mayoría de los estudios aseguran que la aplicación de peróxido a bajas concentraciones (5-12%) sobre la superficie del esmalte es segura. Así lo confirman experimentos como los de Teixeira y cols., (2004) con la aplicación de peróxido de hidrógeno a una concentración entre 6 y 9.5% durante 30 minutos 2 veces al día durante 14 días, Duschner y cols., (2006) empleando peróxido de hidrógeno al 6% durante 30 minutos 2 veces al día durante 28 días, White y cols., (2002) con peróxido de hidrógeno al 5.3% y al 6.5% administrados 2 horas dos veces al día hasta un total de 70 horas y Pugh y cols., (2005) aplicando peróxido de hidrógeno al 12% durante 7 horas al día durante 14 días.

En cambio, cuando los trabajos hacen referencia a los efectos generados con la aplicación de geles de blanqueamiento de uso en consulta, ponen de manifiesto la disminución de la dureza. Esto posiblemente es debido a procesos de desmineralización o pérdida de contenido mineral de la estructura dentaria externa.

Lewinstein y cols., (2004) realizaron ensayos sobre la superficie de esmalte con la aplicación de peróxido de hidrógeno al 35% y peróxido de carbamida al 35% durante tiempos de 5, 15 y 35 minutos. La disminución de los valores de dureza Knoop para todos los casos fue evidente.

A esta misma conclusión llegó Ulukapi (2007) cuando comparó la modificación de la microdureza del esmalte tras la aplicación de peróxido de carbamida al 10% y peróxido de hidrógeno al 35%. Realizó mediciones en el momento de la aplicación, transcurridas 24, 48, 72 horas y una semana desde la aplicación del blanqueamiento. Se observó una disminución de los valores de microdureza respecto a los obtenidos en control. Transcurrida una semana desde la aplicación del blanqueamiento, los valores de microdureza se recuperaron.

Al-Salehi, Wood y Hatton (2007), evaluaron la pérdida mineral y la microdureza Vickers del esmalte y la dentina bovinos sometidos a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (3%, 10% y 30%) durante 24 horas. Observaron un incremento en la liberación de iones a medida que aumentaba la concentración del gel de blanqueamiento y una disminución significativa de la dureza del esmalte.

Elfallah y Swain (2013), en su estudio de revisión concluyeron que el blanqueamiento a elevada concentración reduce la dureza del esmalte, siendo más evidente cuando se le aplican cargas de baja magnitud. Esta

reducción de la dureza puede deberse tanto a la degradación como a la desnaturalización de la matriz proteínica del esmalte mediante la oxidación generada por el peróxido.

Esta elevada concentración de peróxido de hidrógeno hace que el tiempo de exposición sobre el esmalte deba ser reducido. El análisis mediante MEB que realizaron Berger y cols., (2010a) mostró que tres aplicaciones de 10 minutos cada una de 35% de peróxido de hidrógeno fueron suficientes para alterar la morfología superficial y ocasionar pérdidas de mineral en el esmalte.

Se ha postulado que la aplicación de peróxido de hidrógeno a elevada concentración activado por diferentes tipos de fuentes de luz puede aumentar la disminución de la microdureza del esmalte. Buchalla y Attin (2007) mediante su trabajo de revisión, concluyen que aunque la literatura existente pone de manifiesto que la activación de los agentes de blanqueamiento por calor, luz o láser puede tener un efecto adverso sobre el tejido pulpar debido a un aumento de la temperatura intrapulpar, los estudios disponibles no permiten un juicio final sobre si el blanqueamiento dental puede o bien aumentar o acelerarse por la activación adicional. Años más tarde, Araujo, Baratieri y Araujo (2010) aplicaron en el esmalte peróxido de hidrógeno al 35% con y sin activación con luz. La disminución en la microdureza Knoop del esmalte fue evidente en todos los casos tras la aplicación del gel hasta transcurrida una semana desde su aplicación, pero la activación por luz no influyó en los resultados.

Al igual que sucede con la alteración de la morfología superficial del esmalte, la dureza se ve afectada con la concentración y tiempo de exposición del agente blanqueador. De Abreu y cols., (2011) observaron este hallazgo comparando concentraciones del 7.5% al 38% de peróxido de

hidrógeno con tiempos de exposición de una vez a la semana durante 3 semanas para las concentraciones elevadas y 30 minutos diarios durante 21 días para las bajas concentraciones. La afectación en la dureza Knoop fue evidente en los casos en que se emplearon las concentraciones más elevadas.

También se ha observado que la acidez del peróxido de hidrógeno a elevada concentración puede favorecer un aumento en la pérdida de la microdureza del esmalte. Magalhães y cols., (2012) observaron la influencia en la microdureza Vickers en el esmalte al comparar dos geles blanqueadores con la misma concentración, peróxido de hidrógeno al 35%, durante el mismo tiempo de aplicación, 30 minutos, pero un pH diferente. La microdureza Vickers se vio disminuída en ambos casos siendo algo más acentuada en el gel que presentaba un pH más bajo.

Se ha postulado que los efectos adversos de los productos de blanqueamiento sobre el esmalte y la dentina pueden ser contrarrestados por el potencial remineralizador de la saliva (Shannon y cols., 1993; de Freitas y cols., 2002; Lopes y cols., 2002). La presencia de flúor en algunos productos de blanqueamiento podría conducir también a un efecto de remineralización y, por lo tanto, a un aumento de la microdureza del esmalte durante el tratamiento y el período de postratamiento (Basting, Rodrigues y Serra, 2003; Sulieman y cols., 2004; Basting y cols., 2007; Maia y cols., 2008).

Otros autores han investigado a este respecto añadiendo hidroxiapatita a los geles de blanqueamiento como intento de potenciar la remineralización del tejido dentario. Un ejemplo de ello es el estudio que realizaron Jiang y cols., (2008), en el que evaluaron el efecto de la combinación de hidroxiapatita y peróxido de hidrógeno al 30%, aplicado durante 60



minutos, en el color, microdureza y morfología del esmalte humano. Los valores de microdureza obtenidos en el grupo en el que sólo se aplicó peróxido de hidrógeno al 30% fueron menores respecto al grupo en el que se combinó hidroxiapatita a la solución de peróxido de hidrógeno al 30%. Esto se debió en gran parte a que la hidroxiapatita incrementó el pH del peróxido de hidrógeno de  $\approx 3.2$  hasta  $\approx 5.4$  haciéndolo menos ácido.

### **2.3.4. EFECTOS DEL BLANQUEAMIENTO SOBRE LA ADHESIÓN DE LOS MATERIALES DE RESTAURACIÓN AL ESMALTE.**

Uno de los inconvenientes más conocidos del blanqueamiento es el hecho de que afecta negativamente a la adhesión de los materiales de restauración.

Se ha demostrado que tanto los agentes blanqueadores que incorporan peróxido de carbamida y peróxido de hidrógeno a bajas como los que contienen a altas concentraciones tienen un efecto adverso sobre la fuerza de adhesión al esmalte previamente grabado, siendo mucho más notables en las concentraciones elevadas de peróxido de hidrógeno (García-Godoy y cols., 1993; Kaya y Turkun, 2003; Bulut, Turkun y Kaya, 2006).

La mayoría de los trabajos se han centrado en estudiar el potencial adhesivo entre la resina compuesta y el esmalte blanqueado mediante la evaluación de la resistencia a la microtracción y al cizallamiento de la interfase adhesiva. Los resultados de estas investigaciones revelan que la disminución se produce cuando el procedimiento de adhesión se realiza inmediatamente después del blanqueamiento de dientes vitales e independientemente de la concentración de peróxido de carbamida o de

hidrógeno empleada (Stokes y cols., 1992; García-Godoy y cols., 1993; Titley y cols., 1993; Lai y cols., 2002; Kum y cols., 2004; Attin y cols., 2004).

Normalmente, los productos de blanqueamiento se aplican sobre la superficie exterior del esmalte; sin embargo, como éste es permeable al peróxido de hidrógeno, la aplicación de los productos de blanqueamiento también puede afectar a la dentina. Además, cuando existen retracciones gingivales, los procedimientos restauradores adhesivos pueden realizarse sobre las superficies radiculares que presentan márgenes cervicales en dentina. Al igual que ocurre con el esmalte, también se ha descrito una reducción de la resistencia de la unión adhesiva a la dentina inmediatamente después del blanqueamiento, tanto en la modalidad de blanqueamiento en la consulta como en la de blanqueamiento domiciliario (Spyrides y cols., 2000; Miguel y cols., 2004).

Algunos autores han atribuido la reducción inicial de la resistencia de la adhesión a la inhibición de la polimerización de la resina debida a los radicales residuales de peróxido y/u oxígeno presentes en el esmalte (Titley KC y cols 1993; Can-Karabulut y Karabulut, 2011; Mortazavi, Fathi y Soltani, 2011) o en la dentina, ya que se ha sugerido que la dentina actúa como un reservorio de oxígeno (Titley y cols., 1993).

Otros autores achacan esta reducción en la resistencia adhesiva al efecto de sobregabado cuando se aplica ácido ortofosfórico sobre el esmalte. El blanqueamiento realizado en clínica, aumentaría el poder descalcificante del ácido ortofosfórico dando lugar a pérdidas de la delimitación prismática (Josey y cols., 1996; de Medeiros y cols., 2008).

Titley y cols., (1988), llegaron a la conclusión en su estudio de que los efectos adversos que pueden producirse sobre la resistencia adhesiva

pueden revertirse en el tiempo. Los valores de resistencia adhesiva volverían a niveles normales entre 2 y 3 semanas después del blanqueamiento, tiempo que permite la difusión del peróxido residual de la superficie de esmalte blanqueada hacia el exterior (Torneck y cols., 1990; Titley y cols., 1991; Titley, Torneck y Ruse, 1992; Josey y cols., 1996; Cavalli y cols., 2001; Gurgan y cols., 2009; Barcellos y cols., 2010).

Basándose en estos datos, se recomienda posponer los procedimientos de restauración adhesiva al menos 14 días después del blanqueamiento (Cadenaro y cols., 2006; Can-Karabulut y Karabut, 2011).

### **2.3.5. EFECTOS DEL BLANQUEAMIENTO SOBRE LA PULPA: SENSIBILIDAD DENTARIA.**

La sensibilidad dentinaria es el principal efecto adverso del blanqueamiento de dientes vitales y ha sido reseñado en varios estudios clínicos con diferentes incidencias (Leonard y cols., 2001; Jorgensen y Carroll, 2002; Dawson y cols., 2011; Tay y cols., 2011; Browning, Cho y Deschepper, 2012).

Haywood y cols., (1994), determinaron que el 52% de los pacientes padecían sensibilidad al ser tratados con férula nocturna con peróxido de carbamida al 10% durante 6 semanas.

Con la edad incrementa la deposición de dentina secundaria intratubular dando lugar a una reducción del diámetro de los túbulos dentinarios. Este hecho ha llevado a especular que la aparición de la sensibilidad dentaria como efecto secundario del blanqueamiento puede darse con más facilidad en dientes jóvenes (de Souza y cols., 2010).

La sensibilidad dental se atribuye sobre todo a la penetración del agente blanqueante en la cámara pulpar dando lugar a una pulpitis reversible. Los experimentos *in vitro* han demostrado que el peróxido de hidrógeno, aplicado de forma directa o derivado de la aplicación de peróxido de carbamida, difunde a través del esmalte y la dentina hacia el interior de la cámara pulpar incluso en tiempos de exposición cortos de 15 minutos (Cooper, Bokmeyer y Bowles, 1992; Pugh y cols., 2005).

Aún así, la mayoría de los estudios han reseñado que la sensibilidad dentaria es transitoria y desaparece con el cese del tratamiento o poco después, presentándose la mayor parte de la misma al principio del tratamiento del blanqueamiento, siendo más leve en los tratamientos domiciliarios que en los tratamientos en consulta (Li, 1998; Walsh, 2000; Tredwin y cols., 2006; Basting y cols., 2012).

Sin embargo, cabe destacar que se ha observado que en exposiciones prolongadas de 45 minutos, el peróxido de hidrógeno al 38% puede generar daños irreversibles en la pulpa en incisivos inferiores, aunque este proceso no se observó en premolares, posiblemente debido al mayor espesor de dentina (de Souza y cols., 2010).

Cuando durante el tratamiento de blanqueamiento de dientes vitales se presenta sensibilidad dentaria, se recomienda disminuir la cantidad de solución blanqueante que se administra en la férula, disminuir el número de horas continuas del tratamiento o interrumpir el procedimiento durante unos días (Dawson y cols., 2011). En la actualidad, para mitigar en lo posible este efecto adverso del blanqueamiento, la mayoría de los agentes blanqueadores incluyen en su fórmula agentes desensibilizantes como nitrato potásico, ya que se ha demostrado su eficacia en la reducción de estos síntomas (Basting y cols., 2012).

### **2.3.6. OTROS EFECTOS SECUNDARIOS DEL BLANQUEAMIENTO.**

El peróxido de hidrógeno es un agente químico conocido por su alto poder oxidante. Es a su vez un compuesto inestable que se descompone lentamente, resultando corrosivo y generando irritación en la piel y en las mucosas. Esta reacción se observa cuando la concentración de peróxido de hidrógeno es elevada (10-40% de peróxido de hidrógeno). Por esta razón, la aplicación del producto con estas concentraciones debe ser realizada con aislamiento absoluto y supervisada siempre por un odontólogo siguiendo siempre las instrucciones del fabricante (Auschill y cols., 2005; Tredwin y cols., 2006; Matis y cols., 2009).

Por otro lado, el color, la dureza superficial, la rugosidad, la microfiltración y la susceptibilidad a la tinción son algunos de los factores que se ven alterados en las resinas de composite cuando éstas están implicadas en el proceso de blanqueamiento. Estas diferencias son especialmente notables cuando se emplea peróxido de hidrógeno a elevada concentración (35%) sobre resinas de baja densidad tales como los composites de microrelleno. Los autores lo atribuyen a que por un lado el proceso de oxidación generado por el peróxido afecta a las cadenas de los polímeros volviéndolos más vulnerables en sus dobles enlaces sin llegar a romperlos, lo que da lugar a un reblandecimiento y disminución de la microdureza del composite. Por otro lado, los radicales libres interfieren en la interfase del relleno de la resina causando un despegamiento del relleno de la matriz dando como resultado microfisuras que aumentan la rugosidad superficial de la resina. Debido a esto, los autores recomiendan tener en cuenta el tipo de relleno de los composites cuando se aplican geles de blanqueamiento a alta concentración (Hannig y cols., 2007; Hubbezoglu y cols., 2008; Lima y cols., 2008; Li, Yu y Wang, 2009; El-Murr, Ruel y St-Georges, 2011).



**HIPÓTESIS**



De acuerdo a lo anteriormente expuesto, las hipótesis nulas que se plantean analizar en este trabajo de investigación son las siguientes:

1. La topografía del esmalte no se modifica tras la aplicación de peróxido de hidrógeno al 38%. La conservación en saliva artificial de las muestras durante 24 horas y una semana tampoco produce variación en dicha topografía.
2. La aplicación de peróxido de hidrógeno al 38% no altera el módulo de elasticidad ni la dureza del esmalte. Transcurridas 24 horas o una semana tras la aplicación del agente blanqueador no se detectan cambios en dichas propiedades mecánicas.
3. La tenacidad de fractura del esmalte no varía tras el blanqueamiento con peróxido de hidrógeno al 38%, independientemente de si se evalúa de forma inmediata, o transcurridas 24 horas o una semana de conservación en saliva artificial.
4. La aplicación de peróxido de hidrógeno al 38% no modifica la resistencia al desgaste del esmalte inmediatamente tras su aplicación, ni tampoco transcurridas 24 horas ni una semana desde su aplicación.







# OBJETIVOS



## OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo tiene como objetivo principal el estudio del efecto del proceso de blanqueamiento con un agente blanqueador de peróxido de hidrógeno con una concentración del 38% sobre la rugosidad, el comportamiento mecánico, tenacidad de fractura y resistencia al desgaste del esmalte en el momento de la aplicación del peróxido, transcurridas 24 horas y transcurrida una semana desde su aplicación, estando siempre almacenadas en saliva artificial.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los cambios que se producen en la rugosidad superficial, en concreto en los parámetros de rugosidad media cuadrática (RMS) y rugosidad media (Ra), en los tercios incisal, medio y cervical del esmalte en el momento de la aplicación del blanqueamiento y transcurrida una semana desde su aplicación.
2. Verificar si existen cambios en el módulo de elasticidad y dureza del esmalte tanto en su superficie vestibular como en su sección transversal inmediatamente después de la aplicación del peróxido de hidrógeno, transcurridas 24 horas y transcurrida una semana desde su aplicación.
3. Comparar si, inmediatamente después de la aplicación del agente blanqueante, transcurridas 24 horas y una semana, las muestras presentan cambios significativos en la tenacidad de fractura del esmalte.

4. Comprobar si se altera la resistencia al desgaste del esmalte inmediatamente después de la aplicación del agente blanqueante, transcurridas 24 horas y transcurrida una semana.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 5.1. MATERIAL

En el presente trabajo se estudió el efecto del tratamiento de blanqueamiento con peróxido de hidrógeno al 38% sobre el esmalte de un total de 29 incisivos bovinos. Para su selección, las muestras se observaron con lupa estereomicroscópica (Olympus SZX7, Hamburgo, Alemania) para descartar aquellos incisivos con cualquier anomalía en su corona. Todos los dientes procedían de terneras de 24 meses de edad.

Se realizó un estudio experimental *in vitro*, descriptivo, de tipo transversal y procesado estadísticamente, de la influencia del peróxido de hidrógeno al 38% sobre las propiedades mecánicas del esmalte bovino utilizando un microscopio de fuerzas atómicas (AFM) (Nanoscope IIIa, Veeco-Digital Instruments, Santa Bárbara, CA, USA), un nanoindentador (NanoIndenter XP, de MTS Systems Corporation, Oak Ridge, TN, EE.UU.) y un MEB (SCD 005 Sputter Coater, BalTec, Balzers, Liechtenstein; Hitachi VP-SEM S-3400N, Tokio, Japón).

Este estudio se realizó en el laboratorio de investigación del Departamento de Estomatología de la Facultad de Ciencias de la Salud y en la Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología de la Universidad Rey Juan Carlos.

Los incisivos bovinos se emplearon fundamentalmente por dos razones. La primera, porque es más fácil obtener un número suficiente de muestras de incisivos bovinos que de incisivos humanos. La segunda, porque el área superficial de un incisivo bovino es mayor, lo que permite obtener varios especímenes de un mismo diente. Así siempre se puede obtener un control de la misma superficie del espécimen que se va a tratar. Por último, los dientes bovinos procedentes de animales con un linaje genético y dieta



ambiental similar, podrían mostrar mayor homogeneidad en su composición mineral que dientes humanos que se obtienen de donantes distintos con dieta o suplementos de fluoruro diferentes (Feagin, Koulourides y Pigman, 1969; Gwinnett, Buonocore y Sheykhoslam, 1972; Imfeld, 2001; Schmalz y cols., 2001; Saleh, Taymour, 2003; Camargo, Marques y de Cara, 2008; Fonseca y cols., 2008; Ríos y cols., 2008; Wegehaupt y cols., 2008; Turssi y cols., 2010; White y cols., 2010; Yassen, Platt y Hara, 2011).

## **5.2. MÉTODOS EXPERIMENTALES**

Una vez extraídos los incisivos bovinos y limpios de restos de tejido, se procedió a su almacenamiento en solución de timol al 0.5% a 4°C de temperatura.

Tras 24 horas de almacenamiento de los incisivos en la solución de timol, se procedió a la eliminación de la raíz mediante un corte con turbina a nivel de la unión amelocementaria. Una vez realizado este paso, se eliminó el contenido pulpar de cada corona con una cucharilla. Finalizado este procedimiento, los incisivos se almacenaron en saliva artificial a temperatura ambiente. La composición de la saliva artificial (Salivart, Fineman®, Madrid) utilizada se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4. Composición de la saliva artificial**

<b>Saliva artificial SALIVART®</b>	<b>g/100g de solución</b>
Carboximetilcelulosa sódica	1g
Sorbitol	3g
Cloruro de sodio	0.084g
Fosfato de potasio	0.120g
Cloruro de calcio dihidrato	0.015g
Cloruro de magnesio hexahidrato	0.005g
Fosfato de potasio dibásico	0.034g
Agua purificada c.s.p.	100g

Relación de la composición de la saliva artificial para 100 gramos de solución.

Para la preparación de las muestras se empleó una máquina de corte (Struers Accutom 5, Struers, Alemania) (Figura 13a). Los especímenes fueron cortados de manera diferente según la superficie sobre la que se realizaron las mediciones. En la Figura 13 se muestran los cortes realizados para las mediciones sobre la superficie vestibular (Figura 13a) y para las mediciones en cortes transversales (Figura 13b).



Figura 13. a) superficie vestibular; b) superficie transversal.

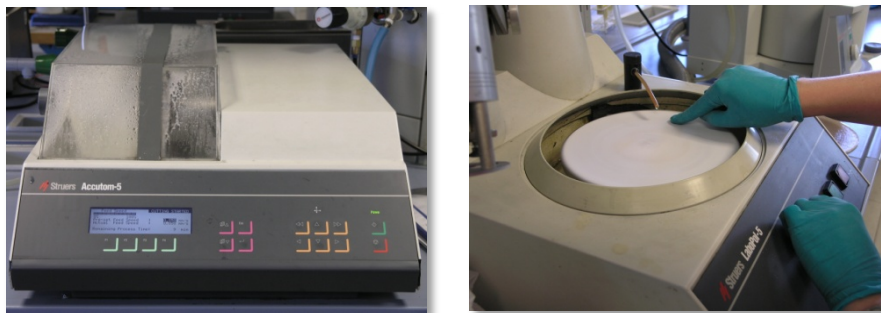


Figura 14. a) Máquina de corte (Accutom-5, Struers, Copenhagen, Alemania); b) Pulidora (Labopol-5, Struers, Copenhagen, Alemania)

Los ensayos que se realizaron se pueden agrupar en 2 categorías: ensayos de caracterización de la topografía y morfología superficial y ensayos de caracterización del comportamiento mecánico. Todos los ensayos se realizaron en una habitación con temperatura controlada (21°C) para tratar de reducir la variabilidad asociada a este parámetro.

### 5.2.1. ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN DE LA TOPOGRAFÍA Y MORFOLOGÍA SUPERFICIAL

Dentro de los ensayos de caracterización de la topografía superficial, se analizó la variación de distintos parámetros relacionados con la rugosidad superficial del esmalte por el efecto del peróxido de hidrógeno al 38%. Para ello se empleó un AFM Nanoscope IIIa.

### MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS (AFM)

Desde su desarrollo a mediados de la década de 1980, el AFM ha sido la técnica de elección para caracterizar la morfología de la superficie de

diferentes materiales con una resolución atómica (Hegedu y cols., 1999; Habelitz y cols., 2001; Bechtle, Habelitz y Klocke, 2010).

Este método requiere una preparación adecuada de las muestras y es capaz de evaluar la superficie a lo largo de los ejes x, y, z. Para ello, el AFM utiliza una punta de pequeñas dimensiones (radio <20 nm) que recorre la superficie para reproducirla como un mapa topográfico. Este mapa de AFM, es una fuente de información completa sobre la morfología de la superficie dental (Pedreira de Freitas, Cardoso y Brossi, 2010).

Existe un gran número de parámetros que cuantifican la topografía y textura superficial. De entre todos ellos, destacan parámetros de altura (altura pico-valle, la rugosidad media y rugosidad cuadrática media), los parámetros de longitud de onda (parámetro de distancia), los parámetros de forma (asimetría), funciones estadísticas (densidad de potencia espectral de autocovarianza y autocorrelación) y la dimensión fractal (Jeng, Lin y Shieh, 2009).

Sin embargo, los parámetros más conocidos que caracterizan la morfología de las superficies son la rugosidad cuadrática media (RMS), que representa el promedio de la diferencia de altura entre los picos y los valles, la rugosidad media (Ra), que representa la distancia media entre picos y valles de la superficie y la rugosidad máxima (Sz), que representa el valor de rugosidad máxima (Pedreira de Freitas, Cardoso y Brossi, 2010).

Para realizar las medidas de rugosidad, se eliminó la convexidad vestibular de los incisivos (n=5) mediante su pulido utilizando una pulidora mecánica con irrigación (Labopol-5, Struers, Copenhagen, Dinamarca) (Figura 14b). Para ello se emplearon paños con suspensión de alúmina de 3µm y posteriormente paños de OP-A (Struers).

Entre cada secuencia de pulido, los especímenes fueron sumergidos en agua destilada durante 5 minutos en una cuba de ultrasonidos (J.P. Selecta, S.S., Barcelona, España) para eliminar los residuos del pulido.

A continuación, éstos fueron almacenadas en saliva artificial durante 24 horas a temperatura ambiente antes de realizar los ensayos.

Para estudiar la evolución del efecto del agente blanqueador, los ensayos se realizaron en diferentes tiempos después de la aplicación del mismo: antes del tratamiento del blanqueamiento (control), inmediatamente después de la aplicación del agente blanqueante (inmediato), y una semana después de la aplicación del tratamiento (semana). Durante los tiempos de espera, las muestras se almacenaron en saliva artificial.

El agente blanqueante de uso clínico que se empleó posee como componente principal el peróxido de hidrógeno al 38% (Opalescence Boost®, Ultradent, Utah, EE.UU.). Para evaluar los efectos del blanqueamiento se empleó siempre el mismo protocolo. Se siguieron minuciosamente las instrucciones del fabricante durante el proceso de blanqueamiento: el gel blanqueador se aplicó sobre la superficie vestibular del esmalte en períodos de 15 minutos hasta un total de 4 aplicaciones o 1 hora de tratamiento. Entre cada período de 15 minutos, las muestras fueron lavadas con abundante agua. Una vez finalizado el período de 1 hora, las muestras fueron introducidas en un baño de ultrasonidos con agua destilada durante 5 minutos para garantizar que no quedaran restos del gel blanqueante.

Para la obtención de los valores de los parámetros superficiales se empleó el método de contacto intermitente (*tapping*). Se realizaron 4 imágenes de

áreas predeterminadas en la cara vestibular, en los tercios cervical, medio e incisal del esmalte.

Las mediciones se realizaron empleando una punta con un radio en el extremo de 1nm. Para realizar los ensayos, se fijó una frecuencia de 160kHz y una fuerza constante de 5N/m. Se obtuvieron imágenes de 15 $\mu$ m x 15 $\mu$ m con una velocidad de barrido lenta (0.2Hz) y una resolución de 512 x 512 líneas.

A partir de las imágenes de AFM y utilizando el programa de análisis de imagen a nanoescala SPIP™ v. 6.0.2 (Scanning Probe Image Processor), se extrajeron los valores de parámetros característicos que permiten definir y caracterizar la topografía superficial del esmalte.

El primer parámetro que se determinó fue la Sz (proporciona en cada medición los cinco picos y valles más elevados de la muestra) para así determinar el valor cero a partir del cual cuantificaríamos todas las mediciones de RMS y Ra de la muestra. Posteriormente se determinaron los parámetros de RMS y Ra tanto de la muestra control como de las muestras sometidas al blanqueamiento y conservadas después durante una semana en saliva artificial.

## **5.2.2. ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO MECÁNICO**

### **INDENTACIÓN INSTRUMENTADA**

En los últimos años, la indentación instrumentada a pequeña escala o nanoindentación, se ha convertido en una técnica habitual para la caracterización mecánica de los tejidos mineralizados biológicos, incluidos el esmalte y la dentina (Kinney y cols., 1999; Cuy y cols., 2002).

Debido al pequeño tamaño del indentador y de la región de material afectado, la nanoindentación es adecuada para medir las propiedades locales del material en muestras pequeñas, delgadas y heterogéneas (Oyen, 2006; Ebstein y Pruitt, 2006).

El ensayo de indentación instrumentada consiste en aplicar una fuerza determinada a un indentador con una geometría conocida que se pone en contacto con la superficie del material que se pretende caracterizar y cuya dureza y rigidez es mucho mayor, al menos en un orden de magnitud, que la del material indentado. Durante el ensayo de nanoindentación, se programa un proceso de carga hasta carga máxima seguido de un proceso de descarga.

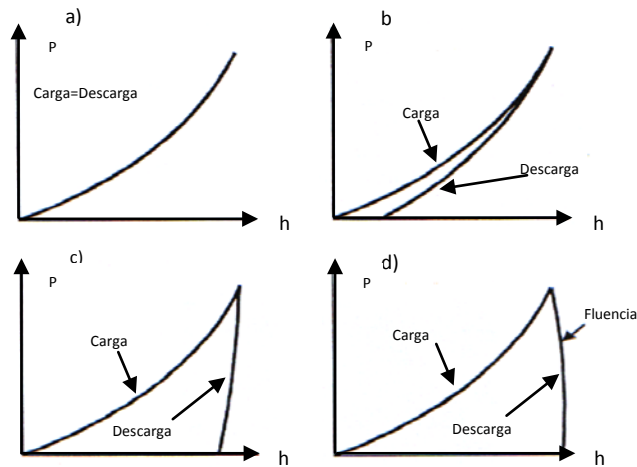
En un ensayo de indentación instrumentada se registra de manera continua y simultánea la fuerza aplicada y el desplazamiento del indentador en el interior del material, durante un ciclo inicial de carga y un posterior ciclo de descarga. La relación entre la fuerza aplicada y la profundidad de penetración en la superficie, es función de la geometría del indentador y de las propiedades del material ensayado y se utiliza como medida de su comportamiento.

Los parámetros extraídos de las correspondientes curvas fuerza-desplazamiento experimentales son: la carga máxima de indentación ( $P_{\max}$ ); el desplazamiento o penetración máxima ( $h_{\max}$ ); la profundidad de contacto ( $h_c$ ), entendida como la distancia entre el último punto de contacto entre superficie e indentador, y la superficie libre del material indentado; el área de contacto ( $A$ ), obtenida a partir de la profundidad de contacto y la geometría del indentador; y la rigidez de contacto ( $S$ ), obtenida como la pendiente inicial de la rama de descarga.

De esta manera, a partir de las curvas obtenidas de un ensayo de indentación instrumentada, pueden extraerse diversas propiedades mecánicas del material indentado. Concretamente, a partir de la rama de descarga y utilizando la metodología de Oliver y Pharr, es posible obtener datos de módulo de elasticidad y dureza (Oliver y Pharr, 1992).

La Figura 15 recoge algunos ejemplos que ilustran el efecto del comportamiento del material. En un material elástico las ramas de carga y descarga deberán coincidir, por el contrario todo material que experimente deformación plástica, por muy leve que sea, se caracteriza porque las ramas de carga y descarga siguen caminos diferentes.





**Figura 15. Curvas fuerza (P)-desplazamiento (h), correspondientes a materiales: a) elásticos; b) frágiles; c) dúctiles; d) poliméricos con fluencia.**

Las ecuaciones empleadas para calcular la dureza ( $H$ ) y el módulo de elasticidad ( $E$ ) son:

$$H = \frac{P_{max}}{A}$$

**Ecuación 7. Fórmula para el cálculo de la dureza.**

$$E_r = \sqrt{\frac{\pi}{A}} \frac{S}{2\beta}$$

**Ecuación 8. Fórmula para el cálculo del módulo de elasticidad compuesto.**

donde  $E_r$  es un módulo de elasticidad compuesto que tiene en cuenta las propiedades elásticas del material indentado y del indentador (Ecuación 9), y  $\beta$  es un factor empírico que tiene en cuenta las particularidades geométricas de cada indentador. Para el caso de un indentador piramidal triangular (indentador Berkovich)  $\beta= 1.034$ . El módulo de elasticidad del

material indentado se obtiene a partir del módulo de elasticidad compuesto a través de la Ecuación 9,

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1 - \nu_b^2}{E_s} + \frac{1 - \nu_i^2}{E_i}$$

**Ecuación 9. Fórmula para la obtención del módulo de elasticidad del material indentado a partir del módulo de elasticidad compuesto.**

siendo  $\nu$  el coeficiente de Poisson. En el caso del esmalte, el valor de  $\nu$  es de 0,3. El subíndice  $s$  corresponde al material indentado, y el subíndice  $i$  se refiere al material del indentador. Las propiedades elásticas del indentador, por lo general de diamante,  $\nu_i$  y  $E_i$ , son 0.07 y 1140 GPa, respectivamente.

La indentación instrumentada puede ser una técnica indicada para la medición del módulo de elasticidad en materiales anisotrópicos aunque la Ecuación 8 esté formulada asumiendo que el material es homogéneo e isótropo (Turner, Rho y Takano, 1999; Ge y cols., 2005).

Existen distintos tipos de indentadores: esféricos, cónicos y piramidales. En la Figura 16 se han incluido las geometrías Vickers y Berkovich como representativas de los indentadores piramidales.

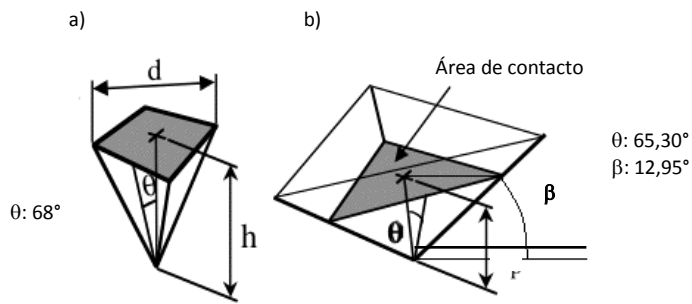
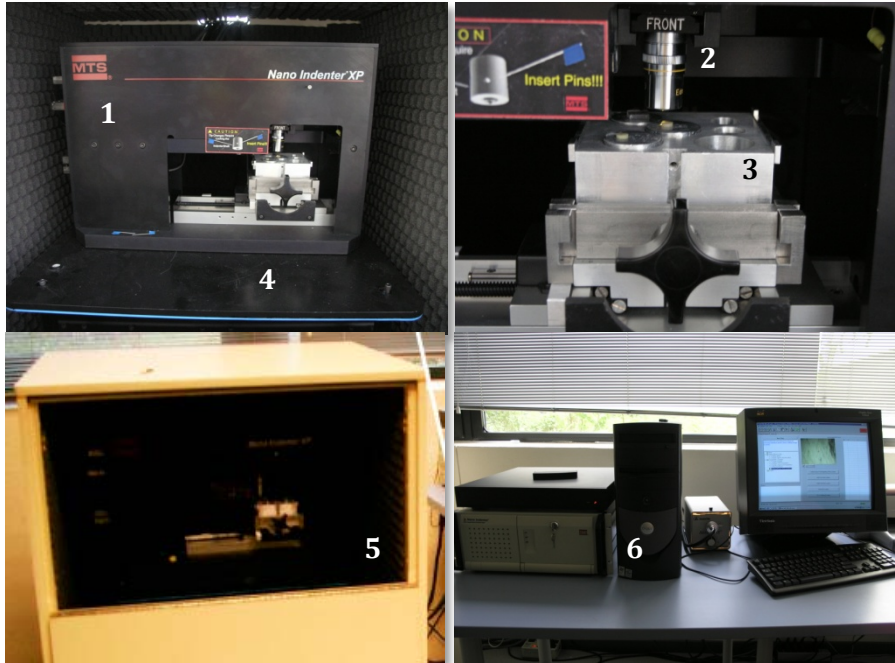


Figura 16. a) Geometría del indentador Vickers; b) geometría del indentador Berkovich

Son indentadores que, al igual que los cónicos, terminan en una punta afilada generando rápidamente plastificación completa en el material indentado, por lo que resultan convenientes a la hora de determinar durezas de materiales con pequeño espesor.

Los indentadores Berkovich son los más empleados para los ensayos de nanoindentación debido a que son más fáciles de fabricar que los indentadores Vickers y permiten, por tanto, un mayor control de la geometría (Habelitz y cols., 2001).

Para este estudio se empleó un equipo de nanoindentación que consta de los siguientes módulos, Figura 17:



**Figura 17. Equipo de nanoindentación, NanoIndenter XP, constituido por dos unidades: unidad de control y unidad de nanoindentación.**

1. Nanoindentador propiamente dicho, en el que se aloja el indentador (Elemento 1 en Figura 17), en este caso una punta Berkovich (Figura 18).
2. Microscopio óptico. Existen dos oculares con distintos aumentos, uno de 10X y otro de 40X, que con el ocular equivalen a 100 y 400 aumentos, respectivamente (Elemento 2 en Figura 17).
3. Portamuestras que permite alojar hasta un máximo de 6 muestras de geometría variable en soportes cilíndricos de 31.6 y 19mm de diámetro y 22.5mm de altura (Elemento 3 en Figura 17).
4. Mesa antivibración que garantiza una precisión en el posicionamiento de la punta de  $1.5\mu\text{m}$  (Elemento 4 en Figura 17).
5. Cabina de aislamiento térmico-acústico, en cuyo interior se alojan todos los módulos de la unidad de nanoindentación (Elemento 5 en Figura 17).
6. Unidad de control (Elemento 6 en Figura 17).

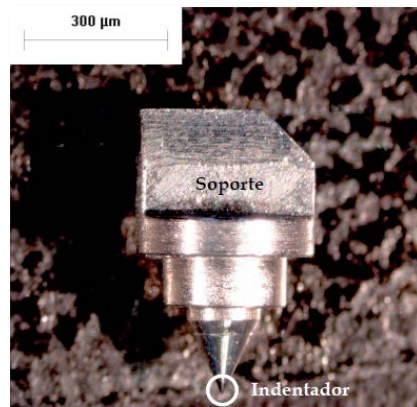


Figura 18. Cabezal de indentación: conjunto indentador-soporte.

En la actualidad existen distintas metodologías, basadas en la técnica de indentación instrumentada, que, dependiendo de las características estructurales y geométricas del material a analizar, resultan ser más apropiadas para su caracterización.

En el caso del esmalte se pueden seguir dos metodologías para determinar E y H: metodología convencional (CM) y metodología basada en la medida continua de la rigidez de contacto (CSM).

La técnica de ensayo CSM constituye una variante del ensayo de nanoindentación descrito en el punto anterior. Consiste en la aplicación de una fuerza armónica que se superpone a la carga ascendente nominal (Figura 19). Cada ciclo de descarga tiene un desplazamiento muy pequeño de apenas 2nm. En cada una de las pequeñas descargas se determina la rigidez del contacto y, a partir de ella, el módulo de elasticidad, E, y la dureza, H.

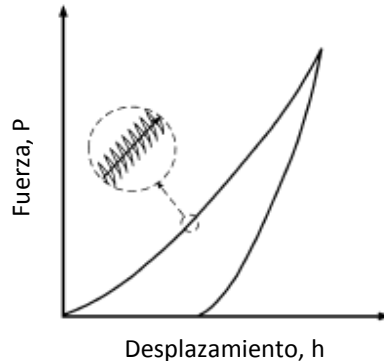


Figura 19. Esquema del ciclo de carga en CSM.

Por tanto, el método de Oliver y Pharr se aplica en cada uno de los ciclos de descarga obteniéndose valores de  $E$  y  $H$  como una función continua de la carga o de la profundidad de penetración.

## EFECTO DEL GRADO DE DESHIDRATACIÓN SOBRE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DEL ESMALTE

Al tratarse de un estudio con muestras biológicas en cuya composición el agua puede jugar un papel importante, el primer ensayo que se realizó tuvo como fin comprobar si la deshidratación de la muestra durante el proceso del ensayo afectaba a los resultados obtenidos.

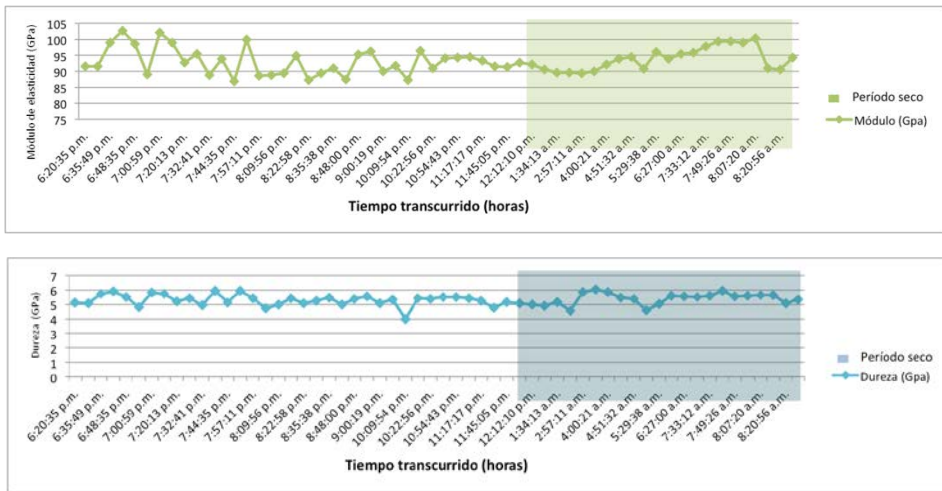
Para ello se realizó una batería de ensayos mediante nanoindentación sobre una muestra control situada dentro de una celda preparada para dicho propósito y sumergida en saliva artificial.

Esta batería de ensayos consistió en una matriz de indentaciones sobre la superficie vestibular de la muestra mediante metodología CSM, fijando el

coeficiente de Poisson a 0,3 y la profundidad máxima de penetración en el esmalte a 300nm.

En la Figura 20 se representa la evolución de los valores de módulo de elasticidad y dureza medidos mediante indentación instrumentada sobre la muestra control en función del tiempo transcurrido desde el inicio del primer ensayo. En dicha figura se distinguen dos zonas, una en la que la muestra permaneció sumergida en saliva artificial y, por tanto, en condiciones de hidratación; y otra en la que, debido a la evaporación continua de la saliva, la muestra sufrió deshidratación.

Esto permitió realizar los ensayos para el análisis del comportamiento mecánico sin necesidad de que la muestra estuviese sumergida en un medio acuoso. Por tanto, los resultados que han obtenido otros autores realizando los ensayos en las mismas condiciones serían comparables con nuestro estudio. (Suliman y cols., 2005; Götz y cols., 2007; Jiang y cols., 2008; Shereen y cols., 2009; Xie y cols., 2009; do Amaral y cols., 2012).



**Figura 20. Representación de valores de dureza y módulo de elasticidad frente al tiempo transcurrido de evaporación de la saliva.**

## DETERMINACIÓN DE LA METODOLOGÍA DEL ENSAYO

Se decidió realizar ensayos con ambas metodologías con el fin de seleccionar la técnica más adecuada para la determinación de ambas propiedades del esmalte. Las muestras no fueron sometidas a ningún tratamiento.

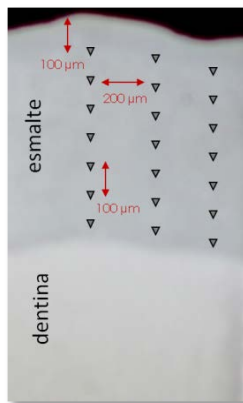
Para realizar las medidas de nanoindentación aplicando CM y CSM, 2 incisivos se seccionaron en sentido mesio-distal en fragmentos de 2mm de espesor en su tercio medio obteniendo 6 fragmentos por cada diente (n=12). Se hicieron las medidas en esta sección transversal para poder realizar indentaciones desde la superficie del esmalte hasta la unión amelodentinaria.



Cada fragmento fue pulido con paños con suspensión de alúmina de  $3\mu\text{m}$  y posteriormente con OP-A (Struers). Entre cada secuencia de pulido, los fragmentos fueron sumergidos y bañados en agua destilada durante 5 minutos en una cuba de ultrasonidos (J.P. Selecta, S.S., Barcelona, España) para eliminar los residuos generados. Tras la secuencia de corte y pulido de los fragmentos, éstos fueron almacenados en saliva artificial durante 24 horas a temperatura ambiente antes de realizar los ensayos.

Para la metodología CM se aplicaron diferentes cargas máximas de 1mN, 10mN, 100mN y 500mN. En cada fragmento, se programaron tres filas de 20 indentaciones por cada carga seleccionada.

Cada dos indentaciones se dejó una distancia de  $100\mu\text{m}$ , empezando a  $100\mu\text{m}$  del borde del esmalte hasta la unión amelodentinaria. Para las indentaciones de 500mN, se aumentó la distancia entre las indentaciones hasta  $200\mu\text{m}$  para evitar el estrés residual de otras impresiones. A su vez, las filas de indentaciones estaban separadas entre ellas por  $200\mu\text{m}$  (Figura 21).



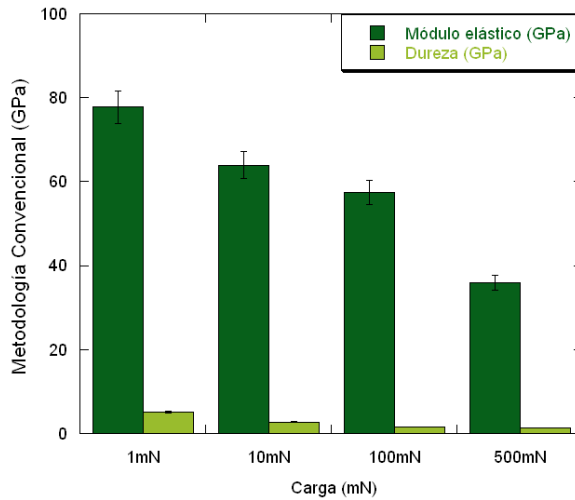
**Figura 21. Esquema representativo en un corte transversal del esmalte y la dentina de las indentaciones y las distancias respetadas entre ellas.**

Para las mediciones con CSM, se realizaron también 3 filas de 20 indentaciones desde el borde del esmalte hasta la unión amelodentinaria. En cada indentación se aplicó la carga necesaria para penetrar 2 $\mu$ m en la superficie del esmalte. Las separaciones que se dejaron entre cada indentación fueron similares a las que se dejaron en la metodología anterior. Para la programación de estos ensayos con CSM, se impuso un ciclo de carga-descarga continua con una amplitud de 2nm y una frecuencia de 45Hz.

Se analizó mediante ANOVA la influencia de la carga en la dureza y en el módulo de elasticidad para ambas metodologías. En caso de que fuera estadísticamente significativa, la comparación *post-hoc* se realizaron con el test de Student-Newman-Keuls. La significancia fue considerada con un nivel de confianza del 95% empleando el programa estadístico SPSS (IBM Corporation SPSS Statistic, versión 12.0., Armonk, NY, EEUU).

Para la metodología convencional, la Figura 22 y Tabla 5 muestran los valores obtenidos, media y desviación estándar, de módulo de elasticidad y dureza del esmalta con las distintas cargas analizadas. El módulo de elasticidad y la dureza disminuyeron a medida que la carga máxima de indentación fue aumentando.

**Figura 22. Módulo de elasticidad y dureza del esmalte empleando metodología CM.**



Módulo de elasticidad y dureza del esmalte como una función de indentación a carga máxima en dos dientes similares empleando la metodología CM.

**Tabla 5. Valores medios y desviación estándar (de) del módulo de elasticidad (E) y dureza (H) en GPa empleando metodología CM.**

Carga	E	H
	$\bar{x}$ (de)	$\bar{x}$ (de)
1mN	80,5 (13,21) a	5,18 (1,46) a
10mN	76,73 (6,28) b	3,02 (0,62) b
100mN	74,21 (8,43) b	1,93 (0,98) c
500mN	40,71 (5,85) c	1,40 (0,20) c

Diferentes letras dentro de la misma columna implica que los valores son estadísticamente diferentes.

El test de ANOVA de una vía mostró la influencia de la carga aplicada para los valores de módulo de elasticidad ( $p < 0.001$ ). Los valores de módulo elástico disminuyeron significativamente a medida que se incrementó la carga aplicada. La máxima rigidez del esmalte se alcanzó con cargas de 1mN y las mínimas con cargas de 500mN. Se obtuvieron valores intermedios y similares para las cargas de 10 y 100mN.

En cuanto a los valores de dureza, el comportamiento fue similar, ( $p < 0.001$ ). La dureza también disminuyó a medida que incrementó la carga. Los valores más altos de dureza para el esmalte se obtuvieron con las cargas de 1mN, mientras que los valores más bajos de dureza se registraron para las cargas de 100 y 500mN siendo estos estadísticamente similares.

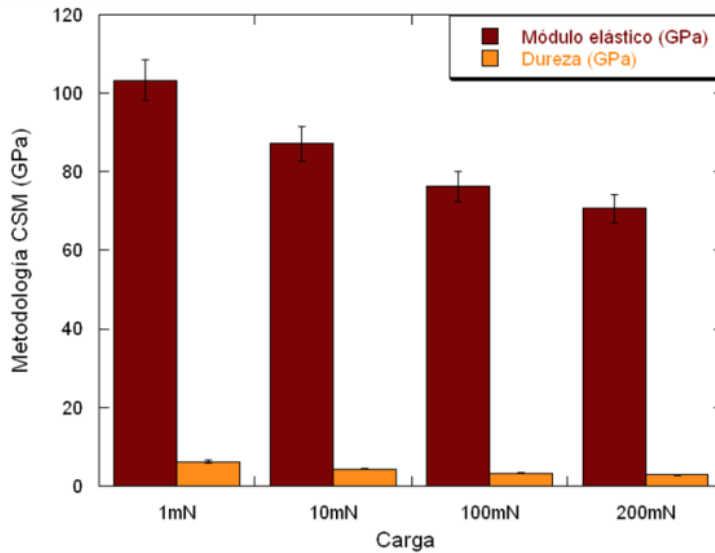
Cuando se empleó la metodología CSM, se obtuvieron valores de módulo de elasticidad y dureza durante una penetración de  $2\mu\text{m}$  dentro del esmalte. Por tanto, los datos de módulo de elasticidad y dureza se obtuvieron como una función continua de la penetración. Empleando las curvas de fuerza-desplazamiento para cada test de CSM, cada profundidad de penetración puede ser relacionada con una carga de indentación. Consecuentemente, los datos de módulo de elasticidad y dureza se pueden obtener como una función de la carga de indentación.

Para poder comparar los datos de módulo elástico y dureza de ambas metodologías, se eligieron las cargas de indentación de 1mN, 10mN, 100mN y 200mN para la metodología CSM.

La Figura 23 y Tabla 6 muestran el promedio de los valores de módulo elástico y dureza correspondientes a la metodología CSM para cargas de 1mN, 10mN, 100mN y 200mN en el esmalte.

El test de ANOVA mostró una influencia significativa en el módulo elástico y dureza de la carga aplicada ( $p < 0.001$ ). Se observó una disminución de ambas propiedades mecánicas cuando la carga de indentación aumentó. Hay diferencias estadísticamente significativas para el módulo elástico entre todas las cargas. En el caso de la dureza, el comportamiento fue similar pero no había diferencias entre las cargas de 100 y 200mN.

**Figura 23. Módulo de elasticidad y dureza del esmalte correspondiente a la metodología CSM**



**Módulo de elasticidad y dureza del esmalte correspondiente a la metodología CSM para las cargas de 1mN, 10mN, 100mN y 200mN**

**Tabla 6. Valores medios y desviación estándar (de) del módulo de elasticidad (E) y dureza (H) en GPa empleando metodología CSM**

	<b>E</b>	<b>H</b>
Carga	$\bar{x}$ (de)	$\bar{x}$ (de)
1mN	116,28 (8,14) a	7,36 (1,07) a
10mN	93,09 (2,36) b	4,77 (0,47) b
100mN	75,92 (2,02) c	3,33 (0,19) c
200mN	70,81 (1,13) d	2,89 (0,13) c

Diferentes letras dentro de la misma columna implica que los valores son estadísticamente diferentes.

De acuerdo a los resultados anteriormente expuestos, al comparar los valores de módulo de elasticidad y dureza obtenidos mediante las dos metodologías empleadas, se observa que fueron ligeramente superiores con CSM para cargas más altas, no observándose esta tendencia en el caso contrario. En la Figura 24 compara la rigidez de contacto frente a la profundidad de contacto de los ensayos de nanoindentación con las metodologías CM y CSM.

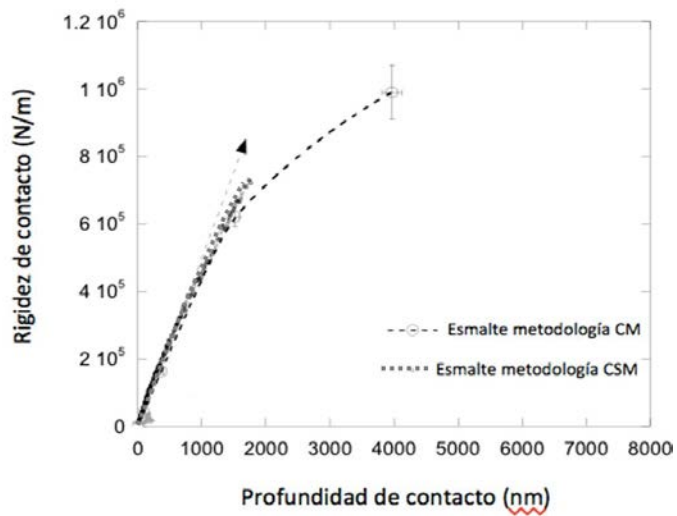


Figura 24. Rigidez de contacto frente a la profundidad de contacto en el esmalte en ensayos de nanoindentación con metodologías de CM y CSM.

A partir de los resultados obtenidos se fijaron las condiciones de los ensayos de indentación que se hicieron posteriormente sobre las muestras tratadas.

Los valores obtenidos en este estudio preliminar fueron publicados en el Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio en 2010, adjuntándose dicha publicación en el Anexo de esta Tesis.

## DETERMINACIÓN DE LA DUREZA Y MÓDULO DE ELASTICIDAD DEL ESMALTE TRAS LA APLICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AL 38%

Para obtener resultados del comportamiento mecánico del esmalte y con el fin de simular una situación clínica real se aplicó el gel de blanqueamiento sobre la superficie vestibular.

Para evaluar tanto el efecto superficial como en profundidad, se realizaron las mediciones en secciones transversales (n=8) y en la superficie vestibular (n=8) mediante la metodología CSM.

Para realizar las medidas en la sección transversal, los incisivos fueron cortados en sentido mesio-distal en fragmentos de 2mm de espesor en su tercio medio y posteriormente pulidos con paños con suspensión de alúmina de 3 $\mu$ m y posteriormente paños de OP-A (Struers).

Para realizar las medidas en la superficie vestibular, se eliminó la convexidad vestibular de los incisivos mediante su pulido utilizando una pulidora mecánica con irrigación (Labopol-5, Struers). Para ello se emplearon paños con suspensión de alúmina de 3 $\mu$ m y posteriormente paños de OP-A (Struers).

En todos los casos, entre cada secuencia de pulido, los especímenes fueron sumergidos y bañados en agua destilada durante 5 minutos en una cuba de ultrasonidos para eliminar los residuos del pulido.

Tras la secuencia de corte y pulido de las muestras, éstas fueron almacenadas en saliva artificial durante 24 horas a temperatura ambiente antes de realizar los ensayos.



En las secciones transversales, se hicieron 20 indentaciones a 100 $\mu$ m del borde del esmalte hasta la unión amelodentinaria. Los ensayos fueron programados con ciclos de carga-descarga con una amplitud de 2nm y una frecuencia de 45Hz. El coeficiente de Poisson se fijó en 0,3 (Habelitz y cols., 2001), y la profundidad máxima de penetración en 300nm

En la superficie vestibular, para cada espécimen se programaron 20 indentaciones en el tercio medio en sentido mesio-distal.

La razón de fijar la profundidad máxima de penetración a 300nm fue la de obtener huellas de indentación que no se vieran afectadas por la vaina proteínica que rodea a los prismas. De esta manera el área de contacto no se vería afectada por esta microestructura, y el valor proporcionado por las ecuaciones se ajustaría mejor al real. Esta profundidad de penetración asegura huellas residuales de 2 $\mu$ m y, por tanto, que estén dentro de las dimensiones de la cabeza del prisma del esmalte.

Para estudiar el efecto del agente blanqueador sobre el esmalte, los ensayos de indentación se realizaron en diferentes tiempos después de la aplicación del mismo: antes del tratamiento del blanqueamiento (control), inmediatamente después de la aplicación del agente blanqueante (inmediato), 24 horas después de la aplicación del tratamiento (24h) y una semana después de la aplicación del tratamiento (semana).

El agente blanqueante de uso clínico que se empleó fue el mismo que se utilizó en el análisis topográfico del esmalte siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito.

Antes de cada batería de ensayos, la geometría del indentador Berkovich fue calibrada, empleando para ello un espécimen estándar de sílice de módulo de elasticidad conocido.

~ Factores que afectan al ensayo de indentación instrumentada

En un ensayo de indentación son numerosos los factores que pueden tener un efecto negativo en la capacidad del ensayo para determinar propiedades representativas del material ensayado. Algunos de los factores están asociados al propio material y, en consecuencia, son difícilmente corregibles; en otros casos se trata de aspectos que el fabricante del equipo experimental puede corregir. Unos y otros son brevemente descritos en los próximos párrafos.

- Oscilación térmica:

Durante la realización de un ensayo de indentación instrumentada pueden existir variaciones de la temperatura que llevan asociadas contracciones o dilataciones de los elementos del equipo, provocando cambios en la profundidad de la indentación registrada a una carga determinada. Este fenómeno es más influyente cuanto menor es la escala de la indentación. Los equipos comerciales presentan actualmente mecanismos de corrección de este efecto. Es lo que se conoce como corrección “thermal drift”.

- Profundidad inicial de penetración:

Un ensayo ideal se inicia con el indentador situado sobre la superficie a indentar sin llegar a aplicar carga sobre ella. En la realidad esto no es posible, ya que para colocar el indentador sobre el material hay que realizar un primer contacto que permita detectar el nivel de la superficie. Se intenta que dicho contacto deforme lo menos posible la superficie

aplicando la mínima fuerza al contacto. Pese a estas precauciones, es muy habitual que se produzca cierta penetración de la punta en el material, lo cual origina que las curvas P-h presenten un valor no nulo de fuerza a profundidad cero. Los equipos de indentación que se usan actualmente corrigen este efecto, tanto más apreciable cuanto menor es la escala de la indentación.

- Flexibilidad de la instrumentación:

El sistema de medida de un equipo de nanoindentación registra tanto la profundidad de indentación, como cualquier desplazamiento o deformación de los elementos de la instrumentación como consecuencia de las fuerzas de reacción que aparecen durante el ensayo. Dichas variaciones son cuantificables y los equipos están preparados para corregir su efecto.

- Geometría del indentador:

Teóricamente, se considera que la geometría de la punta de indentación es perfecta, pero por problemas asociados a las técnicas constructivas y a la anisotropía de los cristales utilizados, dicha perfección no es posible. De manera que el valor del radio de contacto obtenido a partir de la profundidad de la indentación no será real, al estar calculado a partir de la geometría nominal. Dado que este fenómeno depende solo de la punta utilizada, se ha de realizar en cada caso una calibración. Dicha calibración consiste en realizar una serie de indentaciones sobre un material de propiedades mecánicas conocidas (sílice en el caso de nuestro estudio) para obtener la relación  $A/A_i - h_p$  del indentador. Donde  $A_i$  es el área de contacto proyectada de una punta ideal para cada indentación y  $A$  es el valor del área real de contacto proyectada que se determina según la ecuación 10:

$$A = \pi \cdot \left[ \frac{dP}{dh} \frac{1}{2 \cdot \beta \cdot E^*} \right]^2$$

**Ecuación 10. Ecuación para el cálculo de la geometría del indentador.**

- Desgaste del indentador:

Durante un ensayo de indentación se produce fricción entre el indentador y la superficie del material indentado, dando lugar a un proceso de desgaste continuado y, por consiguiente, una variación en la geometría del indentador. Dicho deterioro obliga a realizar calibraciones periódicas de las puntas de indentación.

- Condición superficial:

El estado superficial puede causar errores en el cálculo del área real de contacto ya que éste no será continuo. De entre todas las características superficiales que pueden afectar a la medida del módulo, dureza y rigidez del contacto, cabe destacar:

- Rugosidad superficial: la única manera de minimizar el efecto de esta variable es trabajar con superficies pulidas con un acabado muy fino. En general, la magnitud de la rugosidad superficial deberá ser menor o igual al cinco por ciento de la profundidad máxima de indentación.
- Planitud de la superficie: para minimizar este efecto es necesario garantizar una perpendicularidad del plano de indentación respecto de la línea de acción del indentador.
- Porosidad: Fleck, Otoy y Needleman (1992), estudiaron este efecto sobre materiales con módulo de elasticidad y porosidad conocidos haciendo uso del análisis de elementos finitos y el modelo de expansión de la cavidad. Estos autores sugieren que la resistencia a la indentación aumenta a medida que disminuye la porosidad.

- Propiedades intrínsecas del material:

Con las indentaciones a baja escala es necesario considerar los siguientes aspectos:

- Heterogeneidad del material: la presencia de distintas interfases o cualquier tipo de defecto próximo a la indentación modifica considerablemente los valores de módulo de elasticidad y dureza obtenidos.
- Fluencia: La fluencia dentro del material se manifiesta como un cambio en la profundidad de indentación a carga constante (normalmente a carga máxima).
- Formación de grietas durante la indentación: factor que estará ligado a la tenacidad de fractura del material. En un ensayo de indentación, durante el proceso de carga, se inducen en el esmalte tensiones de tracción a medida que aumenta el radio de la zona plástica. Durante el proceso de descarga, surgen tensiones adicionales cuando el material adyacente a la zona plástica intenta recuperar sin éxito su forma original. Por tanto, cualquier circunstancia dentro del material que implique falta de continuidad puede convertirse en un evento precursor de grietas.

- Tensiones Residuales:

Como consecuencia de tratamientos mecánicos previos o de los procesos de preparación superficial, pueden aparecer tensiones residuales, que no han sido tenidas en cuenta en el desarrollo teórico. La presencia de estas tensiones residuales puede contribuir a que los fenómenos de plastificación o de fractura aparezcan antes de lo esperado. El tamaño de las grietas que genera una indentación y la carga necesaria para generarlas, pueden servir para estimar las tensiones residuales presentes en la muestra.

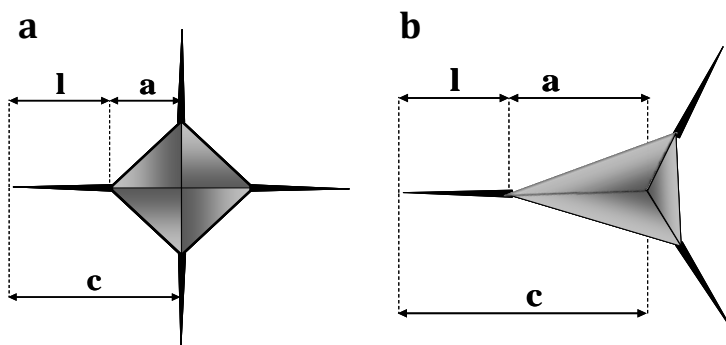
## ENSAYOS DE TENACIDAD, $K_c$ , TRAS LA APLICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AL 38%

Una de las expresiones más ampliamente utilizadas (Ecuación 11) para la medida de la tenacidad de fractura es la relación que proponen Lawn, Evans y Marshall (1980),

$$K_c = k \left( \frac{E}{H} \right)^n \frac{P}{c^{3/2}}$$

**Ecuación 11. Fórmula para el cálculo de la tenacidad de fractura propuesta por Lawn, Evans y Marshall.**

donde P es la carga máxima de indentación, c es la longitud de grieta (Figura 25a), E es el módulo de elasticidad y H es la dureza. Los parámetros k y n son constantes empíricas que equivalen a  $0.016 \pm 0.004$  y 0.5 respectivamente. Aunque otros estudios determinan que k equivale a 0.0098 y n a 3/2 (Anstis y cols., 1981).



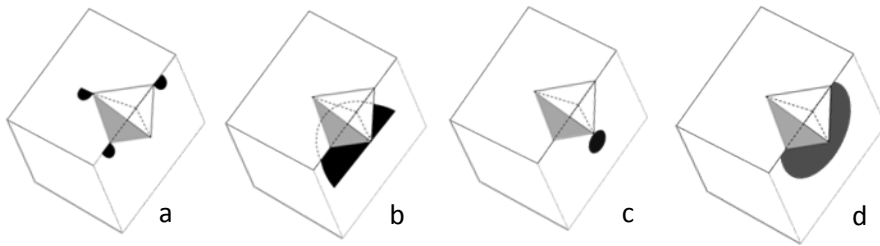
**Figura 25. Parámetro de grieta, c, para un indentador: a) Vickers y b) Berkovich**

Dicha ecuación es válida cuando el sistema de indentación genera un tipo de fisuras radiales de poca profundidad que no están conectadas

denominadas tipo Palmqvist (Figura 26). Niihara, Morena y Hasselman (1983) propusieron la siguiente modificación para la Ecuación 12:

$$K_c = k \left( \frac{E}{H} \right)^{2/5} \frac{P}{a\sqrt{l}}$$

**Ecuación 12. Fórmula para el cálculo de la tenacidad de fractura propuesta por Niihara, Morena y Hasselman**



**Figura 26. Representación en 3D de diferentes modelos de propagación de grietas según Palmqvist. a) Cracks radiales, b) Cracks laterales, c) Cracks medianos, d) Cracks semi-circunferencial.**

Donde  $a$  es la mitad de la diagonal de la huella de la indentación,  $l$  es la longitud de la grieta y  $k$  fue determinada como 0.0089 (Figura 25a).

En 1987 Laugier propuso una alternativa para la expresión de las grietas Palmqvist:

$$K_c = x_v \left( \frac{a}{l} \right)^{1/2} \left( \frac{E}{H} \right)^{2/3} \frac{P}{c^{3/2}}$$

**Ecuación 13. Fórmula para el cálculo de la tenacidad de fractura propuesta por Laugier.**

donde  $x_v$  fue determinada como 0.0143.

Sin embargo, la aplicación de estas ecuaciones se enfrenta con tres dificultades básicas. La primera es que todas estas ecuaciones son semi-empíricas y aunque tienen un fundamento teórico, siempre se ven afectadas por constantes cuyo valor depende del tipo de grieta generado así como de la geometría de indentador utilizado. La segunda es que es necesario obtener un patrón particular de grietas (Figura 25) y conocer la morfología de las grietas en un plano paralelo a la dirección de la carga. Y la tercera es que todas las ecuaciones fueron desarrolladas para materiales cerámicos máxicos e indentadores Vickers, es decir, indentadores con simetría.

A pesar de esto, la ecuación 11 es comúnmente aplicada a patrones de grieta obtenidos por un indentador Berkovich, usando como parámetros de grieta los mostrados en la Figura 25b, donde la ausencia de simetría es evidente (Dukino y Swain, 1992; Mullins, Bruzzi y McHugh, 2007; Kruzic y cols., 2009).

Por lo tanto, la idoneidad de la aplicación de las ecuaciones 11-13 para las indentaciones Berkovich es dudosa.

Se han hecho esfuerzos para obtener ecuaciones similares a las descritas anteriormente pero modificadas adecuadamente para la aplicación con indentadores Berkovich. Combinando el modelo propuesto por Laugier (1987), y la modificación de factores del radio de agrietamiento de Ouchterlony (1976), la tenacidad de fractura puede ser determinada de acuerdo a la ecuación 14. Sin embargo, la función empírica, característica de esta ecuación, y la posibilidad de obtener un patrón aleatorio de grietas, no garantiza que, en algunos materiales, proporcione un valor real de tenacidad de fractura (Ouchterlony, 1976; Laugier, 1987),



$$K_c = 1.073 \cdot x_v \left(\frac{a}{l}\right)^{1/2} \left(\frac{E}{H}\right)^{2/3} \frac{P}{c^{3/2}}$$

**Ecuación 14. Fórmula para la obtención de la tenacidad de fractura combinando los modelos propuestos por Lugier y Ouchterlony.**

donde  $x_v = 0.015$ , es la longitud de la grieta desde el extremo de la huella residual de indentación,  $c$  es la longitud de la grieta desde el centro de la huella residual,  $E$  es el módulo de elasticidad,  $H$  es la dureza y  $P$  es la carga de indentación.

En este trabajo, los ensayos de tenacidad de fractura se realizaron en incisivos bovinos ( $n=4$ ) de los que se obtuvieron muestras de esmalte del tercio medio de la superficie vestibular.

Para realizar las medidas en la superficie vestibular, se eliminó la convexidad vestibular de los incisivos mediante su pulido utilizando una pulidora mecánica con irrigación (Labopol-5, Struers). Para ello se emplearon paños con suspensión de alúmina de  $3\mu\text{m}$  y posteriormente paños de OP-A (Struers).

El pulido superficial se evaluó mediante imágenes obtenidas con la punta piramidal de un nanoindentador (Hysitron Triboscope), montado sobre un cabezal de un microscopio de fuerzas atómicas antes de realizar los ensayos. El área barrida fue de  $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ , obteniendo una rugosidad media resultante de la superficie inferior a  $3\text{nm}$ . Posteriormente, las muestras se mantuvieron completamente hidratadas a temperatura ambiente en saliva artificial.

La tenacidad de fractura del esmalte se evaluó a través de indentaciones con un indentador Berkovich, por lo que su valor se determinó de acuerdo

con la ecuación 14. Ello supuso la realización de dos baterías de ensayos con metodologías diferentes: la primera de ellas tenía como objetivo la determinación del módulo de elasticidad del esmalte; la segunda, tenía como misión realizar indentaciones para generar un patrón de grietas que permitiese la determinación de la tenacidad de fractura, según la ecuación 14.

Para la determinación de la tenacidad de fractura y con la finalidad de generar un patrón de grietas visibles que permitiese la aplicación de la ecuación 14, se realizó una fila de 5 indentaciones con el módulo de medida continua de la rigidez de contactos (CSM) hasta una profundidad de penetración máxima de 2 $\mu$ m. Esta profundidad de penetración es suficiente para generar un patrón característico de grietas que se inician en las esquinas de la huella generada por el indentador Berkovich y se propagan a lo largo de la microestructura del esmalte (Figura 25).

Para facilitar la localización de las huellas anteriores, se realizó un alrededor de ellas un mapa de indentaciones que contenía 3 filas con 20 indentaciones con una profundidad de penetración de 300nm, separadas entre ellas por 100 $\mu$ m, usando ciclos de carga-descarga con una amplitud de 2nm y una frecuencia de 45Hz. De estas indentaciones se obtuvieron los valores de E y H del esmalte necesarios para el desarrollo de la ecuación 14.

Para estudiar el efecto del agente blanqueador, los ensayos de indentación se realizaron en diferentes tiempos después de la aplicación del mismo: antes del tratamiento del blanqueamiento (control), inmediatamente después de la aplicación del agente blanqueante (inmediato), 24 horas después de la aplicación del tratamiento (24h) y una semana después de la

aplicación del tratamiento (semana). Durante los tiempos de espera, las muestras se almacenaron en saliva artificial.

La aplicación del agente blanqueante (Opalescence Boost®) se realizó siguiendo el mismo protocolo que en los apartados anteriores.

Una vez finalizada la batería de ensayos, se procedió a metalizar las muestras en una metalizadora con una capa de oro con un espesor de 10nm para la obtención de las imágenes de las huellas realizadas mediante el MEB (SCD 005 Sputter Coater, BalTec, Balzers, Liechtenstein; Hitachi VP-SEM S-3400N, Tokio, Japón). En dichas imágenes se midieron las grietas generadas en los vértices de cada huella desde el centro de la misma. El valor obtenido corresponde a  $c$  para la ecuación 14 explicada anteriormente.

## **ENSAYOS DE RAYADO TRAS LA APLICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AL 38%**

El ensayo de rayado es un método de ensayo mecánico para la caracterización de superficies y recubrimientos que permite determinar su capacidad para resistir el desgaste. Para su medición se emplea un indentador de elevada dureza que genera un surco sobre la superficie que se pretende caracterizar (Figura 27).

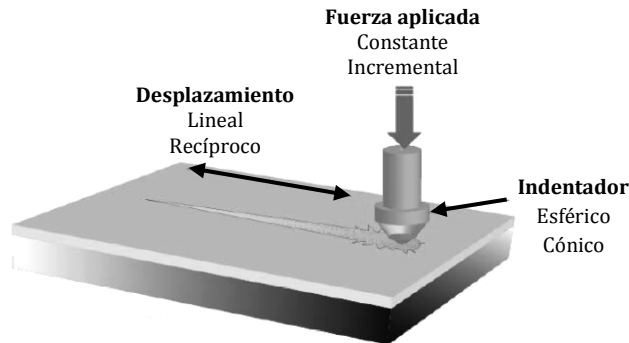


Figura 27. Representación esquemática del surco formado en un ensayo de rayado mediante un indentador.

Los efectos de un ensayo de rayado pueden ir desde la formación de un surco por deformación plástica en un material dúctil, a un desprendimiento en un material frágil, o la disminución de la adhesión de la interfase de un recubrimiento.

Los objetivos del ensayo de rayado fueron:

- Evaluar la resistencia de un material frente al desgaste.
- Determinar el coeficiente de rozamiento.

Durante el ensayo de rayado se aplica una fuerza normal,  $F_N$ , constante o creciente, sobre el indentador, de manera que éste se desplaza simultáneamente una determinada distancia previamente fijada.

Los ensayos de rayado en el presente trabajo se llevaron a cabo utilizando el mismo dispositivo de nanoindentación empleado para el estudio de la tenacidad de fractura (Hysitron Triboscope), y equipado con un dispositivo adicional de medición de fuerza lateral.

Se utilizó una punta cónica de diamante (radio nominal de  $\sim 1\mu\text{m}$ ). La geometría real del indentador fue obtenida mediante un procedimiento de calibración en sílice. Un conocimiento exacto de su geometría permitió asegurar que sólo la zona esférica del indentador participó en el contacto.

Se emplearon dos incisivos bovinos a los que se le aplicaron en la superficie vestibular y el agente blanqueador (Opalescence Boost®) utilizado en los apartados anteriores y siguiendo el mismo protocolo.

Se eliminó la convexidad vestibular de los incisivos mediante su pulido utilizando una pulidora mecánica con irrigación (Labopol-5, Struers) con paños con suspensión de alúmina de  $3\mu\text{m}$  y posteriormente paños de OP-A (Struers).

Para estudiar la evolución del efecto del agente blanqueador, los ensayos de indentación se realizaron en diferentes tiempos después de la aplicación del mismo: antes del tratamiento del blanqueamiento (control), inmediatamente después de la aplicación del agente blanqueante (inmediato), 24 horas después de la aplicación del tratamiento (24h) y una semana después de la aplicación del tratamiento (semana). Durante los tiempos de espera, las muestras se almacenaron en saliva artificial.

En cada muestra se realizaron cinco ensayos de rayado a fuerza constante. Las cargas empleadas fueron:  $100\mu\text{N}$ ,  $300\mu\text{N}$  y  $500\mu\text{N}$ . El recorrido de la punta para cada ensayo fue de  $10\mu\text{m}$  a una velocidad de  $0,3\mu\text{m/s}$ .

Durante cada ensayo, la carga, el desplazamiento y la fuerza lateral fueron comúnmente medidas proporcionando la evolución del coeficiente de rozamiento.

El volumen de material desplazado se determinó a partir de las imágenes de AFM obtenidas de los surcos residuales mediante barridos a 0,2Hz con una resolución de 512x512 líneas. La tasa de desgaste se calculó como el volumen de material desplazado dividido por la distancia de deslizamiento y la carga normal aplicada ( $\text{mm}^3/\text{N}\cdot\text{m}$ ).

### **5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El valor medio y la desviación estándar fue determinada para cada grupo experimental dentro de cada ensayo. La distribución normal de los datos se exploró con el test Kolmogorov-Smirnof.

#### **5.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA TOPOGRAFÍA SUPERFICIAL**

La influencia de la aplicación del gel de peróxido de hidrógeno al 38% y la posterior inmersión en saliva durante una semana en los parámetros RMS y Ra en los tres tercios vestibulares se analizó con el test de ANOVA de medidas repetidas. En caso de ser significativo el efecto, las comparaciones posteriores se realizaron con el test de la t de Student para muestras apareadas.

También se analizó si los valores de RMS y Ra variaban de acuerdo al tercio coronal mediante el test de ANOVA de una vía. En caso de que esto ocurriera las comparaciones posteriores se realizaron con el test de Student Newman Keuls.

### **5.3.2. DETERMINACIÓN DE LA DUREZA Y MÓDULO DE ELASTICIDAD DEL ESMALTE TRAS LA APLICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AL 38%**

Se analizó si los valores de módulo de elasticidad y dureza variaban de acuerdo a la condición experimental analizada (control, inmediatamente tras el blanqueamiento, 24 horas después y transcurrida una semana) mediante el test de ANOVA de medidas repetidas, tanto en la superficie vestibular como en las secciones transversales. En caso de que detectara un efecto significativo, las comparaciones posteriores se realizaron con el test de Student para muestras apareadas.

### **5.3.3. ENSAYOS DE TENACIDAD**

La influencia de la aplicación del blanqueamiento, así como de la inmersión en saliva durante 24 horas o una semana en los valores de tenacidad de fractura se analizó mediante el test de ANOVA de medidas repetidas. En caso de que detectara un efecto significativo, las comparaciones posteriores se realizaron con el test de Student para muestras apareadas.



# RESULTADOS



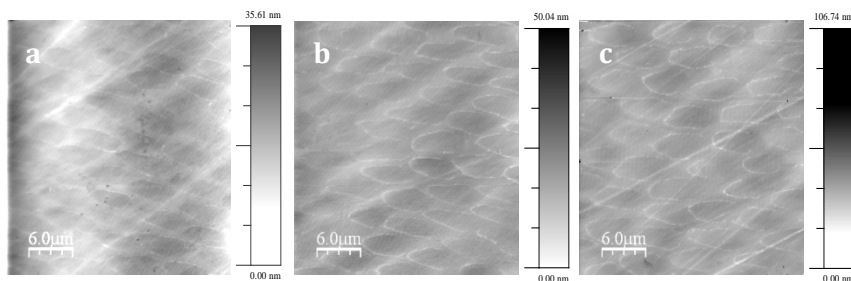


## **6.1. EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LA TOPOGRAFÍA SUPERFICIAL DEL ESMALTE**

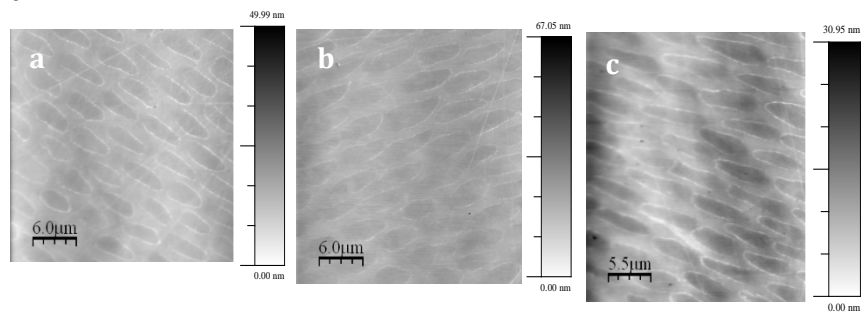
La Figura 28 muestra una imagen de AFM obtenida en las regiones cervical, media e incisal de una de las muestras, antes del blanqueamiento (control), inmediatamente después de la aplicación del agente blanqueante (inmediato) y una semana después de la aplicación (semana).

El aspecto típico de ojo de cerradura revela que el eje longitudinal de los prismas forma un ángulo con la superficie vestibular del esmalte. En las imágenes no se observan diferencias relevantes en el esmalte de los tres tercios vestibulares, ya sea antes del tratamiento blanqueador, inmediatamente después, o transcurrida una semana.

Fila 1



Fila 2



Fila 3

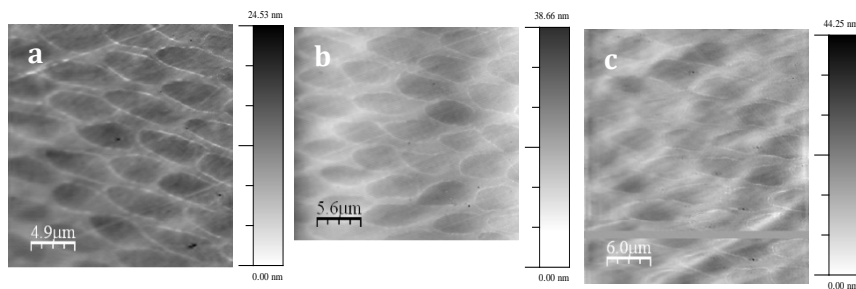
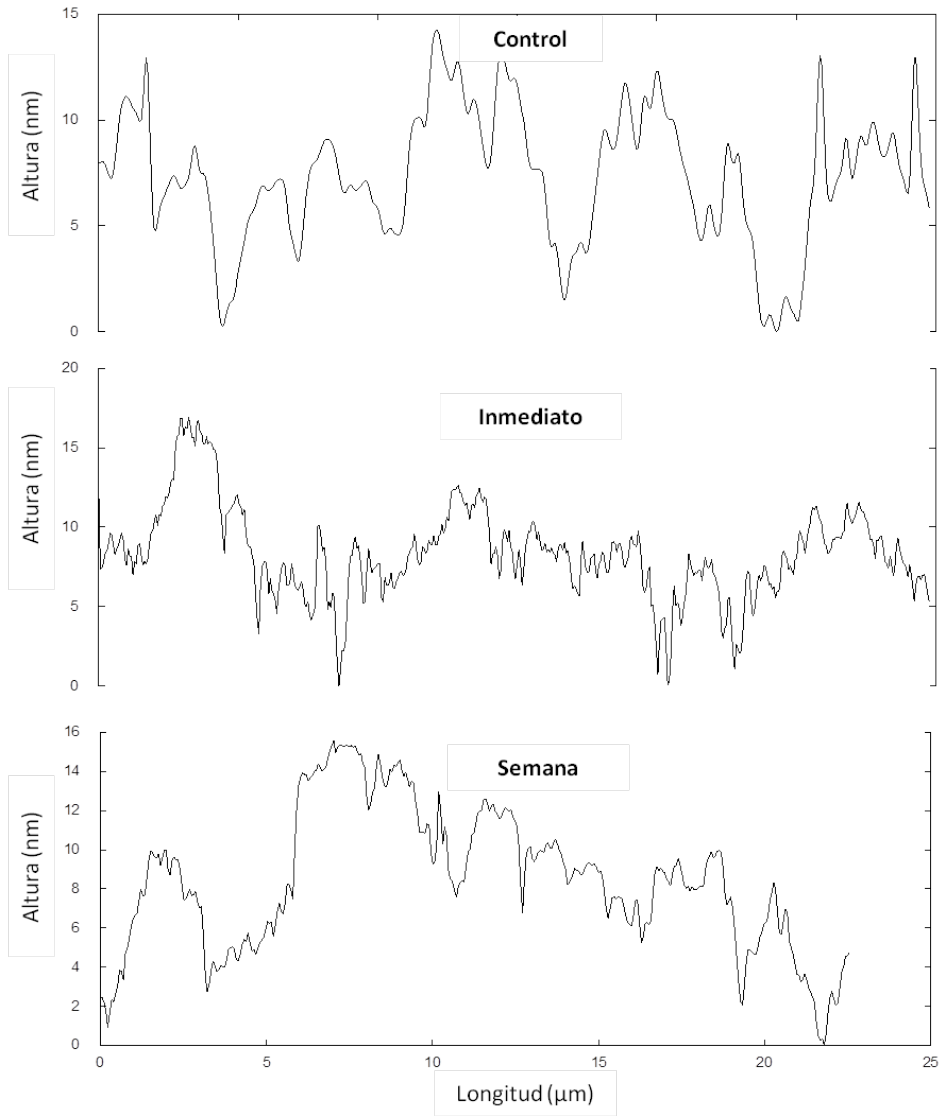


Figura 28. Imagen de AFM que corresponde a la muestra control (fila 1), inmediato (fila 2) y semana (fila 3). Siendo para todos los casos a) tercio cervical, b) tercio medio y c) tercio incisal.

En las Figuras 29, 30 y 31 se muestran los perfiles de la rugosidad RMS obtenida en los tres tercios coronales para las tres situaciones experimentales (control, inmediatamente tras el blanqueamiento y transcurrida una semana).



**Figura 29.** Perfil de la rugosidad RMS obtenida en el tercio incisal para las situaciones experimentales control, inmediatamente tras el blanqueamiento y transcurrida una semana.

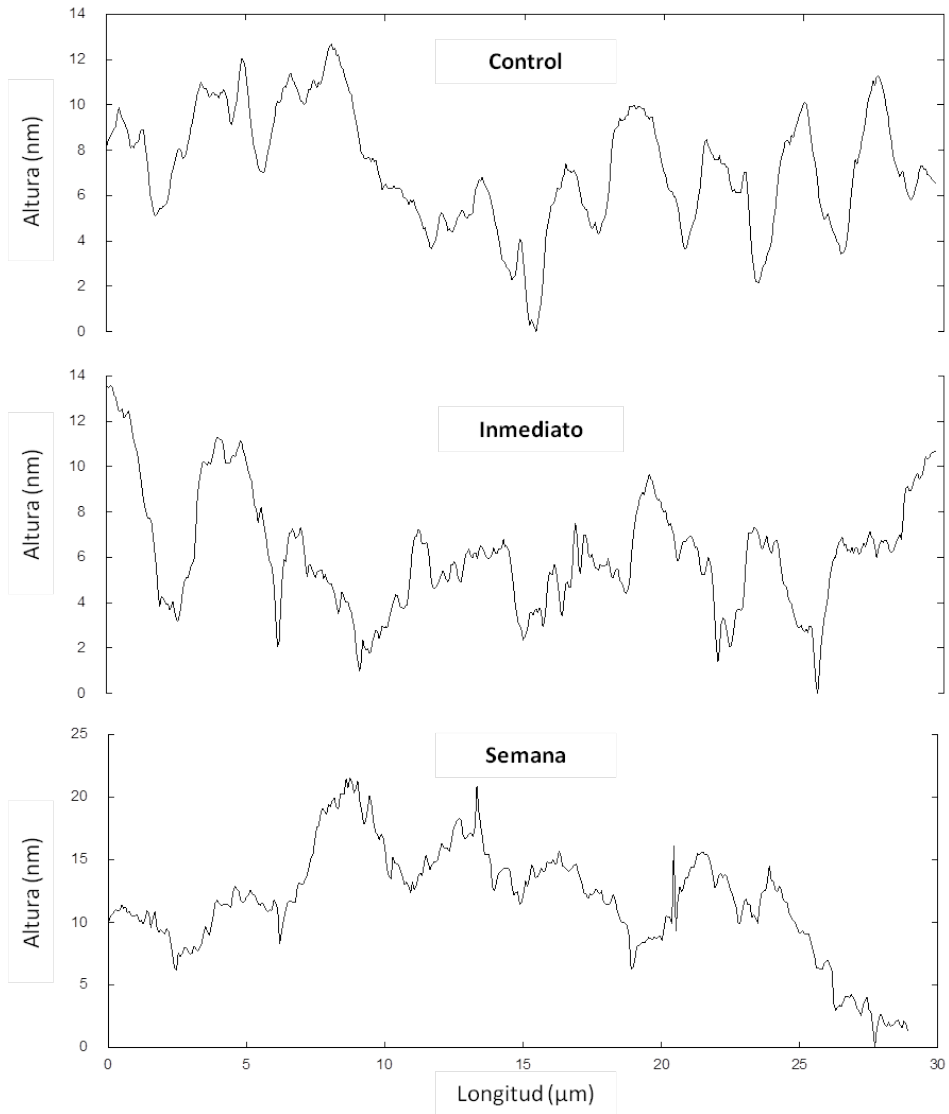
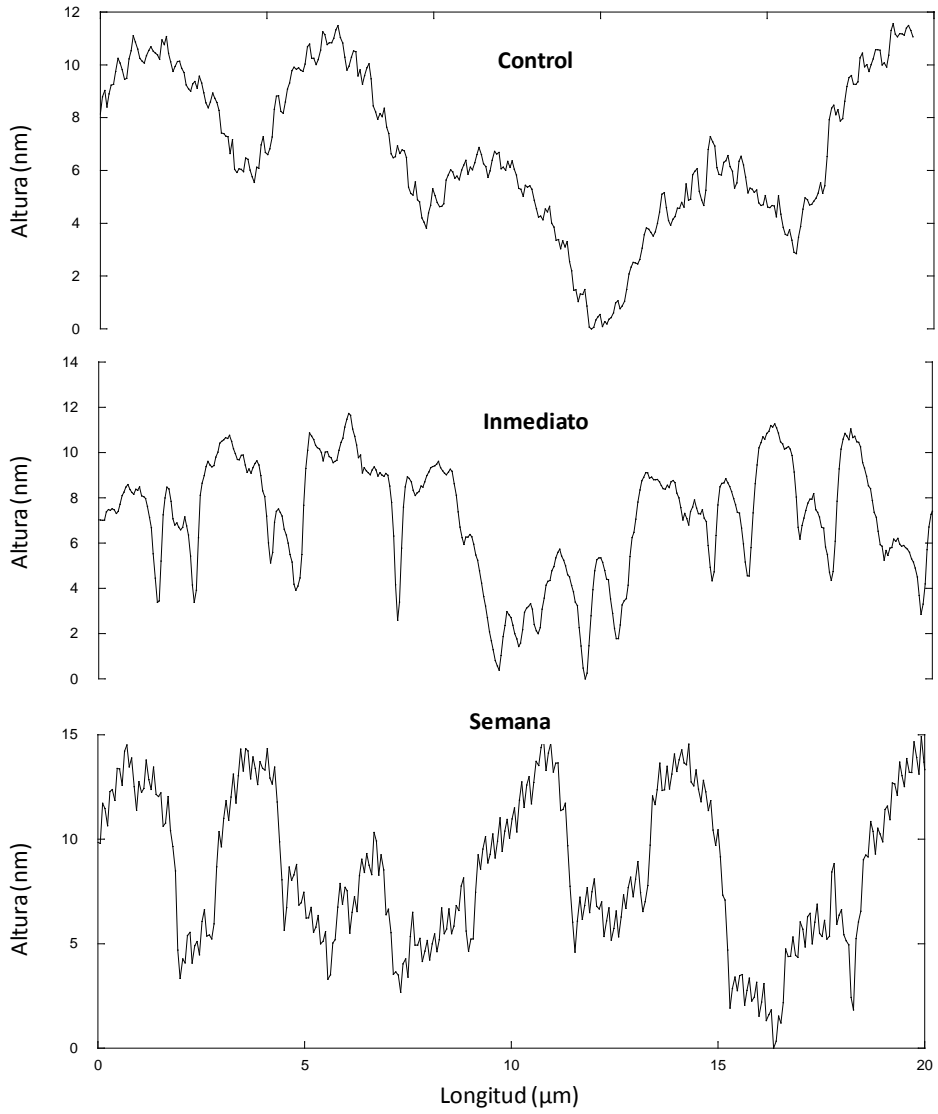


Figura 30. Perfil de la rugosidad RMS obtenida en el tercio medio para las situaciones experimentales control, inmediatamente tras el blanqueamiento y transcurrida una semana.



**Figura 31.** Perfil de la rugosidad RMS obtenida en el tercio cervical para las situaciones experimentales control, inmediatamente tras el blanqueamiento y transcurrida una semana.

A partir de los valores medios de la rugosidad máxima obtenida y mostrados en la Tabla 7, se puede determinar la profundidad de penetración a partir de la cual se considera que los valores de módulo de elasticidad y dureza obtenidos por nanoindentación no están afectados por la rugosidad superficial. Esta profundidad de penetración mínima necesaria para obtener valores fiables de módulo de elasticidad y dureza por indentación se fijó en 300nm.

**Tabla 7. Valores medios y desviación estándar (de) correspondientes al cálculo de la rugosidad máxima del esmalte Sz (nm) en la superficie vestibular del esmalte**

	<b>Control (nm)</b>	<b>Inmediato (nm)</b>	<b>Semana (nm)</b>
<b>Incisal</b>	45,22	107,64	97,83
	106,74	33,29	54,29
	55,05	28,48	72,81
	139,82	37,85	65,46
	18,47	29,58	76,89
<b>x (de)</b>	<b>73,06 ± 49,17</b>	<b>47,36 ± 33,89</b>	<b>73,45 ± 30,78</b>
<b>Medio</b>	33,94	44,18	70,63
	27,72	21,02	37,92
	39,55	67,04	46,72
	39,99	109,51	51,98
	71,95	65	62,77
<b>x (de)</b>	<b>42,63 ± 17,13</b>	<b>61,35 ± 32,73</b>	<b>54,01 ± 23,12</b>
<b>Cervical</b>	40,57	79,74	77,66
	35,83	63,56	40,94
	77,55	65,08	44,56
	42,08	27,28	58,71
	23,52	24,59	73,12
<b>x (de)</b>	<b>43,91 ± 20,16</b>	<b>52,05 ± 24,68</b>	<b>58,99 ± 25,96</b>

Los valores medios de RMS y Ra para las tres condiciones experimentales y los tres tercios vestibulares con su desviación estándar están reflejados en la Tabla 8 y 9.

**Tabla 8. Valores medios y desviación estándar (de) obtenidos para RMS en nm para cada tercio coronal y para las tres condiciones experimentales**

	RMS		
	Control	Inmediato	Semana
	$\bar{x}$ (de)	$\bar{x}$ (de)	$\bar{x}$ (de)
<b>Incisal</b>	2,76 (0,51) <b>a1</b>	3,56 (0,62) <b>b2</b>	3,77 (0,33) <b>c1</b>
<b>Medio</b>	2,69 (0,35) <b>a1</b>	3,15 (0,39) <b>b1</b>	4,20 (0,26) <b>c2</b>
<b>Cervical</b>	3,33 (0,38) <b>a2</b>	3,68 (0,47) <b>b2</b>	4,97 (0,68) <b>c3</b>

Diferente letra dentro de la misma fila implica que los valores son estadísticamente diferentes.  
 Diferente número dentro de la misma columna implica que los valores son estadísticamente distintos.

De acuerdo al análisis estadístico la condición experimental (control, inmediatamente después del blanqueamiento y transcurrida una semana) influyó en los valores medios de RMS en cada uno de los tercios incisal, medio y cervical ( $p < 0.001$ ). En los tres tercios, los valores de Ra aumentaron significativamente tras el blanqueamiento y tras la conservación en saliva durante una semana ( $p < 0.05$ ).

En cuanto a los valores de RMS de acuerdo al tercio coronal evaluado, antes de realizar el blanqueamiento (control) eran estadísticamente superiores en el tercio cervical. Inmediatamente después de someter a las muestras al blanqueamiento en el tercio medio eran estadísticamente inferiores y tras una semana de inmersión en saliva artificial se detectó que los valores de RMS eran estadísticamente distintos en los tres tercios, aumentando significativamente desde incisal hasta cervical.



En relación a los valores de Ra (Tabla 9), influyó la condición experimental (control, inmediatamente después del blanqueamiento y transcurrida una semana) en los valores medios de Ra en cada uno de los tercios evaluados ( $p < 0.001$ ).

**Tabla 9. Valores medios y desviación estándar (de) obtenidos para Ra en nm para cada tercio coronal y para las tres condiciones experimentales**

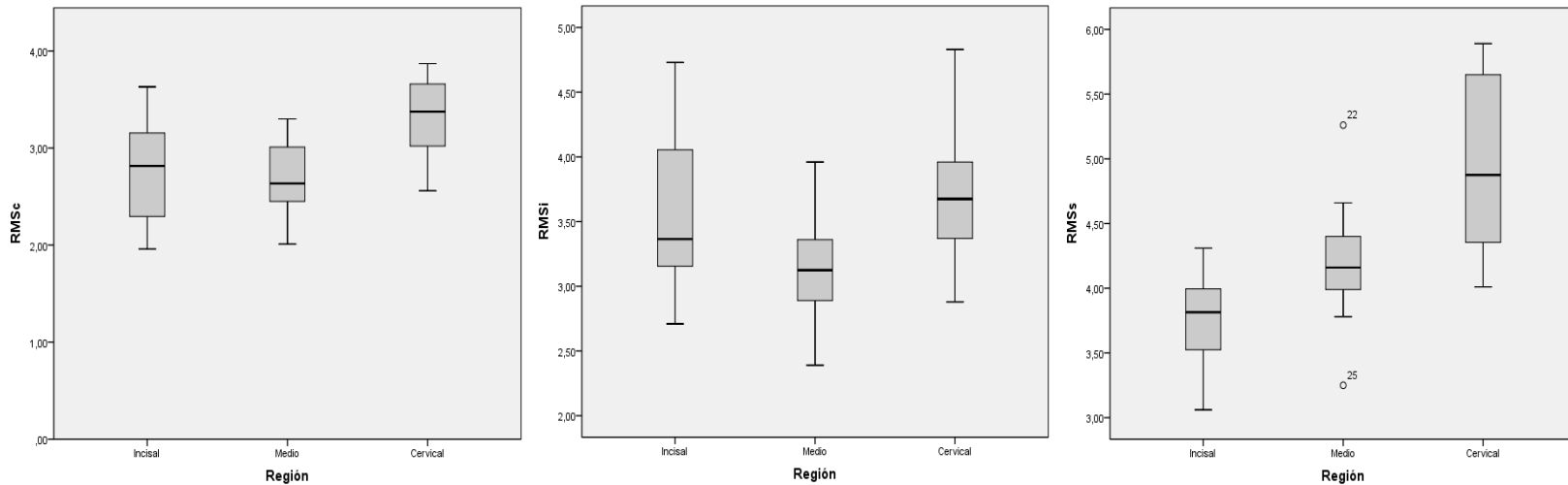
	Ra		
	Control	Inmediato	Semana
	$\bar{x}$ (de)	$\bar{x}$ (de)	$\bar{x}$ (de)
<b>Incisal</b>	2,03 (0,37) <b>a1</b>	2,62 (0,57) <b>b1</b>	3,05 (0,27) <b>c1</b>
<b>Medio</b>	2,11 (0,32) <b>a1</b>	2,91 (0,35) <b>b2</b>	4,08 (0,55) <b>c2</b>
<b>Cervical</b>	2,55 (0,27) <b>a2</b>	3,22 (0,41) <b>b3</b>	4,84 (0,57) <b>c3</b>

Diferente letra dentro de la misma fila implica que los valores son estadísticamente diferentes.  
Diferente número dentro de la misma columna implica que los valores son estadísticamente distintos.

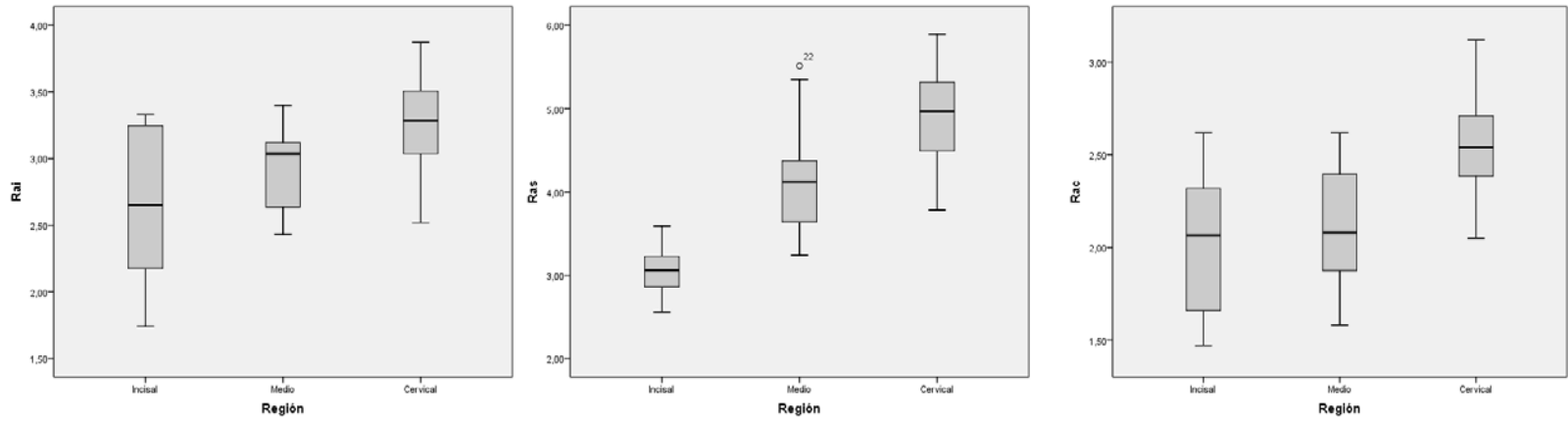
Al igual que ocurrió con los valores de RMS, los de Ra aumentaron estadísticamente tras el blanqueamiento y tras la conservación en saliva durante una semana ( $p < 0.05$ ).

Además, los valores de Ra en las tres condiciones experimentales estudiadas variaban de acuerdo al tercio coronal evaluado ( $p < 0.001$ ). Cuando Ra se determinó antes de realizar el blanqueamiento (control) los valores eran estadísticamente superiores en el tercio cervical. Sin embargo, tras someter a las muestras al blanqueamiento y a una semana de inmersión en saliva artificial se detectó que los valores de Ra eran estadísticamente distintos en los tres tercios, aumentando desde incisal hasta cervical.

**Figura 32. Diagrama de caja de los valores obtenidos de RMS para todas las situaciones experimentales (Control, RMSc; Inmediato, RMSi; Semana, RMSs) analizadas en las regiones incisal, medio y cervical.**



**Figura 33. Diagrama de caja de los valores obtenidos de Ra para todas las situaciones experimentales (Control, Rac; Inmediato, Rai; Semana, Ras) analizadas en las regiones incisal, medio y cervical.**



## **6.2. EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN EL COMPORTAMIENTO MECÁNICO DEL ESMALTE**

En este trabajo se han tratado de analizar las variaciones de dureza y módulo de elasticidad, tenacidad de fractura y resistencia al rayado que experimenta el esmalte por efecto del peróxido de hidrógeno al 38% y cómo influye el tiempo transcurrido tras el tratamiento en su comportamiento mecánico.

### **6.2.1. DETERMINACIÓN DE LA DUREZA Y MÓDULO DE ELASTICIDAD DEL ESMALTE TRAS LA APLICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AL 38%.**

Los valores medios de módulo de elasticidad y dureza, así como su desviación estándar obtenidos en la superficie vestibular del esmalte y en secciones transversales para las distintas condiciones experimentales se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10. Valores medios y desviación estándar (de) del módulo de elasticidad y dureza (GPa) en la superficie vestibular y sección transversal del esmalte.**

		SUPERFICIE VESTIBULAR	SECCIÓN TRANSVERSAL
		$\bar{x}$ (de)	$\bar{x}$ (de)
Módulo de elasticidad (GPa)	Control	91,05 (6,82) a	84,77 (3,61) a
	Inmediato	86,82 (7,32) b	66,68 (5,99) b
	24 horas	84,52 (8,27) c	63,06 (4,37) c
	Semana	75,22 (6,12) d	61,51 (4,39) d
Dureza (GPa)	Control	4,62 (0,48) a	4,62 (0,49) a
	Inmediato	4,46 (0,53) b	3,50 (0,75) b
	24 horas	4,30 (0,45) c	3,21 (0,45) c
	Semana	3,60 (0,56) d	3,01 (0,44) d

Diferente letra dentro de la misma columna para el módulo de elasticidad o para la dureza, indica que los resultados son estadísticamente distintos.

Las Figuras 34 y 35 muestran los resultados obtenidos para módulo de elasticidad y dureza del esmalte medidos en la superficie vestibular en las fases de control, inmediatamente tras el blanqueamiento, transcurridas 24h y transcurrida una semana tras la aplicación del gel de blanqueamiento.

Las Figuras 36 y 37 muestran los resultados obtenidos para la sección transversal.

## SUPERFICIE VESTIBULAR

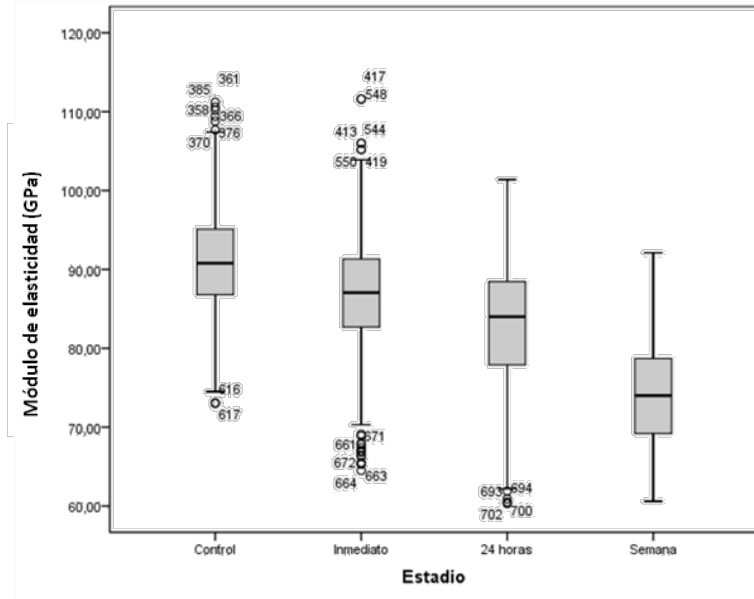


Figura 34. Diagrama de caja de los valores obtenidos del módulo de elasticidad en la superficie vestibular en las fases de control, inmediatamente tras el blanqueamiento, transcurridas 24h y transcurrida una semana tras la aplicación del blanqueamiento.

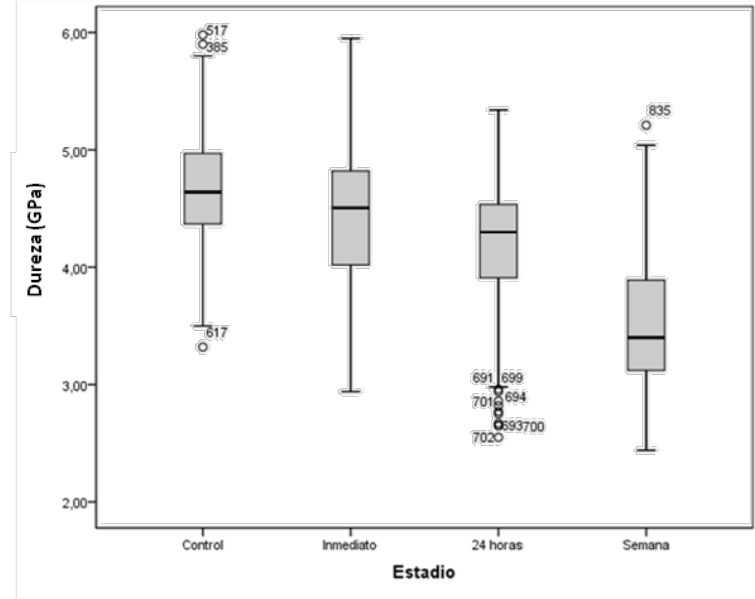


Figura 35. Diagrama de caja de los valores obtenidos de la dureza en la superficie vestibular en las fases de control, inmediatamente tras el blanqueamiento, transcurridas 24h y transcurrida una semana tras la aplicación del blanqueamiento

## SECCIÓN TRANSVERSAL

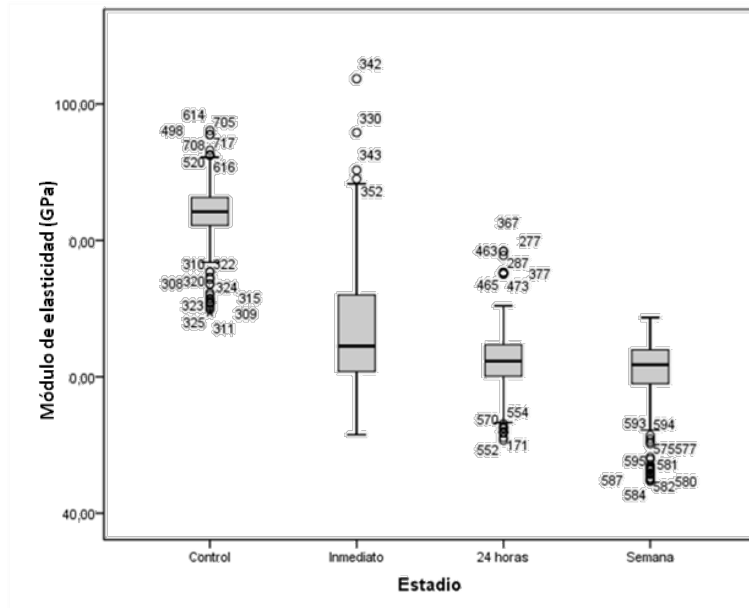


Figura 36. Diagrama de caja de los valores obtenidos del módulo de elasticidad obtenidos en la sección transversal en las fases de control, inmediatamente tras el blanqueamiento, transcurridas 24h y transcurrida una semana tras la aplicación del blanqueamiento.

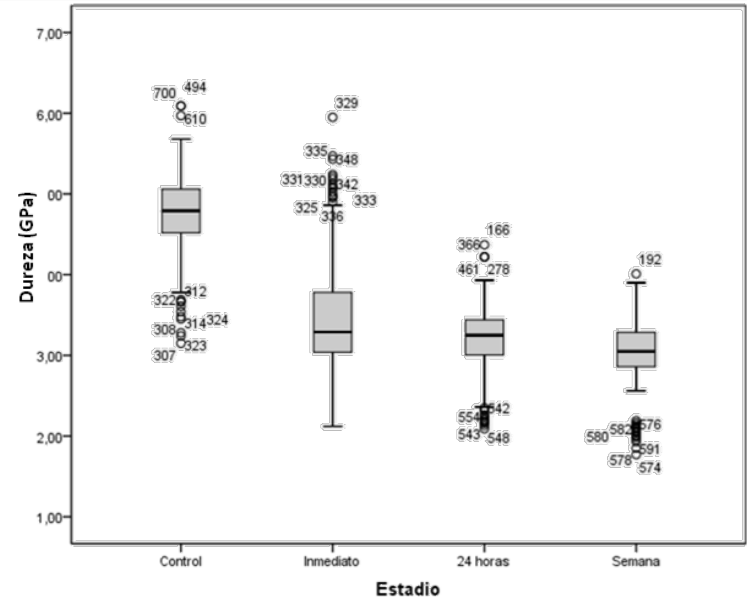


Figura 37. Diagrama de caja de los valores obtenidos de la dureza en la sección transversal en las fases de control, inmediatamente tras el blanqueamiento, transcurridas 24h y transcurrida una semana tras la aplicación del blanqueamiento.

Cuando se evaluaron el módulo de elasticidad y la dureza en el esmalte expuesto en la superficie vestibular y transversalmente, ambas propiedades estaban influenciadas por la condición experimental analizada ( $p < 0.001$ ). Tanto los valores de módulo de elasticidad como de dureza disminuyeron significativamente tras la aplicación del peróxido de hidrógeno al 38%, tras la inmersión en saliva durante 24 horas y si se determinaban una semana tras el blanqueamiento ( $p < 0.05$ ).

### 6.2.2. TENACIDAD DE FRACTURA TRAS LA APLICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AL 38%

La Figura 38 representa un ejemplo de unas curvas de fuerza-desplazamiento correspondientes a las indentaciones con la metodología CSM para una penetración máxima de  $2\mu\text{m}$ .

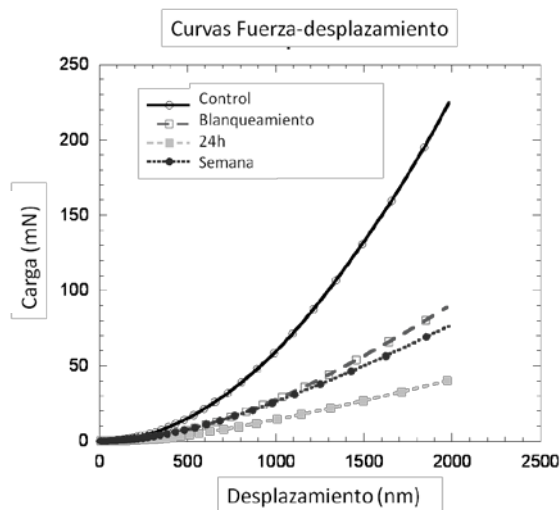
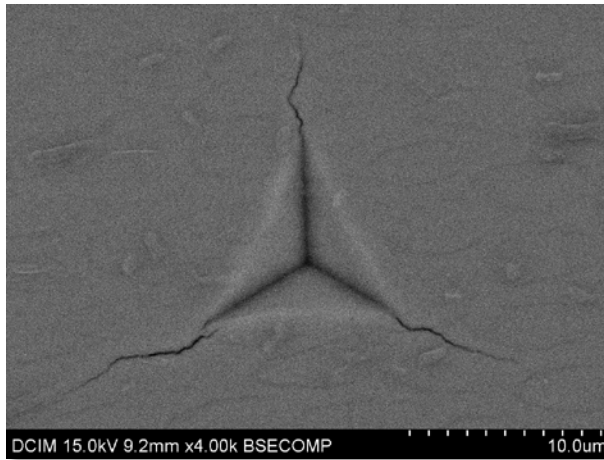


Figura 38. Ejemplo de curva de fuerza-desplazamiento para las fases de control, inmediatamente tras la aplicación del blanqueamiento, transcurridas 24 horas y transcurrida una semana desde la aplicación del gel.

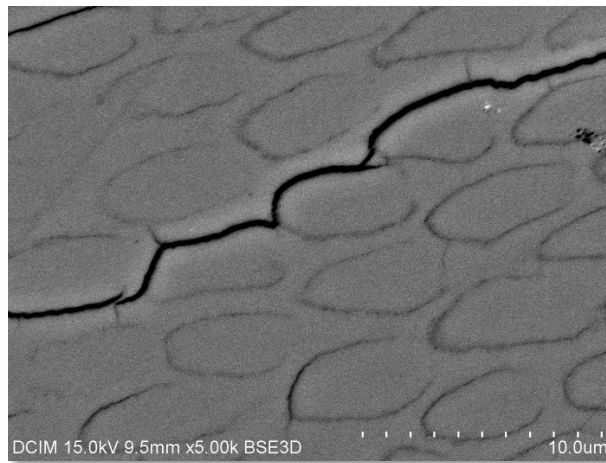


Todas las huellas residuales fueron analizadas mediante MEB para verificar si el proceso de agrietamiento fue evidente durante las indentaciones para una penetración máxima de  $2\mu\text{m}$ . La Figura 39 muestra una típica huella residual y la Figura 40 muestra la trayectoria que sigue la grieta entre los prismas de esmalte.



**Figura 39. Típica huella agrietada obtenida mediante nanoindentación realizada a una profundidad máxima de 2000nm.**

Las huellas residuales para todas las condiciones experimentales analizadas mostraron un patrón de grietas similar. Esto permitió aplicar las ecuaciones descritas en la introducción (ecuaciones 11-14) para determinar la tenacidad de fractura en la superficie vestibular del esmalte.



**Figura 40. Imagen con MEB de la trayectoria de una grieta generada con indentación entre los prismas de esmalte.**

La Tabla 11 muestra el promedio y de los valores medidos de la longitud de las grietas medidas mediante micrográficas MEB y resume los resultados de tenacidad de fractura tenacidad de fractura empleando las ecuaciones 11-13.

**Tabla 11. Valores medios y desviación estándar (de) de la tenacidad de fractura (MPa  $\sqrt{m}$ ) obtenidos aplicando las ecuaciones 11 a la 13**

Estadio	c ( $\mu\text{m}$ )	a ( $\mu\text{m}$ )	K <sub>c</sub> ec. 11 (MPa $\sqrt{m}$ )	K <sub>c</sub> ec. 12 (MPa $\sqrt{m}$ )	K <sub>c</sub> ec.13 (MPa $\sqrt{m}$ )
Control	12.36 (2.84)	6.67 (2.25)	2.31 (0.02)	0.21 (0.01)	0.30 (0.02)
Inmediato	9.91 (3.20)	5.97 (2.70)	3.03 (0.02)	0.26 (0.01)	0.44 (0.01)
24h	8.20 (3.26)	4.36 (2.56)	1.93 (0.03)	0.17 (0.02)	0.24 (0.01)
Semana	11.01 (1.72)	5.56 (1.23)	2.15 (0.01)	0.23 (0.01)	0.28 (0.01)

El análisis de los resultados de tenacidad de fractura obtenidos (Tabla 12), aplicando la ecuación 14 explicada en material y métodos, para cada condición experimental reveló que había diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ).

La tenacidad de fractura aumentó significativamente tras la aplicación de peróxido de hidrógeno al 38% sin que la medición a las 24 horas supusiera una variación significativa de los valores obtenidos previamente. Por el contrario, tras la conservación en saliva artificial durante una semana se obtuvieron unos resultados de tenacidad de fractura estadísticamente superiores a los de las demás condiciones experimentales.

**Tabla 12. Valores medios y desviación estándar (de) de la tenacidad de fractura (MPa  $\sqrt{m}$ ) aplicando la ecuación 14 para cada una de las situaciones experimentales (control inmediatamente después de aplicar el gel, transcurridas 24 horas y transcurrida 1 semana desde la aplicación del gel)**

	c ( $\mu\text{m}$ )	a ( $\mu\text{m}$ )	E (GPa)	H (GPa)	$K_{Ic} = 1.073 \cdot x_v \left(\frac{a}{l}\right)^{1/2} \left(\frac{E}{H}\right)^{2/3} \frac{P}{c^{3/2}}$
<b>CONTROL</b>	12.36 (2.84)	6.67 (2.25)	91,38 (7,44)	4,66 (0,48)	2,62 (0,52) <b>a</b>
<b>INMEDIATO</b>	9.91 (3.20)	5.97 (2.70)	86,47 (8,93)	4,43 (0,61)	3,98 (0,35) <b>b</b>
<b>24 H</b>	8.20 (3.26)	4.36 (2.56)	83,63 (9,07)	4,21 (0,55)	4,02 (0,41) <b>b</b>
<b>SEMANA</b>	11.01 (1.72)	5.56 (1.23)	74,22 (6,76)	3,54 (0,59)	4,92 (0,46) <b>c</b>

Diferente letra dentro de la misma columna, indica que los resultados son estadísticamente distintos.

### 6.2.3. RESISTENCIA AL RAYADO TRAS LA APLICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AL 38%

La Figura 41 muestra dos rayas típicas realizadas en la superficie vestibular del esmalte. En la Figura 41a es posible observar la típica estructura de “escama de pescado” característica de la exposición oblicua del esmalte (plano pulido). En estas estructuras elípticas, se pueden identificar la cola y cabeza del prisma de esmalte. La Figura 41b muestra una evolución característica del desplazamiento normal y el coeficiente de rozamiento obtenido en las diferentes regiones microestructurales (cabeza, cola y vaina).

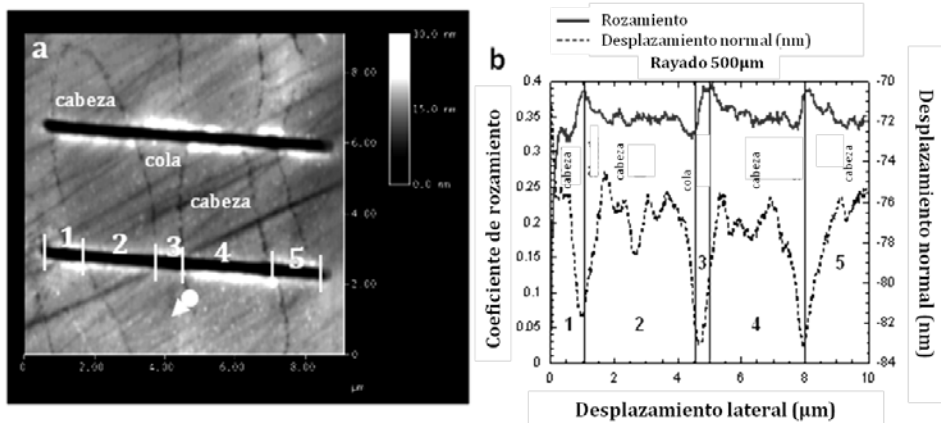


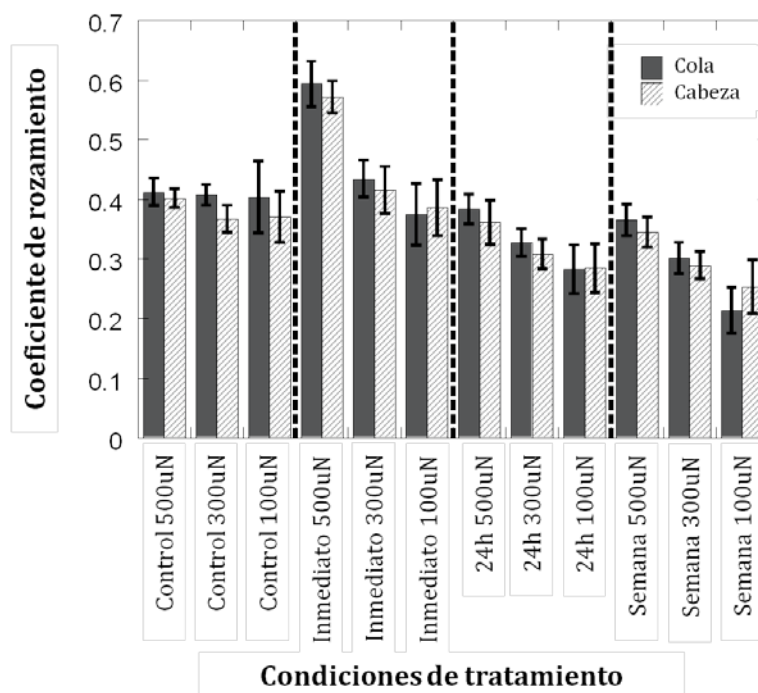
Figura 41. Ejemplo de rayado realizado en la superficie vestibular del esmalte (fase de control y carga normalizada de 500µN): a) Imagen de las rayas; b) Desplazamiento normal y coeficiente de rozamiento frente al desplazamiento lateral.

En la zona de transición entre ambas áreas, la vaina, caracterizada por un alto contenido en proteínas, ambas propiedades (coeficiente de fricción y desplazamiento normal) exhibieron valores más elevados que los obtenidos en la cabeza y cola de los prismas.

La Figura 42, muestra el coeficiente de rozamiento para la superficie vestibular del esmalte para todas las condiciones experimentales y localizaciones microestructurales. En general, la región de la cola exhibió un coeficiente de rozamiento ligeramente superior que el de la cabeza. Adicionalmente, para la carga más elevada (500uN) se obtuvo el mayor coeficiente de rozamiento. El coeficiente de rozamiento en el control se mantuvo constante independientemente de la carga aplicada.

Cuando se comparó el coeficiente de rozamiento para las distintas condiciones experimentales después de la aplicación del blanqueamiento, no se observó una tendencia evidente.

**Figura 42. Valores medios y desviación estándar (de) del coeficiente de rozamiento (uN) para cada región y condición experimental**

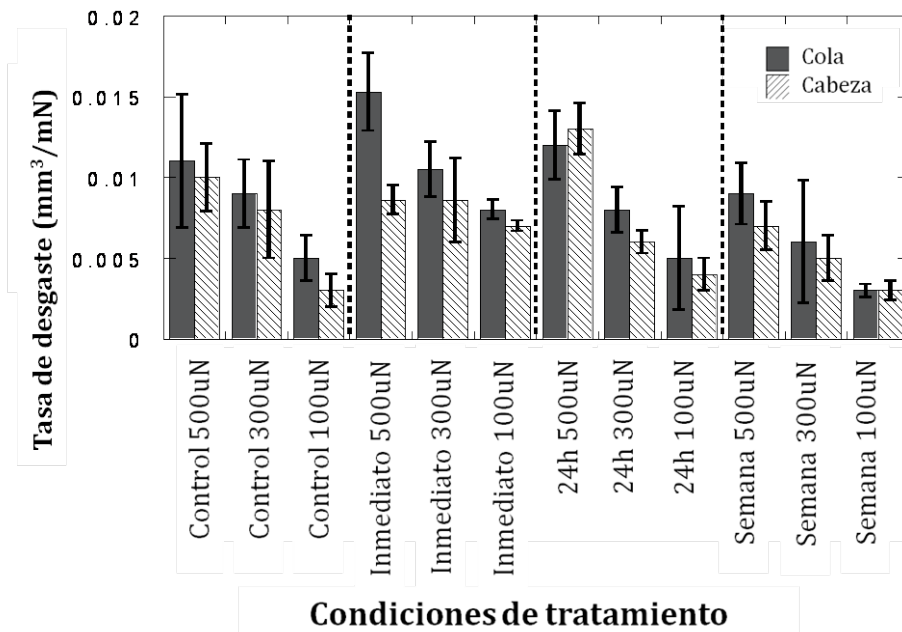


La Figura 43 mostró la tasa de desgaste para la superficie vestibular del esmalte para todas las condiciones experimentales.

En general, la región de la cola mostró valores más elevados que los de la región de la cabeza del prisma y, a su vez, la carga más elevada (500uN) mostró el valor más elevado de tasa de desgaste.

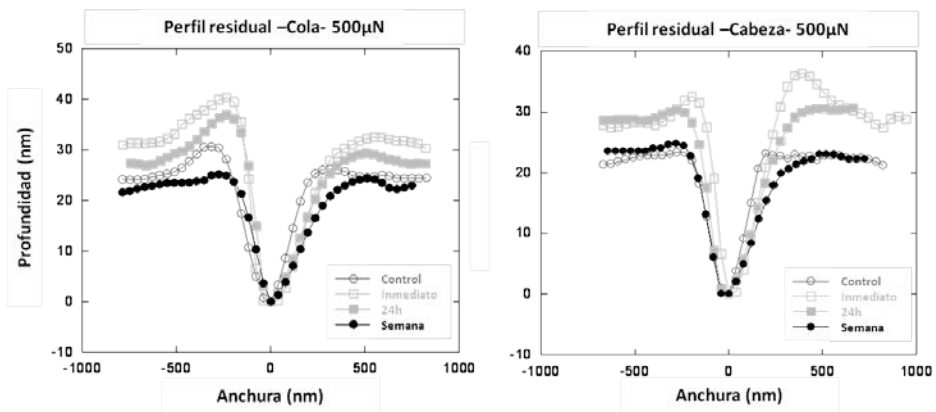
La tasa de desgaste para ambas regiones microestructurales aumentó inmediatamente después de la aplicación del blanqueamiento. Sin embargo, una semana después de la aplicación del peróxido de hidrógeno, la tasa de desgaste recuperó los valores originales de la condición experimental de control.

**Figura 43. Valores medios y desviación estándar (de) de la tasa de desgaste ( $\text{mm}^3/\text{mN}$ ) para cada región y situación del tratamiento**



La Figura 44 muestra el perfil residual caracterizado por las acumulaciones en el borde del surco la cual es una muestra de la deformación plástica sufrida por el esmalte.

**Figura 44. Ejemplo del perfil residual transversal del test de rayado con las diferentes condiciones experimentales a una carga de 500µN en las zonas microestructurales de cola y cabeza del prisma de esmalte**





**DISCUSIÓN**





En el presente trabajo de investigación todos los ensayos se realizaron en esmalte procedente de dientes bovinos, pues se considera que los resultados obtenidos en ellos son comparables a los procedentes de dientes humanos, siempre y cuando sean manipulados y preparados de manera correcta. Por este motivo muchos trabajos de investigación emplean este tipo de dientes (Tam, Lim y Khanna, 2005; Hanning y cols., 2005; Lee y cols., 2006; Bizhang y cols., 2006).

La diferencia más relevante que se ha descrito es que el esmalte bovino muestra una mayor presencia de sustancia interprismática y estructuras alrededor del prisma con forma fibrilar (Laurance-Young y cols., 2011). Sin embargo, Fonseca y cols., (2008) al evaluar la influencia de estas diferencias microestructurales en la dureza del esmalte de dientes bovinos en comparación con los dientes humanos documentaron que no había efectos relevantes.

## **7.I. CAMBIOS EN LA TOPOGRAFÍA SUPERFICIAL DEL ESMALTE EXPUESTO A PEROXIDO DE HIDRÓGENO AL 38%**

Hay una gran controversia documentada en la literatura respecto a los efectos del blanqueamiento a corto y largo plazo en los tejidos duros dentales, particularmente en el esmalte. Numerosos autores han estudiado los efectos del blanqueamiento dental empleando diferentes agentes a diferentes concentraciones (Haywood y Heymann, 1989; Haywood y cols., 1990; McGuckin, Babin y Meyer, 1992; Bitter, 1992; Lopes y cols., 2002; Türkun y cols., 2002; White y cols., 2002; Hosoya y cols., 2003; Yurdukuru, Akoren y Unsal, 2003; Cavalli y cols., 2004; Sulieman y cols., 2004; Yeh y cols., 2005; Basting y cols., 2005; Bistey y cols., 2007; Pinto y cols., 2008; Sasaki y cols., 2009; Azrak y cols., 2010).

En el presente trabajo, el efecto de los agentes blanqueadores en la rugosidad superficial del esmalte se analizó utilizando los parámetros RMS y Ra, de acuerdo con lo realizado previamente por otros investigadores (Hegedüs y cols., 1999; Nizam y cols., 2005; Faraoni-Romano y cols., 2008; Mahringer y cols., 2009; Pedreira de Freitas, Cardoso y Brossi, 2010; Hasab Mahmoud y cols., 2010; Pedreira de Freitas y cols., 2011; Sun y cols., 2011; Sa y cols., 2012b).

El modo de contacto intermitente del AFM tiene la ventaja de evitar que la superficie sometida a estudio sufra un cambio en la topografía superficial por el propio efecto de la punta. Esto es importante cuando se manipulan muestras cuyas estructuras han sido sutilmente modificadas mediante procedimientos de blanqueamiento (Park y cols., 1996; El Feninat y cols., 2001).

En nuestros resultados, tras la aplicación del agente blanqueante, los valores medidos de RMS y Ra sufrieron un ascenso en los tres tercios coronales. Cabe destacar que no se ha encontrado bibliografía en la que se hagan análisis a una semana de la aplicación del gel de blanqueamiento como se ha realizado en el presente trabajo de investigación ni distinción entre las regiones de la superficie vestibular del esmalte. Esto implica que sólo se pueden comparar los resultados obtenidos inmediatamente después de haber sido aplicado el gel de blanqueamiento en la región media.

Nuestros resultados coinciden con los previamente descritos por otros autores. Hegedüs y cols., (1999) al evaluar los cambios generados en el esmalte al aplicar peróxido de hidrógeno al 30% durante 28 horas obtuvo

valores de RMS y Ra para la superficie tratada más elevados que en las muestras control.

Nizam y cols., (2005) alcanzaron resultados similares al aplicar 30% de peróxido de hidrógeno durante 24 horas en la superficie del esmalte y la dentina. Ambas estructuras dentarias mostraron un aumento en los valores de RMS y Ra tras la aplicación del blanqueante.

Incluso en concentraciones bajas de peróxido de hidrógeno se han hallado alteraciones en la rugosidad del esmalte. Esto lo observaron Mahringer y cols., (2009), quienes apreciaron un aumento de la profundidad de la unión interprismática así como de los valores de RMS y Ra al aplicar 30% de peróxido de carbamida sobre el esmalte durante 1 hora.

Pedreira de Freitas, Cardoso y Brossi (2010) midieron con AFM en el esmalte los cambios morfológicos tras la aplicación de peróxido de hidrógeno al 35% encontrando también un aumento significativo en los valores de RMS y Ra.

Sun y cols., (2011) mostraron resultados parecidos al aplicar en el esmalte 30% de peróxido de hidrógeno durante 4 horas.

En los dientes permanentes, los prismas están orientados en ángulo recto hacia la superficie de la dentina. En los dos tercios coroneales (incisal y medio) los prismas cambian gradualmente hacia una dirección cada vez más oblícua hasta que en la región del borde incisal son casi verticales, mientras que en el tercio cervical los prismas se desvían de la horizontal a una dirección apical. Este hecho sumado a que la corona de los centrales son convexos hace que los tercios incisal y medio estén más expuestos al desgaste por abrasión y masticación y, por tanto, ofrezcan una superficie

más erosionada que la del tercio cervical (White y cols., 2001; Gómez de Ferraris 2009). En nuestro trabajo, los valores de RMA y Ra aumentaron en cada tercio inmediatamente después de la aplicación del blanqueamiento y transcurrida una semana desde su aplicación, obteniendo los valores más elevados en la región cervical. Esto puede ser debido a que el esmalte en el tercio cervical en las muestras control es más rugoso *per se*.

Muchos de los geles de blanqueamiento a alta concentración de peróxido de hidrógeno contienen un  $\text{pH} < 5.5$ . El tampón fosfato juega un papel fundamental. En situaciones de un pH de 6 la saliva está sobresaturada de fosfato con respecto a la hidroxiapatita, pero cuando el pH se reduce por debajo del pH crítico (5.5), como sucede cuando se aplica peróxido de hidrógeno a alta concentración, la hidroxiapatita comienza a disolverse, y los fosfatos liberados tratan de restablecer el equilibrio perdido, lo que dependerá en último término del contenido de iones de fosfato y calcio del medio circundante (Llena-Puy, 2006).

Joiner (2007), puntualizó que la acidez del peróxido de hidrógeno podría ser el responsable del efecto desmineralizador. Teniendo en cuenta el efecto del peróxido de hidrógeno, la reacción en la superficie entre el peróxido y los componentes orgánicos pueden dar como resultado alteraciones morfológicas importantes, tales como la formación de poros y cráteres en el esmalte superficial (Seghi y Denry, 1992; Nathoo y Gaffar, 1995; Potocnik, Kosec y Gaspersic, 2000; Akal y cols., 2001; Cavalli y cols., 2004; Basting, Rodrigues y Serra 2004; Attin y cols., 2004; Rodrigues y cols., 2005).

Britter y Sanders (1993), junto con otros numerosos autores, coinciden en sus resultados en que el peróxido de hidrógeno afecta a la estructura del esmalte dejando una superficie más rugosa y porosa (Hegedüs y cols.,

1999; Attin y cols., 2005; Oshiro y cols., 2007; Faraoni-Romano, Turssi y Serra, 2007; Ulukapi 2007; da Costa y Mazur, 2007).

Sun y cols., (2011) compararon la influencia de dos peróxidos de hidrógeno al 30% con pH distintos (3.6 y 7.0) sobre la superficie del esmalte aplicados durante 4 horas. Los resultados mostraron que aunque ambos desmineralizaban el esmalte, la superficie se mostró más porosa en los especímenes a los que se les aplicó el blanqueamiento más ácido.

Similares resultados obtuvieron Sa y cols., (2012) al medir el efecto desmineralizador de dos geles de blanqueamiento de peróxido de hidrógeno al 35% y 38% con un pH de 4.03 y 7.52 respectivamente. El blanqueamiento se aplicó 2 veces con una semana de diferencia y un tiempo total de 90 minutos. Los resultados obtenidos mostraron que la desmineralización del esmalte fue patente en ambos casos aunque mucho más acentuada en las muestras sometidas al blanqueamiento con pH de 4.03.

En nuestro trabajo se ha empleado Opalescece Boost peróxido de hidrógeno al 38% con un pH de 7.0, según las instrucciones del fabricante. El aumento de los valores de RMS y Ra que muestran nuestros resultados refleja un aumento en la porosidad superficial como consecuencia de una desmineralización y que se ha obtenido en trabajos similares de otros autores con pH de 7.0. Viendo las conclusiones dadas en otros trabajos respecto a la acidez de determinados geles de blanqueamiento, se debería tener en cuenta la aplicación del ácido ortofosfórico sobre los dientes blanqueados, ya que el efecto descalcificante podría ser exponencial. Esto también podríamos extrapolarlo a las bebidas ácidas como los cítricos y bebidas carbonatadas que contienen un  $\text{pH} < 5.5$  (Barbour y cols., 2003; Shellis y cols., 2010).

Las mediciones realizadas una vez transcurrida una semana desde la aplicación del blanqueamiento, resultaron tener los valores más elevados tanto para RMS como para Ra en todas las regiones medidas.

Este resultado se muestra en las Figuras 29, 30 y 31, donde la distribución asimétrica de la superficie aumenta cuando se aplica el blanqueamiento, siendo más acentuada en los perfiles obtenidos transcurrida una semana. Esto puede deberse a un aumento en la formación de poros y pequeñas grietas.

Esta alteración de la rugosidad también lo obtuvieron Hegedus y cols., (2007). En su trabajo evaluaron mediante AFM el efecto del peróxido de hidrógeno al 30% aplicado durante 28 horas y lo compararon con esmalte no blanqueado. En ambos grupos observaron la presencia de grietas en el esmalte, pero éstas fueron más profundas en el esmalte blanqueado. Concluyeron que el peróxido de hidrógeno es capaz de causar alteraciones superficiales del esmalte afectando a la fase orgánica del esmalte, ya que, debido a su poco peso molecular pueden penetrar en el interior del esmalte subsuperficial, donde, los fenómenos de oxidación interna pueden ser más intensos debido a la mayor presencia de material orgánico. A esta conclusión también llegaron investigadores como Baratieri y cols., 1994; Basting, Fernández y Fernández y Ambrosano, 2005; Rodrigues y cols., 2005; Jeng, Lin y Shieh, 2009.

Pese a exponer al esmalte a un agente blanqueador con un pH neutro, los valores de rugosidad se ven incrementados, por este motivo, quizá sería necesario completar estos resultados con un análisis de FTIR para observar si se produce un aumento del intercambio químico mediante oxidación debido a la mayor porosidad del esmalte blanqueado.

## 7.2. CAMBIOS EN EL COMPORTAMIENTO MECÁNICO DEL ESMALTE EXPUESTO A PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AL 38%

### INDENTACIÓN INSTRUMENTADA

Existen diferentes variables que pueden afectar a los valores de módulo de elasticidad y la dureza obtenidos mediante ensayos de nanoindentación. En el presente trabajo se han tenido en cuenta estas variables relacionando la metodología de nanoindentación y la respuesta del material:

#### ~ Efecto de la carga

Las Figuras 23 y 24 mostraron que los valores de módulo de elasticidad y dureza con ambas metodologías disminuyeron a medida que se incrementó la carga. El valor del módulo de elasticidad se ve disminuido debido a un proceso de agrietamiento de la muestra tras ser indentada. Esta disminución es más acentuada cuando se realizan las mediciones a cargas elevadas con la metodología de CM. Este fenómeno puede ser debido a que el incremento de la carga con la metodología de CSM se produce de manera paulatina mientras que con la metodología CM este incremento se produce de manera inmediata según se programe para cada indentación, lo que genera un mayor impacto sobre la muestra y esto a su vez un agrietamiento de la misma. Por tanto, este hallazgo justifica la gran variabilidad de los resultados obtenidos de módulo de elasticidad y dureza por otros autores que sólo emplean la metodología CM (Meredith y cols., 1996; Habelitz y cols., 2001; He, Fujisawa y Swain, 2006; Azer y cols., 2009).

En el caso de los valores de dureza, al efecto del agrietamiento hay que añadirle el efecto del tamaño de la huella de la indentación, que a medida que ésta aumenta, el valor de la dureza disminuye.



De manera que si queremos comparar el módulo de elasticidad y dureza obtenidos en otros estudios, debemos tener presente la carga empleada.

~ **Efecto del proceso de microfisuras**

El esmalte es un material friable que podría verse afectado durante el ensayo de indentación. La sollicitación del material debido a la indentación Berkovich puede producir microfisuras alrededor del área indentada (Park y cols., 2008).

De acuerdo a otros autores (Bao, Wang y Zhou, 2006; Oyen 2006; Ang y cols., 2009) este proceso puede ser debido al aumento de la disipación de la energía. La formación de microfisuras podría explicar la notable disminución en las propiedades mecánicas cuando la indentación se realiza a carga máxima, independientemente de la metodología empleada.

~ **Efecto de la metodología del ensayo**

En la metodología de CM se aplicó un ciclo sencillo de carga-descarga de 30 segundos, sin embargo, para la metodología de CSM se aplicó un ciclo continuo de carga-descarga de 2nm con una frecuencia de 45 ciclos/s. Por esta razón, la frecuencia del ensayo es bastante diferente.

El método de CSM empleado en nuestro estudio proporciona valores de las propiedades mecánicas ligeramente superiores en comparación con los obtenidos con los ensayos realizados con la metodología CM (Tablas 5 y 6). Por tanto, podemos deducir que los valores de módulo de elasticidad y dureza son dependientes del procedimiento de nanoindentación. A esta misma conclusión llegaron autores como Staines, Robinson y Hood (1981);

Low, Duraman y Mahmood (2008); Park y cols., (2008) y Guidoni y cols., (2009) en sus respectivos estudios.

De acuerdo con el método de Oliver y Pharr (1992), la rigidez de contacto sería una función de la profundidad de contacto. Como se puede observar en la Figura 24, la relación lineal se mantiene al emplear ambas metodologías perdiéndose esta tendencia al aplicar las cargas más elevadas (500mN) en la metodología CM, esto puede ser debido a la formación de microfisuras (Soderholm, 2010).

Además, si se compara la línea de la rigidez de contacto frente a la profundidad de contacto se observa una tendencia a la bajada de dicha línea con las cargas medianas y más bajas. Se puede apreciar que con la metodología CSM la bajada de esta línea es ligeramente menor que con la metodología CM. Por tanto, la rigidez de contacto parece ser dependiente de la metodología de nanoindentación empleada. La principal causa de esta discrepancia podría estar relacionada con las diferentes características frecuenciales de cada metodología. Estos mismos resultados coinciden con los obtenidos por Ang y cols., (2009).

Por tanto, el efecto del “creep” hallado en las capas orgánicas compuestas por proteínas situadas entre los prismas de esmalte, podría ser relevante cuando se emplea la metodología CM. Además, los valores obtenidos con la metodología CSM parecen verse menos afectados por la capa orgánica interprismática que los obtenidos con la metodología CM (Habelitz y cols., 2001).

En nuestro estudio, con la metodología CM se determinó que los valores para el módulo de elasticidad del esmalte tenían un rango de 35.98 (8.07) GPa y 80.5 (13.20), y para la dureza, los valores oscilaban entre 1.32 (0.22)

GPa y 5.19 (1.46). Los resultados más elevados se obtuvieron cuando se aplicaron las cargas más bajas de indentación (1mN). Los valores documentados por otros autores para el módulo de elasticidad y la dureza fueron similares a los obtenidos en el presente trabajo con cargas de 1mN (Habelitz y cols., 2001; Cuy y cols., 2002; Balooch y cols., 2004).

El módulo de elasticidad y la dureza obtenidos con cargas de 100mN coinciden con los resultados obtenidos previamente por otros autores (Li y Swain, 2007). Sin embargo, la aplicación de la carga de 500mN produjo una pronunciada disminución del módulo de elasticidad y dureza, con valores más bajos que los anteriormente documentados. Este hecho apoya la teoría de que a cargas tan elevadas el módulo de elasticidad y la dureza desciendan por un posible agrietamiento del esmate.

Con la metodología de CSM, los valores de módulo de elasticidad oscilaron entre 68.67GPa (5.03) y 87.48GPa (26.10), y la dureza con valores del rango de 2.75GPa (0.38) y 4.62GPa (2.78). En este caso, los valores de módulo de elasticidad y dureza fueron superiores que aquellos determinados mediante la metodología CM.

En estudios previos, Park y cols., (2008) documentaron que las indentaciones realizadas a cargas inferiores a 500mN reflejaban la habilidad del esmalte para resistir a una deformación permanente. Si las cargas se incrementaban hasta 2N o más, la dureza del esmalte alcanzaría un valor constante independientemente de la carga.

Como los datos obtenidos para la metodología CM y CSM son similares a los obtenidos por otros autores, se optó por realizar el resto del estudio del presente trabajo empleando la metodología CSM. La razón es que la cantidad de datos que aporta esta metodología es considerablemente

superior a la que aporta la metodología CM, lo que hace que los ensayos se realicen en menor tiempo.

~ Efecto del peróxido de hidrógeno en el módulo de elasticidad y dureza

La técnica de nanoindentación ha sido empleada en los últimos años como una metodología fidedigna para estudiar las alteraciones nanomecánicas de los tejidos mineralizados (Habeliz y cols., 2001; Cuy y cols., 2002; Ge y cols., 2005; Bao y cols., 2006; Oyen y cols., 2006). Es además una técnica esencialmente no destructiva que realiza indentaciones que sólo son apreciables mediante MEB o AFM (Xu y cols., 1998). El uso de la nanoindentación permite realizar mayor número de ensayos delimitando la localización de la indentación. Esto representa una ventaja considerablemente mayor si lo comparamos con estudios previos que emplean tests de microdureza Vickers o Knoop (White y cols., 2004; Basting y cols., 2003; Lewinstein y cols., 2004; Attin y cols., 2005).

Los resultados del presente trabajo mostraron una disminución significativa del módulo de elasticidad y dureza tras la aplicación del peróxido de hidrógeno al 38%. Esta disminución de los valores fue significativamente acusada al realizar las mediciones inmediatamente después de la aplicación del blanqueamiento. Al medir a las 24 horas y 1 semana tras dicha aplicación los valores continuaron bajando.

Estos resultados coinciden con los expuestos por Basting y cols., (2003) quienes documentaron una disminución de la microdureza del esmalte tras la aplicación de peróxido de carbamida al 22% durante 42 días.

También coinciden con los resultados de estudios previos como el de Rodrigues y cols., (2005), que encontraron diferencias significativas en el módulo de elasticidad, al aplicar peróxido de carbamida al 37% durante 1 hora combinando y sin combinar con un tratamiento posterior con peróxido de carbamida al 10% 6 horas diarias durante 21 días.

Ulukapi (2007) midió la microdureza del esmalte tras la aplicación de peróxido de hidrógeno al 35% durante una hora y realizó las mediciones inmediatamente después de la aplicación del gel y a las 24, 48 y 72 horas. Observó cambios transcurridas 24 y 48 horas desde la aplicación del gel.

Salomão y cols., (2014) documentaron que las propiedades mecánicas del esmalte se veían disminuídas tras la aplicación tanto de peróxido de hidrógeno al 35% como de peróxido de carbamida al 35%.

Estos resultados en cambio no coinciden con varios autores que defienden que el gel de blanqueamiento no produce disminución del módulo de elasticidad y dureza tras la aplicación de peróxido de hidrógeno a alta concentración (Maia y cols., 2008; Polydorou, Hellwig y Hahn, 2008; Araujo, Baratieri y Araújo, 2010). Esto puede ser debido a que en estos casos la técnica de medición que emplean conlleva la aplicación de elevadas cargas mediante microdureza Knoop y Vickers. Estas técnicas generan una huella residual mayor y por tanto un aumento del volumen de estructura analizada, dando lugar a un enmascaramiento de los resultados por la baja precisión de la propia metodología.

El proceso oxidativo del blanqueamiento puede ser una explicación a la disminución de los valores de módulo de elasticidad y dureza. Este proceso lo observaron Al-Salehi, Wood y Hatton (2007), en cuyo estudio informaron de un aumento de la liberación de calcio y fosfato tras el uso de

peróxido de hidrógeno a alta concentración con una reducción significativa de los valores de microdureza, poniendo de manifiesto que las exposiciones prolongadas al peróxido de hidrógeno afectan al contenido mineral del esmalte.

Años más tarde Cakir y cols., (2011) observaron cambios químicos tras la aplicación de 35% de peróxido de carbamida. Los niveles de potasio y calcio disminuyeron mientras que los de flúor y oxígeno aumentaron.

En nuestro estudio además de las mediciones en la superficie vestibular, se realizaron mediciones en la sección transversal del esmalte. Los valores de módulo de elasticidad y dureza obtenidos fueron menores que en la superficie vestibular tanto inmediatamente después de aplicar el gel de blanqueamiento como transcurridas 24 horas y una semana desde su aplicación. Esta discrepancia puede justificarse por el mayor contenido en matriz orgánica a medida que profundizamos en el esmalte y nos acercamos a la unión amelodentinaria. Además, la superficie vestibular del esmalte está más mineralizada que en la subsuperficie así como sus prismas mejor empaquetados (Habelitz y cols., 2001; Cuy y cols., 2002; Braly y cols., 2007). Este hecho se ha de tener en cuenta a la hora de realizar tratamientos como el tallado de carillas en el sector anterior, ya que como hemos podido comprobar, el comportamiento mecánico del esmalte está alterado en su profundidad y por tanto la adhesión a este tejido puede estar afectada.

Por otro lado, los valores de módulo de elasticidad y dureza no se recuperaron 1 semana después de la aplicación del blanqueamiento. Sería interesante medir estos parámetros transcurridos 15 días para ver si estos valores se recuperan y así garantizar que las propiedades del esmalte

quedan restablecidas para la adhesión a esta superficie (Cadenaro y cols., 2006).

## **TENACIDAD DE FRACTURA**

### **~ Efecto del peróxido de hidrógeno en la tenacidad de fractura del esmalte**

Debido a la complejidad en la interpretación de las grietas generadas por la indentación junto con la variabilidad de complejas ecuaciones, son escasos los estudios que analizan la influencia del blanqueamiento sobre esta propiedad. Son pocos los resultados que existen y en la literatura difieren con los presentados en este trabajo (Seghi y Denry, 1992; Bajaj y Arola, 2009; Soderholm, 2010; Yahyazadehfar, Bajaj y Arola, 2013).

El MEB proporciona sólo una imagen superficial, sin ninguna posibilidad de disponer de información sobre la geometría interna de las grietas. Por lo tanto, para obtener una medida más fiable de la tenacidad a la fractura de esmalte, sería necesario el uso de una metodología independiente de la geometría de las grietas. Debido a que este requisito no lo cumplen las ecuaciones 11-13 anteriormente explicadas, en el presente trabajo se optó por aplicar la ecuación 14 que se asemeja más al patrón que se supone que siguen las grietas en la estructura dentaria.

En las Tablas 11 y 12, se puede observar que en comparación con los estudios previos de otros autores, los valores obtenidos en el presente trabajo son inferiores tanto en control como en las demás situaciones evaluadas (Hegedüs y cols., 1999; Smith y cols., 1998; McGuckin, Babin y Meyer, 1992; Bitter, 1992; Oltu y Gürgan, 2000; Ben-Amar y cols., 1995;

Bitter y Sanders, 1993; Haywood y cols., 1990). Los resultados obtenidos muestran un aumento en la tenacidad de fractura para todas las situaciones medidas (inmediatamente después de la aplicación del blanqueamiento, transcurridas 24 horas y tras 1 semana desde su aplicación).

De acuerdo a la Tabla 12 presentada en el apartado de resultados, inmediatamente después del blanqueamiento, los valores de tenacidad de fractura del esmalte mostraron un significativo descenso respecto al control. Además, el esmalte no recupera los valores iniciales en el tiempo. Un semana más tarde, la tenacidad de fractura aumenta un 40% respecto al control.

Hassan, Caputo y Bunshash (1981), documentaron valores de tenacidad para el esmalte sin aplicación de blanqueamiento de  $0.7$  a  $1.37\text{MPa}\sqrt{\text{m}}$  usando un indentador Vickers combinado con una ecuación semiempírica tipo 1 (ecuación 11). Aplicando estas mismas condiciones, Xu y cols., (1998), obtuvieron valores inferiores de tenacidad de  $0.84\text{MPa}\sqrt{\text{m}}$  coincidiendo con los obtenidos por Padmanabhan y cols., (2010).

Baldassarri, Margolis y Beniash (2008), obtuvieron valores de  $0.5\text{MPa}\sqrt{\text{m}}$  y  $1.3\text{MPa}\sqrt{\text{m}}$  en secciones transversales y superficie vestibular del esmalte respectivamente, usando un indentador Vickers. Analizando los resultados de estos investigadores y los obtenidos en nuestro estudio, los valores de tenacidad de fractura del esmalte muestran desviaciones muy grandes, a pesar de que es una propiedad intrínseca. Algunas razones pueden deberse en parte a la variabilidad en la metodología, ya que nosotros empleamos una punta Berkovich y los demás autores una punta Vickers y en parte a la variabilidad de la orientación de la microestructura del esmalte.



Las ecuaciones semi-empíricas son ampliamente utilizadas en la comunidad científica para estimar la resistencia a la fractura del esmalte (Baldassarri y cols., 2008; Bajaj y Arola, 2009; Chai y cols., 2009). Este estudio ha revelado que la naturaleza semi-empírica de las ecuaciones 11-13 son de dudosa aplicabilidad cuando las mediciones de tenacidad a la fractura se llevan a cabo en huellas que no han creado un patrón de grietas que partan del vértice de las mismas y con puntas que no sean Vickers.

Respecto a la variabilidad en la microestructura del esmalte, Bechtle, Habelitz y Klocke (2010) concluyeron en su estudio que las proteínas remanentes que se encuentran alrededor del prisma de esmalte, definen un plano tridimensional en forma de hendidura. De esta manera, las fisuras se desvían preferentemente a lo largo y siguiendo las hendiduras. Esto puede ser un mecanismo para prevenir fracturas más graves que avancen de forma recta a través del esmalte (Robinson, Weatherell y Hallsworth, 1971).

Por lo tanto, en el presente estudio, tanto los valores constantes, y las ecuaciones en sí mismas podrían ser completamente diferentes, debido a que el esmalte es un material compuesto por una estructura jerárquica de cristales de hidroxiapatita rodeadas por una matriz de proteínas. La evaluación de la tenacidad a la fractura depende fuertemente de la naturaleza de las grietas, la orientación microestructural y también sobre la ubicación de la indentación. Las grietas desarrolladas durante el proceso de indentación pueden tener diferentes morfologías en comparación con las grietas radiales o Palmqvist a lo largo de la dirección de la carga.

La longitud de las trayectorias de las grietas se manifiestan en zigzag, como se muestra en la Figura 39, lo que parece indicar que las grietas se propagan alrededor de los prismas de esmalte de interceptación, es decir, a

través de una capa intermedia de proteínas. Este fenómeno fue observado por otros investigadores (Hassan, Caputo y Bunshash, 1981; Rasmussen y cols., 1976). Estas observaciones sugieren que es más difícil para las grietas propagarse a través los prismas de esmalte que hacerlo alrededor de ellos. Estas grietas se ven aumentadas con el tiempo y después del tratamiento de blanqueamiento. Esta puede ser una de las causas por las que los valores de módulo de elasticidad y dureza también se ven disminuidos tras el blanqueamiento. El hecho de que el valor de la tenacidad de fractura aumente tras la aplicación del blanqueamiento implica que el material es más dúctil y por tanto menos frágil.

## RESISTENCIA AL RAYADO

### ~ Coeficiente de rozamiento y Tasa de desgaste

Una de las limitaciones de este apartado es la dificultad de identificar los mecanismos de desgaste mediante la metodología convencional.

La observación mediante MEB genera un daño irreparable en las muestras dando lugar a una mala interpretación de los datos. A pesar de esto, se han obtenido algunos resultados relevantes.

Los resultados más importantes que emergen de este trabajo se muestran en la Figuras 42 y 43. Las variaciones tanto en el coeficiente de rozamiento como en la tasa de desgaste fueron evidentes en nuestro estudio.

Las observaciones sugieren que el coeficiente de rozamiento (Figura 42) se incrementó como consecuencia del blanqueamiento, pero este efecto sólo

fue relevante inmediatamente después de la aplicación del blanqueamiento. A las 24 horas y una semana después, el coeficiente de rozamiento fue similar o incluso inferior a los valores obtenidos antes de la aplicación del blanqueamiento.

La aparente recuperación después de algún tiempo de almacenamiento en saliva artificial también se observó en las mediciones de tasa de desgaste y en la profundidad de los surcos residuales. El incremento inicial en la tasa de desgaste inmediatamente después de la aplicación del blanqueamiento se convirtió en valores bastante similares a los del esmalte antes de serle aplicado el blanqueamiento. Una hipótesis plausible es una relación directa entre el comportamiento de la degradación del desgaste y la desmineralización del esmalte, pero serían necesarias más investigaciones para confirmarlo. Las propiedades mecánicas medidas y mostradas en la Tabla 12 es una contribución para entender este fenómeno, pero aunque se observaron algunas diferencias, la tendencia no fue evidente excepto para la tenacidad de fractura.

Se observó una reducción en el desarrollo de amontonamiento (Figura 44) y de la profundidad de los surcos residuales después de la aplicación del blanqueamiento (24 horas y 1 semana transcurrida desde su aplicación), quizá debido a un proceso de remineralización tras el almacenamiento en saliva artificial. Sería útil realizar un análisis del mecanismo de deformación durante el proceso del rayado de la muestra.

La tasa de desgaste mostró la misma tendencia que el coeficiente de rozamiento cuando se midió en la cola del prisma, no siendo igual cuando se midió en la cabeza, ya que los valores para la carga de 500uN aumentaron transcurridas 24 horas desde la aplicación del blanqueamiento en vez de hacerlo inmediatamente después.

La respuesta del esmalte debajo de la punta cónica fue principalmente elástico-plástico, como indica el desarrollo de la acumulación de tejido de esmalte desprendido en los bordes de la ranura residual (Figura 44). En consecuencia, la deformación plástica se revela como un mecanismo de desgaste plausible.

Las presiones de contacto desarrolladas durante los ensayos de rayado fueron desde 2,76 a 7,53GPa. Estos valores son suficientes para producir cizallamiento y presionar la fase proteínica situada entre los cristales de hidroxiapatita, dando lugar a la propagación de microgrietas a través de la fase orgánica (Maia y cols., 2008). Por lo tanto, la deformación plástica y la microfisuración pueden constituir los procesos más probables de desgaste. Este proceso lo observaron Xu y cols., (1998), al indentar dientes humanos sometidos a baja carga.

Se debe tener en cuenta que en el presente trabajo, aunque se ha procurado imitar las condiciones reales de la cavidad oral, solamente se testó el comportamiento mecánico del esmalte *in vitro*, por lo que las condiciones de almacenamiento en saliva artificial pueden ocasionar que algún resultado que diste de la realidad. Por este motivo, este estudio debería ser completado con pruebas *in situ* para ver la respuesta de las propiedades mecánicas en presencia de saliva natural, alimentos y bebidas ácidas que puedan aumentar la erosión así como el efecto del flúor presente tanto en la dieta como en los suplementos externos.

A su vez, sería interesante realizar más estudios que complementaron el presente trabajo desde un punto de vista del análisis químico para

complementar los resultados anteriormente mostrados como podría ser un análisis con espectroscopía Raman y FTIR.



# CONCLUSIONES



De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación podemos concluir:

1. La rugosidad superficial del esmalte, en concreto los parámetros de rugosidad media cuadrática (RMS) y rugosidad media (Ra) aumentaron significativamente tras la aplicación de peróxido de hidrógeno al 38% durante una hora. Dichos valores se incrementaron significativamente cuando se volvieron a determinar tras una semana de almacenamiento en saliva artificial. Por otro lado, la rugosidad no fue homogénea a lo largo de la superficie vestibular, aumentando desde incisal hasta cervical para todas las condiciones experimentales.
2. El módulo de elasticidad y la dureza del esmalte, tanto en su superficie vestibular como al seccionarlo transversalmente, disminuyeron significativamente tras la aplicación de peróxido de hidrógeno al 38%. La conservación de las muestras en saliva artificial durante 24 horas redujo de nuevo los valores de dichas propiedades mecánicas, volviendo a descender tras la determinación tras una semana de almacenamiento.
3. La tenacidad de fractura del esmalte aumentó significativamente tras la aplicación de peróxido de hidrógeno al 38%, sin que se modificaran los valores 24 horas después. La conservación de las muestras durante una semana en saliva artificial ocasionó un incremento significativo de los resultados en comparación con los obtenidos para el resto de las condiciones experimentales.
4. El coeficiente de fricción y la tasa de desgaste del esmalte variaron de acuerdo a la condición experimental evaluada. Tras un incremento tras la aplicación del peróxido de hidrógeno al 38%, el esmalte recuperó sus propiedades una semana después de su almacenamiento en saliva artificial.







# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abouassi T, Wolkewitz M, Hahn P. Effect of carbamide peroxide and hydrogen peroxide on enamel surface: an in vitro study. *Clinical Oral Investigations* 2011; 15: 673-680.
- 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. *Journal of Dentistry* 2007; 35: 862-870.
- Akal N, Over H, Olmez A, Bodur H. Effects of carbamide peroxide containing bleaching agents on the morphology and surface hardness of enamel. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry* 2001; 25: 293-296.
- Al-Qunaian TA. The effect of whitening agents on caries susceptibility of human enamel. *Operative Dentistry* 2005; 30: 265-270.
- Al-Salehi SK, Wood DJ, Hatton PV. The effect of 24h non-stop hydrogen peroxide concentration on bovine enamel and dentine mineral content and microhardness. *Journal of Dentistry* 2007; 35: 845-850.
- Anstis GR, Chantikul P, Lawn BR, Marshall DB. A critical evaluation of indentation techniques for measuring fracture toughness: I Direct crack measurements. *Journal of the American Ceramic Society* 1981; 64: 533-538.
- Ang S, Scholz T, Klocke A, Schneider GA. Determination of the elastic/plastic transition of human enamel by nanoindentation. *Dental Materials* 2009; 25: 1403-1410.
- Araujo EM, Baratieri LN, Vieira LCC, Ritter AV. In situ effect of 10% carbamide peroxide on microhardness of human enamel: function of time. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2003; 15: 166-74.
- Araujo Fde O, Baratieri LN, Araújo E. In situ study of in-office bleaching procedures using light sources on human enamel microhardness. *Operative Dentistry* 2010; 35: 139-146.

- Attin T, Hannig C, Wiegand A, Attin R. Effect of bleaching on restorative materials and restorations—a systematic review. *Dental Materials* 2004a; 20: 852-861.
- Attin T, Muller T, Patyk A, Lennon AM. Influence of different bleaching systems on fracture toughness and hardness of enamel. *Operative Dentistry* 2004b; 29: 188-195.
- Attin T, Vollmer D, Wiegand A, Attin R, Betke H. Subsurface microhardness of enamel and dentin after different external bleaching procedures. *American Journal of Dentistry* 2005; 18: 8-12.
- Attin T, Betke H, Shippan F, Wiegand A. Potential of fluoridated carbamide peroxide gels to support post-bleaching enamel rehardening. *Journal of Dentistry* 2007; 35: 755-759.
- Ausschill TM, Hellwig E, Schmidale S, Sculean A, Arweiler NB. Efficacy, side-effects and patients' acceptance of different bleaching techniques (OTC, in-office, at-home). *Operative Dentistry* 2005; 30: 156-63.
- Avery J, Chiego D. *Principios de Histología y Embriología Bucal*. Ed. Elsevier, Madrid, 2007.
- Azer S, Machado M, Sánchez E, Rashid R. Effect of home bleaching systems on enamel nanohardness and elastic modulus. *Journal of Dentistry* 2009; 37:185-190.
- Azrak B, Callaway A, Kurth P, Willershausen B. Influence of bleaching agents on surface roughness of sound or eroded dental enamel specimens. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2010; 22: 391-399.
- Bachmann L, Craievich AF, Zezell DM. Crystalline structure of dental enamel after Ho: YLF laser irradiation. *Archives Oral Biology* 2004; 49: 923-929.
- Bajaj D, Arola DD. On the R-curve behavior of human tooth enamel. *Biomaterials*, 2009; 30: 4037-4046.

- Baldassarri M, Margolis HC, Beniash E. Compositional determinants of mechanical properties of enamel. *Journal of Dentistry Research* 2008; 87: 645-9.
- Balooch G, Marshall GW, Marshall SJ, Warren OL, Asif SAS, Balooch M. Evaluation of a new modulus mapping technique to investigate microstructural features of human teeth. *Journal of Biomechanics* 2004; 37:1223-1232.
- Bao YW, Wang W, Zhou YC. Investigation of the relationship between elastic modulus and hardness based on depth-sensing indentation measurements. *Acta Materialia* 2006; 52: 5397-404.
- Baratieri LN, Monteiro Junior S, Andrada MAC, Vieira LCC. Nonvital tooth bleaching: guidelines for the clinician. *Quintessence International* 1995; 597-608.
- Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Human enamel dissolution in citric acid as a function of pH in the range 2.30 < or = pH < or = 6.30--a nanoindentation study. *European Journal of Oral Sciences* 2003; 111: 258-262.
- Barcellos DC, Benetti P, Fernandes VV Jr, Valera MC. Effect of carbamide peroxide bleaching gel concentration on the bond strength of dental substrates and resin composite. *Operative Dentistry* 2010; 35: 463-469.
- Basting RT, Rodrigues Junior AL, Serra MC. The effect of 10% carbamide peroxide bleaching material on microhardness of sound and desmineralized enamel and dentin in situ. *Operative Dentistry* 2001; 26: 531-539.
- Basting RT, Rodrigues AL, Serra MC. The effects of seven carbamide peroxide bleaching agents on enamel microhardness over time. *Journal American Dental Association* 2003; 134: 1335-1342.
- Basting RT, Fernández y Fernández C, Ambrosano GM, de Campos IT. Effects of a 10% carbamide peroxide bleaching agent on roughness and

- microhardness of packable composite resins. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2005a; 17: 256-62.
- Basting RT, Rodrigues AL, Serra MC. The effect of 10% carbamide peroxide, carbopol and/or glycerin on enamel and dentin microhardness. *Operative Dentistry* 2005b; 30: 608-16.
  - Basting RT, Rodrigues AL, Campos MC. Micromorphology and surface roughness of sound and desmineralized enamel and dentin bleached with a 10% carbamide peroxide bleaching agent. *American Journal of Dentistry* 2007; 20: 97-102.
  - Basting RT, Amaral FL, França FM, Flório FM. Clinical comparative study of the effectiveness of and tooth sensitivity to 10% and 20% carbamide peroxide home-use and 35% and 38% hydrogen peroxide in-office bleaching materials containing desensitizing agents. *Operative Dentistry* 2012; 37:464-73.
  - Bechtle S, Habelitz S, Klocke A. The fracture behaviour of dental enamel. *Biomaterials* 2010; 31: 375-384.
  - Ben-Amar A, Liberman R, Gorfil C, Bernstein Y. Effect of mouthguard bleaching on enamel surface. *American Journal of Dentistry* 1995; 8: 29-32.
  - Benetti AR, Valera MC, Mancini MN, Miranda CB, Balducci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *International Endodontic Journal* 2004; 37: 120-124.
  - Berger SB, Cavalli V, Ambrosano GM, Giannini M. Changes in surface morphology and mineralization level of human enamel following in-office bleaching with 35% hydrogen peroxide and light irradiation. *General Dentistry* 2010a; 58: 74-79.
  - Berger SB, Cavalli V, Martin AA, Soares LE, Arruda MA, Brancalion ML, Giannini M. Effects of combined use of light irradiation and 35% hydrogen peroxide for dental bleaching on human enamel mineral content. *Photomedicine and Laser Surgery* 2010b; 28: 533-538.

- Berger SB, Tabchoury CP, Ambrosano GM, Giannini M. Hydrogen peroxide penetration into the pulp chamber and dental permeability after bleaching. *General Dentistry* 2013; 61: 21-25.
- Bhaskar SN. *Histología y Embriología Bucal de Orban*. 2000, 11ª Ed., Editorial Prado, México.
- Bistey T, Nagy IP, Simó A, Hegedus C. In vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel. *Journal of Dentistry* 2007; 35: 325-330.
- Bitter NC. A scanning electron microscopy study of the effect of bleaching agents on enamel: A preliminary report. *Journal of Prosthetic Dentistry* 1992; 67: 852-855.
- Britter NC, Sanders JL. The effect of four bleaching agents on the enamel surface: a scanning electron microscopic study. *Quintessence International* 1993; 24: 817-824.
- Bizhang M, Seeman R, Duve G, Römhild G, Altenburger MJ, Jahn KR, Zimmer S. Desmineralization effects of 2 bleaching procedures on enamel surfaces with and with-out post-treatment fluoride application. *Operative Dentistry* 2006; 31: 705-709.
- Borggreven JM, Van Dijk JWE, Driessens FCM. Effect of laser irradiation on the permeability of bovine dental enamel. *Archives of Oral Biology* 1980; 25: 831-832.
- Braly A, Darnell LA, Mann AB, Teaford MF, Weihs TP. The effect of prism orientation on the indentation testing of human molar enamel. *Archives of Oral Biology* 2007; 52: 856-60.
- Browning WD, Cho SD, Deschepper EJ. Effect of a nano-hydroxyapatite paste on bleaching-related tooth sensitivity. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2012; 24: 268-276.
- Buchalla W, Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser—A systematic review. *Dental Materials* 2007; 23: 586-596.



- Bulut H, Turkun M, Kaya AD. Effect of an antioxidizing agent on the shear bond strength of brackets bonded to bleached human enamel. *American Journal Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2006; 1:266-272.
- Cadenaro M, Breschi L, Antonioli F, Mazzoni A, Di Lenarda R. Influence of whitening on the degree of conversion of dental adhesives on dentin. *European Journal of Oral Sciences* 2006; 114:257-262.
- Cakir FY, Korkmaz Y, Firat E, Oztas SS, Gurgan S. Chemical analysis of enamel and dentin following the application of three different at-home bleaching systems. *Operative Dentistry* 2011; 36: 529-536.
- Camargo MA, Marques MM, de Cara AA. Morphological analysis of human and bovine dentine by scanning electron microscope investigation. *Archives of Oral Biology* 2008; 53: 105-108.
- Can-Karabulut DC, Karabulut B. Influence of activated bleaching on various adhesive restorative systems. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2011; 23: 399-408.
- Caneppele TM, Borges AB, Torres CR. Effects of dental bleaching on the color, translucency and fluorescence properties of enamel and dentin. *The European Journal of Esthetic Dentistry* 2013; 8: 200-12.
- Cavalli V, Reis AF, Giannini M, Ambrosano GM. The effect of elapsed time following bleaching on enamel bond strength of resin composite. *Operative Dentistry* 2001; 26:597-602.
- Cavalli V, Arrais CA, Gianinni M, Ambrosano GM. High-concentrated carbamide peroxide bleaching agents effects on enamel surface. *Journal of Oral Rehabilitation* 2004a; 31: 155-159.
- Cavalli V, Giannini M, Carvalho R. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on tensile strength of human enamel. *Dental Materials* 2004b; 20: 733-739.
- Ceballos L, Garrido MA, Fuentes MV. Mechanical characterization of resin cements used for luting. *Dental Materials* 2007; 23:100-105.

- 
- Chai H, Lee JJ, Constantino PJ, Lucas PW, Lawn BR. Remarkable resilience of teeth. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America* 2009; 106: 7289-7293.
  - Chen J, Bull SJ. Assessment of the toughness of thin coatings using nanoindentation under displacement control. *Thin solid films* 2006; 494: 1-7.
  - Chen HP, Chang CH, Liu JK, Chuang SF, Yang JY. Effect of fluoride containing bleaching agents on enamel surface properties. *Journal of Dentistry* 2008; 36: 718-725.
  - Cheng, YT, Cheng, CM. Scaling, dimensional analysis, and indentation measurements. *Materials Science & Engineering* 2004; 44: 91-149.
  - Cooper JS, Bokmeyer TJ, Bowles WH. Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents. *Journal of Endodontics* 1992; 18:315-317.
  - Croissant AE, Kang EJ, Campbell RE, Bastian E, Drake MA. The effect of bleaching agent on the flavor of liquid whey and whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science* 2009; 92: 5917-27.
  - Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teaford MF, Weihs TP. Nanoindentation mapping on the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Archives of Oral Biology* 2002; 47: 281-291.
  - da Costa DB, Mazur RF. Effects of new formulas of bleaching gel and fluoride application on enamel microhardness: An in vitro study. *Operative Dentistry* 2007; 32: 589-594.
  - Duschner H, Gotz H, White DJ, Kozak KM, Zoladz JR. Effects of hydrogen peroxide bleaching strips on tooth surface colour, surface microhardness, surface and subsurface ultrastructure, and microchemical (Raman Spectroscopic) composition. *Journal of Clinical Dentistry* 2006; 17:72-8.
  - Davis WL. *Histología y Embriología Bucal*. Ed. Interamericana, México, 1993.

- Dawson PF, Sharif MO, Smith AB, Brunton PA. A clinical study comparing the efficacy and sensitivity of home vs combined whitening. *Operative Dentistry* 2011; 36: 460-466.
- De Abreu DR, Sasaki RT, Amaral FL, Flório FM, Basting RT. Effect of home-use and in-office bleaching agents containing hydrogen peroxide associated with amorphous calcium phosphate on enamel microhardness and surface roughness. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2011; 23: 158-68.
- de Freitas PM, Basting RT, Rodrigues JA, Serra MC. Effects of two 10% peroxide carbamide bleaching agents on dentin microhardness at different time intervals. *Quintessence International* 2002; 33: 370-375.
- de Medeiros CLSG, González-López S, Bolaños-Carmona MV, Sánchez-Sánchez P, Bolaños-Carmona J. Effects of phosphoric acid on bovine enamel bleached with carbamide peroxide. *European Journal of Oral Science* 2008; 116: 66-71.
- de Souza CA Riehl H, Kina JF, Tomoko N, Hebling J. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*, 2010; 109: 59-64.
- Dietschi D, Benbachir N, Krejci I. In vitro colorimetric evaluation of the efficacy of home bleaching and over-the-counter bleaching products. *Quintessence International* 2010; 41: 505-516.
- Directiva 2011/84/UE DEL CONSEJO. 20 de septiembre de 2011 por la que se modifica la Directiva 76/768/CEE, relativa a los productos cosméticos, para adaptar su anexo III al progreso técnico.
- do Amaral FL, Sasaki RT, da Silva TC, França FM, Flório FM, Basting RT. The effects of home-use and in-office bleaching treatments on calcium and phosphorus concentrations in tooth enamel: An in vivo study. *Journal of the American Dental Association* 2012; 143:580-586.

- Dukino RD, Swain MV. Comparative measurement of indentations fracture toughness with Berkovich and Vickers indenters. *Journal of the American Ceramic Society* 1992; 75: 3299-3304.
- Ebstein FM, Pruitt LA. Nanoindentation of biological materials. *Nanotoday* 2006; 1: 26-33.
- Efeoglu N, Wood DJ, Efeoglu C. Thirty-five percent carbamide peroxide application causes in vitro demineralization of enamel. *Dental Materials* 2007; 23: 900-904.
- Eimar H, Ghadimi E, Marelli B, Vali H, Nazhat SN, Wala M. Regulation of enamel hardness by its crystallographic dimensions. *Acta Biomaterialia* 2012; 8: 3400-3410.
- El Feninat F, Elouatik S, Ellis T.H, Sacher E, Stangel I. Quantitative assessment of surface roughness as measured by AFM: application to polished human dentin. *Applied Surface Science* 2001; 183:205-215.
- El-Murr J, Ruel D, St-Georges AJ. Effects of external bleaching on restorative materials: a review. *Journal (Canadian Dental Association)* 2011; 77: b59.
- Elfallah HM, Swain MV. A review of the effect of vital teeth bleaching on the mechanical properties of tooth enamel. *The New Zealand Dental Journal* 2013; 109:87-96.
- Erns CP, Marroquin BB, Willershausen-Zonnchen B. Effects of hydrogen peroxide-containing bleaching agents on the morphology of human enamel. *Quintessence International* 1996; 27: 53-56.
- Faraoni-Romano JJ, Turssi CP, Serra MC. Concentration dependent effect of bleaching agents on microhardness and roughness of enamel and dentin. *American Journal of Dentistry* 2007; 20: 31-34.
- Faraoni-Romano JJ, Da Silveira AG, Turssi CP, Serra MC. Bleaching agents with varying concentrations of carbamide and/or hydrogen peroxides: effect on dental microhardness and roughness. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2008; 20: 395-402.

- Feagin F, Koulourides T, Pigman W. The characterization of enamel surface demineralization, remineralization, and associated hardness changes in human and bovine material. *Archives of Oral Biology* 1969; 14: 1407-1417.
- 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. *Applied Spectroscopy* 2008; 62: 1274-1279.
- Finchman AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of developing dental enamel matrix. *Journal of Structural Biology* 1999; 126: 270-299.
- Finke M, Hughes JA, Parker DM, Jandt KD. Mechanical properties of in situ demineralised human enamel measured by AFM nanoindentation. *Surface Science* 2001; 491: 456-67.
- Fleck NA, Otoyoy H, Needleman A. Indentation of porous solids. *International Journal of Solids and Structures* 1992; 29: 1613-1636.
- Fong H, Sarikaya M, White SN, Snead ML. Nano-mechanical properties profiles across dentin–enamel junction of human incisor teeth. *Materials Science and Engineering* 2000; 7: 119-128.
- Fonseca RB, Haiter-Neto F, Carlo HL, Soares CJ, Sinhoreti MAC, Puppini-Rontani RM, Correr Sobrinho L. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. *Archives of Oral Biology* 2008; 53: 1023-1029.
- Fu-Zhai C, Jun G. New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2007; 1: 185-191.
- Fuhrer N, Churaru N, Cardash H. Effect of different peroxide bleaching regimens and subsequent fluoridation on the hardness of human enamel and dentin. *Journal of Prosthetic Dentistry* 2004; 92:337-342.

- 
- García-Godoy F, Dodge WW, Donohue M, O'Quinn JA. Composite resin bond strength after enamel bleaching. *Operative Dentistry* 1993; 18:144-147.
  - Ge J, Cui FZ, Wang XM, Feng HL. Property variations in the prism and the organic sheath within enamel by nanoindentation. *Biomaterials* 2005; 26: 3333-3339.
  - Giannini M, Silva AP, Cavalli V, Paes AF. Effect of carbamide peroxide-based bleaching agents containing fluoride or calcium on tensile strength of human enamel. *Journal of Applied Oral Science* 2006; 14: 82-87.
  - Goldstein CE, Goldstein RE, Feinman RA, Garber DA. Bleaching vital teeth: state of the art. *Quintessence International* 1989; 20:729-737.
  - Goldstein RE, Garber DA. *Complete Dental Bleaching*. 1995, 1ª ed. Editorial Quintessence, Chicago.
  - Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental*. Ed. Panamericana, Madrid, 2009.
  - Götz H, Duschner H, White DJ, Klukowska MA. Effects of elevated hydrogen peroxide strip bleaching on surface and subsurface enamel including subsurface histomorphology. *Journal of Dentistry* 2007; 35: 457-466.
  - Guidoni GM, He LH, Schöberl T, Jäger I, Dehm G, Swain MV. Influence of the indenter tip geometry and environment on the indentation modulus of enamel. *Journal of Materials Research* 2009; 24:616-625.
  - Gurgan S, Alpaslan T, Kiremitci A, Cakir FY, Yazici E, Gorucu J. Effect of different adhesive systems and laser treatment on the shear bond strength of bleached enamel. *Journal of Dentistry* 2009; 37: 527-534.
  - Gwinnett AJ, Buonocore MG, Sheykhoslam Z. Effect of fluoride on etched human and bovine tooth enamel surfaces as demonstrated by scanning electron microscopy. *Archives of Oral Biology* 1972; 17: 271-278.

- Habelitz S, Marshall SJ, Marshall Jr GW, Balooch M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. *Archives of Oral Biology* 2001; 46: 173-83.
- Hairul Nizam HR, Lim CT, Chng HK, Yap AUJ. Nanoindentation study of human premolars subjected to bleaching agent. *Journal of Biomechanics* 2005; 38: 2204–11.
- Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T. Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. *Archives of Oral Biology* 2005; 8:541-552.
- Hannig C, Duong S, Becker K, Brunner E, Kahler E, Attin T. Effect of bleaching on subsurface microhardness of composite and a polyacid modified composite. *Dental Materials* 2007; 23: 198-203.
- Hassan R, Caputo AA, Bunshash RF. Fracture toughness of human enamel. *Journal of Dental Research* 1981; 60:820-827.
- Hattab FN, Qudeimat MA, al-Rimawi HS. Dental discoloration: An overview. *Journal of Esthetic Dentistry* 1999; 11:291-310.
- Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. *Quintessence International* 1989; 20: 173-176.
- Haywood VB, Leech T, Heymann HO, Crumpler D, Bruggers K. Nightguard vital bleaching: Effects on enamel surface texture and diffusion. *Quintessence International* 1990; 21: 801-804.
- Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence International* 1991; 22: 515-23.
- Haywood VB, Leonard RH, Nelson CF, Brunson WD. Effectiveness, side effects and long-term status of nightguard vital bleaching. *The Journal of American Dental Association* 1994; 125:1219-1226.
- Haywood VB. Commonly asked questions about nightguard vital bleaching. *Dental Assistant* 1996; 65:6-8, 10-12.

- He L, Fujisawa N, Swain MV. Elastic modulus and stress-strain response of human enamel by nano-indentation. *Biomaterials* 2006; 27: 4388-4398.
- He L, Swain M. Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics. *Journal of the Mechanical Behaviour of Biomedical Materials* 2008; 1: 18-29.
- He LH, Swain MV. Enamel a functionally graded natural coating. *Journal of Dentistry* 2009; 37: 596-603.
- Hegedüs C, Bistey T, Flora-Nagy E, Keszthelyi G, Jenei A. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *Journal of Dentistry* 1999; 27:509-515.
- Heymann HO. Tooth whitening: Facts and fallacies. *British Dental Journal* 2005; 198: 514.
- Hodson JJ. An investigation into the microscopic structure of the common forms of enamel lamellae with special reference to their origin and contents. I. General considerations and development. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1953; 6: 305-317.
- Hosoya N, Honda K, Iino F, Arai T. Changes in enamel surface roughness and adhesion of *Streptococcus mutans* to enamel after vital bleaching. *Journal of Dentistry* 2003; 31: 543-548.
- Hubbezoglu İ, Akaoğlu B, Dogan A, Keskin S, Bolayir G, Özçelik S, et al. Effect of bleaching on color change and refractive index of dental composite resins. *Dental Materials Journal* 2008; 27: 105-116.
- Hughes JA, West NX, Parker DM, vanden Braak MH, Addy M. Effects of pH and concentration of citric, malic and lactic acids on enamel, in vitro. *Journal of Dentistry* 2000; 28: 265-70.
- Imfeld T. Comparison of the mechanical effects of a toothbrush and standard abrasive on human and bovine dentine in vitro. *The Journal of Clinical Dentistry* 2001; 12: 92-96.



- Jeng YR, Lin TT, Shieh DB. Nanotribological characterization of tooth enamel rod affected by surface treatment. *Journal of Biomechanics* 2009; 42: 2249-2254.
- Jiang T, Ma X, Wang Z, Tong H, Hu J, Wang Y. Beneficial effects of hydroxyapatite on enamel subjected to 30% hydrogen peroxide. *Journal of Dentistry* 2008a; 36: 907-914.
- Jiang T, Ma X, Wang Y, Tong H, Shen X, Hu Y, Hu J. Investigation of the effects of 30% hydrogen peroxide on human tooth enamel by Raman scattering and laser-induced fluorescence. *Journal of Biomedical Optics* 2008b; 13:14-19.
- Jodaikin A, Weiner S, Perl-Treces D, Traub W. Developing enamel matrix proteins: a conformation study of enamelin and amelogenin. *International Journal of Biological Macromolecules* 1987; 9: 166-168.
- Joiner A, Thakker G, Cooper Y. Evaluation of a 6% hydrogen peroxide tooth whitening gel on enamel and dentine microhardness in vitro. *Journal of Dentistry* 2004; 32: 27-34.
- Joiner A. The bleaching of teeth: A review of the literature. *Journal of Dentistry* 2006; 34: 412-419.
- Joiner A: Review of the effects of peroxide on enamel and dentine. *Journal of Dentistry* 2007; 3: 889-896.
- Jorgensen MG, Carroll WB. Incidence of tooth sensitivity after home whitening treatment. *Journal of the American Dental Association* 2002; 133:1076-1082.
- Josey AL, Meyers IA, Romaniuk K, Symons AL. The effect of a vital bleaching technique on enamel surface morphology and the bonding of composite resin to enamel. *Journal of Oral Rehabilitation* 1996; 23: 244-250.
- Kashima-Tanaka M, Tsujimoto Y, Kawamoto K, Senda N, Ito K, Yamazaki M. Generation of free radicals and/or active oxygen by light or laser

- irradiation of hydrogen peroxide or sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics* 2003; 29: 141-143.
- Kaya AD, Turkun M. Reversal of dentin bonding to bleached teeth. *Operative Dentistry* 2003; 28:825-829.
  - Kinney JH, Balooch M, Marshall GW, Marshall SJ. A micromechanics model of the elastic properties of human dentine. *Archives of Oral Biology* 1999; 44: 813-822.
  - Kishen A, Ramamurty U, Asundi A. Experimental studies on the nature of property gradients in the human dentine. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000; 51:650-659.
  - Korytowski W, Sarna T. Bleaching of melanin pigments. Role of copper ions and hydrogen peroxide in autooxidation and photooxidation of syntetic dopa-melanin. *The Journal of Biological Chemistry* 1990; 265: 12410-12416.
  - Kruzic JJ, Kim DK, Koester KJ, Ritchie RO. Indentation techniques for evaluating the fracture toughness of biomaterials and hard tissues. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedicals Materials* 2009; 2: 384-395.
  - Kum KY, Lim KR, Lee CY, Park KH, Safavi KE, Fouad AF, Spangberg LS. Effects of removing residual peroxide and other oxygen radicals on the shear bond strength and failure modes at resin-tooth interface after tooth bleaching. *American Journal of Dentistry* 2004; 17:267-270.
  - Kwon YH, Huo MS, Kim KH, Kim SK, Kim YJ. Effects of hydrogen peroxide on the light reflectance and morphology of bovine enamel. *Journal of Oral Rehabilitation* 2002; 29: 473-477.
  - Lai SC, Tay FR, Cheung GS, Mak YF, Carvalho RM, Wei SH, Toledano M, Osorio R, Pashley DH. Reversal of compromised bonding in bleached enamel. *Journal of Dental Research* 2002; 81: 477-481.
  - Laugier MT. Palmqvist indentation toughness in WC-Co composites. *Journal of Materials Science Letters* 1987a; 6: 897-900.

- Laugier MT. New formula for indentation toughness in ceramics. *Journal of Materials Science Letters* 1987b; 6: 355-356.
- Laurance-Young P, Bozec L, Graciab L, Reesc G, Lippert F, Lynchb RJM, Knowles C. A review of the structure of human and bovine dental hard tissues and their physicochemical behaviour in relation to erosive challenge and remineralisation. *Journal of Dentistry* 2011; 39: 266-272.
- Lewinstein I, Hirschfeld Z, Stabholz A, Rotstein I. Effect of hydrogen peroxide and sodium perborate on the microhardness of human enamel and dentin. *Journal of Endodontics* 1994; 20: 61-63.
- Lawn BR, Evans AG, Marshall DB. Elastic/plastic indentation damage in ceramics: The median/radial crack system. *Journal of the American Ceramic Society* 1980; 63: 574-581.
- Lawn BR, Lee JJ. Analysis of fracture and deformation modes in teeth subjected to occlusal loading. *Acta Biomaterial* 2009; 5: 2213-21.
- Lee KH, Kim HI, Kim KH, Kwon YH. Mineral loss from bovine enamel by 30% hydrogen peroxide solution. *Journal of Oral Rehabilitation* 2006; 33: 229-233.
- Leonard RH Jr, Bentley C, Eagle JC, Garland GE, Knight MC, Phillips C. Nightguard vital bleaching: A long-term study on efficacy, shade retention, side effects, and patients's perceptions. *Journal of Esthetics and Restorative Dentistry* 2001; 13:357-369.
- Lewinstein I, Fuhrer N, Churaru N, Cardash H. Effect of different peroxide bleaching regimens and subsequent fluoridation on the hardness of human enamel and dentin. *Journal of Prosthetic Dentistry* 2004; 92: 337-42.
- Li HH, Swain MV. Nanoindentation derived stress-strain properties of dental materials. *Dental Materials* 2007; 23: 814-821.
- Li Q, Yu H, Wang Y. Colour and surface analysis of carbamide peroxide bleaching effects on the dental restorative materials in situ. *Journal of Dentistry* 2009; 37: 348-356.

- Li Q, Xu BT, Li R, Yu H, Wang YN. Quantitative evaluation of colour regression and mineral content change of bleached teeth. *Journal of Dentistry* 2010; 38: 253-260.
- Li Y. Tooth bleaching using peroxide-containing agents: current status of safety issues. *Compendium of Continuing Education in Dentistry* 1998; 19: 783-790.
- Lima DA, De Alexandre RS, Martins AC, Aguiar FH, Ambrosano GA, Lovadino JR. Effect of curing lights and bleaching agents on physical properties of a hybrid composite resin. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2008; 20: 266-273.
- Lippert F, Parker DM, Jandt KD. In vitro desmineralization/remineralization cycles at human tooth enamel surfaces investigated by AFM and nanoindentation. *Journal of Colloid and Interface Science* 2004; 280: 442-448.
- Llana-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 2006; 11: 449-455.
- Lopes GC, Bonissoni L, Baratieri LN, Vieira LC, Monteiro S Jr. Effect of bleaching agents on the hardness and morphology of enamel. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2002; 14: 24-30.
- Low IM, Duraman N, Mahmood U. Mapping the structure, composition and mechanical properties of human teeth. *Materials Science and Engineering* 2008; 28: 243-247.
- Lyon TC Jr, Parker WA, Barnes GP. Evaluation of effects of application of a citroxain-containing dentifrice. *Journal of Esthetic Dentistry* 1991; 3: 51-3.
- Ma X, Jiang T, Sun L, Wang Z, Zhou Y, Wang Y. Effects of tooth bleaching on the color and translucency properties of enamel. *American Journal of Dentistry* 2009; 22: 324-328.

- Ma X, Li R, Sa Y, Liang S, Sun L, Jiang T, Wang Y. Separate contribution of enamel and dentine to overall tooth colour change in tooth bleaching. *Journal of Dentistry* 2011; 39: 739-745.
- Maia E, Baratieri LN, Amaral M, Monteiro S, Cardoso LC. The influence of two home-applied bleaching agents on enamel microhardness: an in situ study. *Journal of Dentistry* 2008; 26: 2-7.
- Malzbender J. Comment on hardness definition. *Journal of the European Ceramic Society* 2003; 23: 1355-1359.
- Markovic L, Jordan RA, Lakota N, Gaengler P. Micromorphology of enamel surface after vital tooth bleaching. *Journal of Endodontics* 2007; 33: 607-610.
- Matis BA, Gaião U. In-vivo degradation of bleaching gel used in whitening teeth. *Journal of the American Dental Association* 1999; 130: 227-35.
- McCracken MS, Haywood VB. Desmineralization effects of 10 percent carbamide peroxide. *Journal of Dentistry* 1996; 24: 395-398.
- McGuckin RS, Babin JF, Meyer BJ. Alterations in human enamel surface morphology following vital bleaching. *Journal of Prosthetic Dentistry* 1992; 68: 754-760.
- Hasab Mahmoud S, El Sayed Elembaby A, Ragheb Zaher A, El-Awady Grawish M, Elsabaa MH, El-Raof SA, Kader Sobh MA.
- Magalhães JG, Marimoto AR, Torres CR, Pagani C, Teixeira SC, Barcellos DC. Microhardness change of enamel due to bleaching with in-office bleaching gels of different acidity. *Acta Odontologica Scandinavica* 2012; 70: 122-126.
- Mahringer C, Fureder M, Kastner M, Ebner A, Hinterdorfer P, Vitkov L, Hannig M, Kienberger F, Schilcher K. Examination of native and carbamide peroxide-bleached human tooth enamel by atomic force microscopy. *Ultrastructural Pathology* 2009; 33: 189-196.

- Matis BA, Cochran MA, Wang G, Eckert GJ. A clinical evaluation of two in-office bleaching regimens with and without tray bleaching. *Operative Dentistry* 2009; 34: 142-9.
- Meredith N, Sherriff M, Setchell DJ, Swanson SAV. Measurement of the microhardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. *Archives of Oral Biology* 1996; 41: 539-545.
- Michel MD, Muhlen LV, Achete CA, Lepiensi CM. Fracture toughness, hardness and elastic modulus of hydrogenated amorphous carbon films deposited by chemical vapor deposition. *Thin Solid Films* 2006; 496: 481-488.
- Miguel LC, Baratieri LN, Monteiro S Jr, Ritter AV. In situ effect of 10% carbamide peroxide on resin-dentin bond strengths: A novel pilot study. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2004; 16:235-241.
- Minoux M, Serfaty R. Vital tooth bleaching: biologic adverse effects-a review. *Quintessence International* 2008; 39: 645-659.
- Mortazavi V, Fathi M, Soltani F. Effect of Postoperative Bleaching on Microleakage of Etch-and-Rinse and Self-etch Adhesives. *Dental Research Journal* 2011; 8:16-21.
- Mullins LP, Bruzzi MS, McHugh PE. Measurement of the microstructural fracture toughness of cortical bone using indentation fracture. *Journal of Biomechanics* 2007; 40: 3285-3288.
- Myoung S, Lee J, Constantino P, Lucas P, Chai H, Lawn B. Morphology and fracture of enamel. *Journal of Biomechanics* 2009; 42: 1947-1951.
- Nathoo SA, Chmielewski MB, Kirkup RE. Effects of Colgate Platinum Profesional Toothwhitening System on microhardness of enamel, dentin, and composite resins. *Compendium Supplement* 1994; 17: S627-630.
- Nathoo SA, Gaffar A. Studies on dental stain induced by antibacterial agents and rational approaches for bleaching dental stains. *Advances in Dental Research* 1995; 9: 462-470.

- Niihara K, Morena R, Hasselman DPH. Evaluation of K<sub>Ic</sub> of brittle solids by the indentation method with low crack-to-indent ratios. *Journal of Materials Science Letters* 1982; 1: 13–16.
- Nizam BRH, Lim CT, Chng HK, Yap AUJ. Nanoindentation study of human premolars subjected to bleaching agent. *Journal of Biomechanics* 2005; 38: 2204-2211.
- Ogura K, Tanaka R, Shibata Y, Miyazaki T, Hisamitsu H. In vitro demineralization of tooth enamel subjected to two whitening regimens. *Journal of the American Dental Association* 2013; 144: 799-807.
- Oktar FN. Microstructure and mechanical properties of sintered enamel hydroxyapatite. *Ceramics International* 2007; 33: 1309-1314.
- Oliver WC, Pharr GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of Materials Research* 1992; 7:1564-1583.
- Oltu U, Gürgan S. Effects of three concentrations of carbamide peroxide on structure of enamel. *Journal of Oral Rehabilitation* 2000; 27: 332-340.
- Osborn JW. A3-dimensional model to describe the relation between prism directions, parazonal and diazonal bands, and the Hunter-Schreger bands in human tooth enamel. *Archives of Oral Biology* 1990; 35: 869-878.
- Oshiro M, Kurokawa H, Ando S, Irokawa A, Miyazaki M, Platt JA. The effect of bleaching on the elastic modulus of bovine enamel. *Dental Materials Journal* 2007; 26: 409-413.
- Ouchterlony F. Stress intensity factors for expansion loaded star crack. *Journal Engineering Fracture Mechanics* 1976; 8: 447-448.
- Oyen ML. Nanoindentation hardness of mineralized tissues. *Journal of Biomechanics* 2006; 36: 2699–2702.
- Padmanabhan SK, Balakrishnan A, Chu MC, Kim TN, Cho SJ. Micro-indentation fracture behavior of human enamel. *Dental Materials* 2010; 26:100-104.

- Palo RM, Valera MC, Camargo SE, Camargo CH, Cardoso PE, Mancini MN, Pameijer CH. Peroxide penetration from the pulp chamber to the external root surface after internal bleaching. *American of Journal of Dentistry* 2010; 23:171-4.
- Park H, Hong Y, Kim J.S, Park C, Kim J.K. Surface morphology of laser deposited diamond like films by atomic force microscopy imaging. *Applied Physics Letters* 1996; 69:779-781.
- Park S, Quinn JB, Romberg E, Arola D. On the brittleness of enamel and selected dental materials. *Dental Materials* 2008; 24: 1477-1485.
- Pedreira de Freitas AC, Cardoso L, Brossi S. AFM analisys of bleaching effects on dental enamel microtopography. *Applied Surface Science* 2010; 256: 2915-2919.
- Pedreira De Freitas AC, Botta SB, Teixeira Fde S, Salvadori MC, Garone-Netto N. Effects of fluoride or nanohydroxiapatite on roughness and gloss of bleached teeth. *Microscopy Research and Technique* 2011; 74: 1069-1075.
- Perdigão J, Francci C, Swift EJ, Ambrose WW, Lopes M. Ultra-morphological study of the interaction of dental adhesives with carbamide peroxide-bleached enamel. *Journal of Dentistry* 1998; 11: 291-300.
- Plotino G, Buono L, Grande NM, Pameijer CH, Somma F. Nonvital Tooth Bleaching: A Review of the Literature and Clinical Procedures. *Journal of Endodontics* 2008; 34: 394-407.
- Pinto CF, Oliveira Rd, Cavalli V, Giannini M. Peroxide bleaching agent effects on enamel surface microhardness, roughness and morphology. *Brazilian Oral Research* 2008; 18: 306-311.
- Polydorou O, Hellwig E, Hahn P. The efficacy of three different in-office bleaching systems and their effect on enamel microhardness. *Operative Dentistry* 2008; 33: 579-586.



- Poole AJ. Treatment of biorefractory organic compounds in wool scour effluent by hydroxyl radical oxidation. *Water Research* 2004; 38: 3458-3464.
- Potocnik I, Kosec L, Gaspersic D. Effect of 10% carbamide peroxide bleaching gel on enamel microhardness, microstructure and mineral content. *Journal of Endodontics* 2000; 26: 203-6.
- Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. The effect of bleaching on enamel susceptibility to acid erosion and desmineralisation. *British Dental Journal* 2005; 198: 285-290.
- Price R, Sedarous M, Hiltz G. The pH of Tooth-Whitening Products. *Journal Canadian Dental Association* 2000; 66: 421-426.
- Pugh G Jr, Zidel L, Lin N, Stranick M, Bagley D. High levels of hydrogen peroxide in overnight tooth-whitening formulas: Effects on enamel and pulp. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2005; 17:40-45.
- Rasmussen ST, Patchin RE, Scott DB, Heuer AH. Fracture properties of human enamel and dentin. *Journal of Dental Research* 1976; 55:154-164.
- Reid D, Ferrell R. The relationship between number of striae of Retzius and their periodicity in imbricational enamel formation. *Journal of Human Evolution* 2006; 50: 195-202.
- Remizov SM, Prujansky LY, Matveevsky RM. Wear resistance and microhardness of human teeth. *Journal of Engineering in Medicine Institution of Mechanical Engineers* 1991; 205: 201-202.
- Ren YF, Amin A, Malmstrom H. Effects of tooth whitening and orange juice on surface properties of dental enamel. *Journal of Dentistry* 2009; 37: 424-31.
- Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Silva SM, Delbem AC, Machado MA, Buzalaf MA. Scanning electron microscopic study of the in situ effect of salivary stimulation on erosion and abrasion in human and bovine enamel. *Brazilian Oral Research* 2008; 22: 132-138.

- Rivera C, Arola D, Ossa A. Indentation damage and crack repair in human enamel. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2013; 21: 178-184.
- Rizkalla AS, Jones DW. Indentation fracture toughness and dynamic elastic moduli for commercial feldspathic dental porcelain materials. *Dental Materials* 2004; 20: 198-206.
- Robinson C, Weatherell JA, Hallsworth AS. Variation in composition of dental enamel within thin ground tooth sections. *Caries Research* 1971; 5:44-57.
- Rodrigues JA, Basting RT, Serra MC, Rodrigues AL. Effects of 10% carbamide peroxide bleaching materials on enamel microhardness. *American Journal of Dentistry* 2001; 14: 67-71.
- Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GMB, Heymann HO, Pimenta LA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study desing. *Dental Materials* 2005; 21: 1059-1067.
- Rodrigues JA, Oliveira GP, Amaral CM. Effect of thickener agents on dental enamel microhardness submitted to at-home bleaching. *Brazilian Oral Research* 2007; 21: 170-5.
- Sa Y, Chen D, Liu Y, Wen W, Xu M, Jiang T, Wang Y. Effects of two in-office bleaching agents with different pH values on enamel surface structure and color: an in situ vs. in vitro study. *Journal of Dentistry* 2012a; 40: 26-34.
- Sa Y, Wang Z, Ma X, Lei C, Liang S, Sun L, Jiang T, Wang Y. Investigation of three home-applied bleaching agents on enamel structure and mechanical properties: an in situ study. *Journal of Biomedical Optics* 2012b; 17: 035002.
- Sa Y, Sun L, Wang Z, Ma X, Liang S, Xing W, Jiang T, Wang Y. Effects of two in-office bleaching agents with different pH on the structure of human

- enamel: an in situ and in vitro study. *Operative Dentistry* 2013; 38:100-110.
- Saber-Samandari S, Gross KA. Micromechanical properties of single crystal hydroxyapatite by nanoindentation. *Acta Biomaterialia* 2009; 5: 2206-2215.
  - Sakar-Deliormanli A, Güden M. Microhardness and fracture toughness of dental materials by indentation method. *Journal of Biomedical Materials Research* 2006; 72: 257-264.
  - Saleh F, Taymour N. Validity of using bovine teeth as a substitute for human counterparts in adhesive tests. *Eastern Mediterranean Health Journal* 2003; 9: 201-207.
  - Salomão D, Santos D, Nogueira R, Palma-Dibb R, Geraldo-Martins V. Acid Demineralization Susceptibility of Dental Enamel Submitted to Different Bleaching Techniques and Fluoridation Regimens. *Operative dentistry* 2014; PMID: 24673418.
  - Sasaki RT, Arcanjo AJ, Florio FM, Basting RT. Micromorphology and microhardness of enamel after treatment with home-use bleaching agents containing 10% carbamide peroxide and 7.5% hydrogen peroxide. *Journal of Applied Oral Science* 2009; 17: 611-617.
  - Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *Journal of Endodontics* 2001; 27: 23-30.
  - Seale NS, McIntosh JE, Taylor AN. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. *Journal of Dental Research* 1981; 60:948-953.
  - Seghi RR, Denry I. Effects of external bleaching on indentation and abrasion characteristics of human enamel in vitro. *Journal of Dental Research* 1992; 71: 1340-1344.

- Sensabaugh C, Sagel ME. Stannous fluoride dentifrice with sodium hexametaphosphate: review of laboratory, clinical and practice-based data. *Journal of Dental Hygiene* 2009; 83: 70-8.
- Shannon H, Spencer P, Gross K, Tira D. Characterization of enamel exposed to 10% carbamide peroxide bleaching agents. *Quintessence International* 1993; 24:39-44.
- Shellis RP, Barbour ME, Jones SB, Addy M. Effects of pH and acid concentration on erosive dissolution of enamel, dentine, and compressed hydroxyapatite. *European Journal of Oral Sciences* 2010; 118: 475-482.
- Shereen A, Machado C, Sánchez E, Rashid R. Effect of home bleaching systems on enamel nanohardness and elastic modulus. *Journal of Dentistry* 2009; 37: 185-190.
- Smith A, Weller D, Roman I, Gedalia I. Effect of bleaching agents on microhardness and surface morphology of tooth enamel. *American Journal of Dentistry* 1998; 11: 83-85.
- Smith TM. Experimental determination of the periodicity of incremental features in enamel. *Journal of Anatomy* 2006; 208: 99-113.
- Soderholm KJ. Review of the fracture toughness approach. *Dental Materials* 2010; 26: 63-77.
- Soldani P, Amaral CM, Rodrigues JA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching and thickening agents on human dental enamel. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 2010; 30: 203-11.
- Spalding M, Taveira LA, de Assis GF. Scanning electron microscopy study of dental enamel surface exposed to 35% hydrogen peroxide: alone, with saliva, and with 10% carbamide peroxide. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*. 2003; 15: 154-64.

- Spears IR. A three dimensional finite element model of prismatic enamel: a reappraisal of the data of the Young's modulus of enamel. *Journal of Dentistry Research* 1997; 76: 1690-1697.
- Spyrides GM, Perdigao J, Pagani C, Araujo MA, Spyrides SM. Effect of whitening agents on dentin bonding. *Journal of Esthetic Dentistry* 2000; 12: 264-270.
- Staines M, Robinson WH, Hood JAA. Spherical indentation of tooth enamel. *Journal of Materials Science* 1981; 16:2551-2556.
- Stokes AN, Hood JA, Dhariwal D, Patel K. Effect of peroxide bleaches on resin-enamel bonds. *Quintessence International* 1992; 23:769-771.
- Sulieman M, Addy M, Macdonald E, Rees JS. A safety study in vitro for the effects of an in-office bleaching system on the integrity of enamel and dentine. *Journal of Dentistry* 2004; 32:581-590.
- Sulieman M, Addy M, Macdonald E, Rees JS. The bleaching depth of a 35% hydrogen peroxide based in-office product: a study in vitro. *Journal of Dentistry* 2005a; 33:33-40.
- Sulieman M. An overview of bleaching techniques: 2. Night Guard Vital Bleaching and non-vital bleaching. *Dental Update* 2005b 32:39-40, 42-44, 46.
- Sulieman M. An overview of tooth-bleaching techniques: chemistry, safety and efficacy. *Periodontol* 2000 2008; 48: 148-169.
- Sun L, Liang S, Sa Y, Wang Z, Ma X, Jiang T, Wang Y. Surface alteration of human tooth enamel subjected to acidic and neutral 30% hydrogen peroxide. *Journal of Dentistry* 2011; 39:686-692.
- Sunil ChR, Sujana V, Choudary TM, Nagesh B. In vitro action of various carbamide peroxide gel bleaching agents on the micro hardness of human enamel. *Contemporary Clinical Dentistry* 2012; 3: 193-196.

- Tam LE, Lim M, Khanna S. Effect of direct peroxide bleach application to bovine dentin on flexural strength and modulus in vitro. *Journal of Dentistry* 2005; 33: 451-458.
- Tay LY, Kose C, Loguercio AD, Reis A. Assessing the effect of a desensitizing agent used before in-office tooth bleaching. *Journal of the American Dental Association* 2009; 140: 1245-1251.
- Teixeira ECN, Ritter AV, Thompson JY, Leonard RH, Swift EJ. Effect of tray-based and trayless tooth whitening systems on microhardness of enamel surface and subsurface. *American Journal of Dentistry* 2004; 17:433-6.
- Tezel H, Sogut O, Ozata F, Dalgat H, Onur Z. Effect of bleaching agents on calcium loss from the enamel surface. *Quintessence International* 2007; 38: 339-347.
- Thesleff I, Vaahtokari A, Kettunen P y Aberg T. Epithelialmesenchymal signaling during tooth development. *Connective Tissue Research* 1995; 32: 9-15.
- Titley KC, Torneck CD, Smith DC, Adibfar A. Adhesion of composite resin to bleached and unbleached bovine enamel. *Journal of Dental Research* 1988; 67: 1523-8.
- Titley KC, Torneck CD, Smith DC, Chernecky R, Adibfar A. Scanning electron microscopy observations on the penetration and structure of resin tags in bleached and unbleached bovine enamel. *Journal of Endodontics* 1991; 17: 72-75.
- Titley KC, Torneck CD, Ruse ND. The effect of carbamide-peroxide gel on the shear bond strength of a microfilm resin to bovine enamel. *Journal of Dental Research* 1992; 71: 20-4.
- Titley KC, Torneck CD, Ruse ND, Krmec D. Adhesion of a resin composite to bleached and unbleached human enamel. *Journal of Endodontics* 1993; 19: 112-115.

- Titley K, Torneck CD, Smith D. The effect of concentrated hydrogen peroxide solutions on the surface morphology of human tooth enamel. *Journal of Endodontics* 1998; 14: 69-74.
- Torneck CD, Titley KC, Smith DC, Adibfar A. The influence of time of hydrogen peroxide exposure on the adhesion of composite resin to bleached bovine enamel. *Journal of Endodontics* 1990; 16: 123-128.
- Torres CR, Wiegand A, Sener B, Attin T. Influence of chemical activation of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on its penetration and efficacy-in vitro study. *Journal of Dentistry* 2010; 38: 838-846.
- Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: review of adverse effects and safety issues. *British Dental Journal* 2006; 200: 371-6.
- Tschoppe P, Neumann K, Mueller J, Kielbassa AM. Effect of fluoridated bleaching gels on the remineralization of predemineralized bovine enamel in vitro. *Journal of Dentistry* 2009; 37: 156-162.
- Türkun M, Sevgican F, Pehlivan Y, Aktener BO. Effects of 10% carbamide peroxide on the enamel surface morphology: a scanning electron microscopy study. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2002; 14: 238-244.
- Turner CH, Rho J, Takano Y. The elastic properties of trabecular and cortical bone tissue are similar: results from two microscopic measurement techniques. *Journal of Biomechanics* 1999; 32: 437-441.
- Turssi CP, Messias DF, Corona SM, Serra MC. Viability of using enamel and dentin from bovine origin as a substitute for human counterparts in an intraoral erosion model. *Brazilian Dental Journal* 2010; 21: 332-336.
- Ulukapi H. Effect of different bleaching techniques on enamel surface microhardness. *Quintessence International* 2007; 38: 201-205.

- Unlü N, Cobankara FK, Altinöz & F, Ozer C. Effects of home bleaching agents on the microhardness of human enamel and dentin. *Journal of Oral Rehabilitation* 2004; 31: 57-61.
- Van Meerbeek B, Willems G, Celis JP, Roos JR, Braem M, Lambrechts R, Vanherle G. Assessment by nano-indentation of the hardness and elasticity of the resin-dentin bonding area. *Journal of Dental Research* 1993; 73: 1434-1442.
- Venasakulchai A, Williams NA, Gracia LH, Rees GD. A comparative evaluation of fluoridated and non-fluoridated mouthrinses using a 5-day cycling enamel erosion model. *Journal of Dentistry* 2010; 38: 21-29.
- Walsh LJ. Safety issues relating to the use of hydrogen peroxide in dentistry. *Australian Dental Journal* 2000; 45: 257-69.
- Wandera A, Feigal RJ, Douglas WH, Pintado MR. Home-use tooth bleaching agents: an in vitro study on quantitative effects on enamel, dentin and cementum. *Quintessence International* 1994; 25:541-546.
- Weiger R, Kuhn A, Lost C. Effect of various types of sodium perborate on the pH of bleaching agents. *Journal of Endodontics* 1993; 19: 239-41.
- Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A, Attin T. Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion test? *Journal of Oral Rehabilitation* 2008; 35: 390-394.
- Willems G, Celis JP, Lambrechts P, Braem M, Vanherle G. Hardness and Young's modulus determined by nanoindentation technique of filler particles of dental restorative materials compared with human enamel. *Journal of Biomedical Materials Research* 1993; 27: 747-755.
- White DJ, Kozak KM, Zoladz JR, Duschner H, Gotz H. Peroxide interactions with hard tissues: Effects on surface hardness and surface/subsurface ultrastructural properties. *Compendium of Continuing Education in Dentistry* 2002; 23: 42-48.



- White SN, Luo W, Pine M L. Biological organization of hydroxiapatite crystalites into a fibrous continuum toughens and controls anisotropy in human enamel. *Journal of Dental Research* 2001; 80: 321-327.
- White AJ, Yorath C, ten Hengel V, Leary SD, Huysmans MC, Barbour ME. Human and bovine enamel erosion under 'single-drink' conditions. *European Journal Oral of Sciences* 2010; 118: 604-609.
- Xie ZH, Swain MV, Swadener G, Munroe P, Hoffman M. Effect of microstructure upon elastic behaviour of human tooth enamel. *Journal of Biomechanics* 2009; 42: 1075-1080.
- Xu HH, Smith DT, Jahanmir S, Romberg E, Kelly JR, Thompson VP, Rekow ED. Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin. *Journal of Dental Research* 1998; 77: 472-480.
- Yahyazadehfar M, Bajaj D, Arola DD. Hidden contributions of the enamel rods on the fracture resistance of human teeth. *Acta Biomaterialia* 2013; 9: 4806-4814.
- Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *Journal of Oral Science* 2011; 53: 273-282.
- Yeau-Ren J, Tsung-Ting L, Hsiu-Ming H, Hsin-Ju Ch, Dar-Bin S. Human enamel rod presents anisotropic nanotribological properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2011; 4: 515-522.
- Yeh ST, Su Y, Lu YC, Lee SY. Surface changes and acid dissolution of enamel after carbamide peroxide bleach treatment. *Operative Dentistry* 2005; 30: 507-515.
- Yesilyurt C, Sezer U, Ayar MK, Alp CK, Tasdemir T. The effect of a new calcium-based agent, Pro-Argin, on the microhardness of bleached enamel surface. *Australian Dental Journal* 2013; 58: 207-212.
- Yurdukoru B, Akoren AC, Unsal MK. Alterations in human enamel surface morphology following the use of an office bleaching agent and

- consecutive application of 37% phosphoric acid in vivo. *The Journal of Clinical Dentistry* 2003; 14: 103-107.
- Zalzal S, Smith Ch, Nanci A. Ameloblastin and amelogenin share a common secretory pathway and are co-secreted during enamel formation. *Matrix Biology* 2008; 27: 352-359.
  - Zheng Q, Xu H, Song F, Zhang L, Zhou X, Shao Y, Huang D. Spatial distribution of the human enamel fracture toughness with aging. *Journal of the Mechanical Behaviour of Biomedical Materials* 2013; 26: 148-54.
  - Zhou J, Hsiung LL. Depth-dependent mechanical properties of enamel by nanoindentation. *Journal of Biomedical Materials Research* 2007; 81: 66-74.
  - Zuryati AG, Qian OQ, Dasmawati M. Effects of home bleaching on surface hardness and surface roughness of an experimental nanocomposite. *Journal of Conservative Dentistry* 2013; 16: 356-361.





**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**



Los resultados de este trabajo de Tesis Doctoral fueron presentados en los siguientes Congresos:

- XVI Congreso Nacional y V Internacional de la Sociedad Española de Odontología Conservadora (Valencia 2008). “Caracterización mecánica de los tejidos duros dentales con nanoindentación”.
- Congreso 5<sup>th</sup> CONSEURO (Sevilla 2009). “Influence of load and indentation site on nanomechanical properties of enamel”.
- Congreso IADR 88<sup>th</sup> General Session (Barcelona 2010). “Effect of bleaching on enamel roughness parameters determined by atomic force microscopy” en la
- Congreso 45<sup>th</sup> Meeting CED-IADR (Budapest 2011). “Fracture toughness by energy development of bleached enamel” en la International”.

Y se publicaron en forma de artículo en 2010 y 2011:

- Giráldez I, Garrido MA, Gómez del Río T, Ceballos L, Rodríguez J. Comparison of the mechanical properties of dentin and enamel determined by different nanoindentation techniques: conventional method and continuous stiffness measurement. *Bol Soc Esp Ceram* 2010; 49: 177-182.
- Garrido MA, Giráldez I, Ceballos L, Rodríguez J. Micro/nano scratch of tooth enamel rod affected by bleaching treatment. *Wear* 2011; 271:2334-2339.



# Comparison of the mechanical properties of dentin and enamel determined by different nanoindentation techniques: conventional method and continuous stiffness measurement

I. GIRÁLDEZ DE LUIS<sup>1</sup>, M.A. GARRIDO<sup>2</sup>, T. GÓMEZ-DEL RÍO<sup>2\*</sup>, L. CEBALLOS<sup>1</sup>, J. RODRÍGUEZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias de la Salud III, Universidad Rey Juan Carlos, C/ Tulipán s/n, 28933 Móstoles, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Ciencia e Ingeniería de Materiales, Universidad Rey Juan Carlos, C/ Tulipán s/n, 28933 Móstoles, Madrid, Spain

(\*)mariateresa.gomez@urjc.es

The obtaining of mechanical properties as elastic modulus and hardness of enamel and dentin has been an important topic of study in material science. Due to the small size of the samples, nanoindentation test becomes an ideal technique for determining the mechanical properties of these structures. Despite numerous studies, there is no agreement on the values of elastic modulus and hardness. The present study analyzes the mechanical properties variability of enamel and dentin for two different bovine teeth by a conventional nanoindentation test. Also, this work compares the elastic modulus and hardness by two different nanoindentation techniques: conventional method (CM) and continuous stiffness measurement method (CSM). Two bovine incisor teeth were extracted, cleaned and stored at 4°C immersed in distilled water during one month. They were transversally sectioned and the crowns were cross-sectioned into 2 mm thick slices, obtaining 6 sections from each tooth. All sections were polished and kept fully hydrated in artificial saliva at room temperature for 24 hours. On each section, CT and CSM nanoindentation tests were carried out to obtain the elastic modulus and hardness of enamel and dentin. Both elastic modulus and hardness decrease as indentation load increases. However differences on mechanical properties values have been obtained depending of the nanoindentation technique applied.

*Keywords: Mechanical properties, enamel, dentin, nanoindentation, continuous stiffness measurement.*

## Comparación de las propiedades mecánicas de la dentina y del esmalte obtenidas mediante distintas técnicas de nanoindentación: método convencional y medida continua de la rigidez

La obtención de las propiedades mecánicas del esmalte y de la dentina se ha convertido en una tarea de importancia creciente en ciencia de materiales. Debido al tamaño reducido de las muestras, los métodos de nanoindentación se han convertido en una técnica idónea para este análisis. A pesar de los numerosos y recientes estudios, no existe un acuerdo generalizado en los valores de módulo elástico y dureza. El presente trabajo estudia la variabilidad en los valores de las propiedades mecánicas del esmalte y la dentina en dos dientes bovinos mediante nanoindentación. Este trabajo compara los valores obtenidos por dos técnicas de nanoindentación: método convencional (CM) y método de medida continua de la rigidez (CSM). Se extrajeron dos dientes incisivos bovinos, que fueron convenientemente higienizados y almacenados. De cada uno de los dientes se extrajeron 6 láminas de 2 mm de espesor. Todas las secciones fueron pulidas e hidratadas en saliva artificial a temperatura ambiente durante 24 horas. Se realizaron ensayos de nanoindentación empleando las técnicas CM y CSM para obtener el módulo elástico y la dureza del esmalte y la dentina. Los resultados muestran que los valores de ambas propiedades disminuyen a medida que aumenta la carga de indentación. Sin embargo se han observado diferencias en los valores de las propiedades mecánicas dependientes de la técnica de nanoindentación aplicada.

*Palabras clave: Propiedades mecánicas, esmalte, dentina, nanoindentación, medida continua de la rigidez*

## 1. INTRODUCTION

Enamel is the hardest tissue in the human body and is considered a nanostructured biocomposite in which its mineral phase predominates (95-96 wt. %) [1]. In this mineral portion, large hexagonal carbonated hydroxyapatite crystals are tightly packed creating prisms with a keyhole-like structure of about 5  $\mu\text{m}$  in diameter [2]. Prisms are aligned and run approximately perpendicular from the dentin-enamel junction to the tooth surface [3]. Each prism is separated from each other by a nanometer-thin layer of a protein-based organic matrix [4].

Enamel covers the underlying dentin, which is also a biological composite and forms the bulk of the tooth [5]. Dentin is composed of 70% inorganic material, 18% organic

matrix and 12% water (wt. %) [6]. This tissue has a distinct microstructure characterized by the presence of tubules (1-2  $\mu\text{m}$  in diameter) that run from the dentin-enamel junction towards the pulp [3, 7]. The tubules are surrounded by highly mineralized cylinders of peritubular dentin, roughly 0.5-1  $\mu\text{m}$  in thickness, composed largely of apatite. These tubules are separated by intertubular dentin that consists of a hydrated matrix of type I collagen that is reinforced with a nanocrystalline carbonated apatite [5].

Knowledge of the mechanical properties of human teeth is of importance as they act as a mechanical device during masticatory processes such as cutting, tearing and grinding of



food particles [8]. The knowledge of these properties allows to develop biomimetic restorative materials or improved oral treatments, and to comprehend the effect of the wide variety of restorative or esthetic dental procedures [4, 5, 9]. Elastic modulus and hardness are useful mechanical properties to describe the response of enamel and dentin [10].

In the last years, depth-sensing indentation has become a popular technique for mechanical characterization of mineralized biological tissues, including enamel and dentin [4, 5, 11, 12]. Due to its small probe size, nanoindentation is suited to measure local material properties in small, thin and heterogeneous samples [11, 13]. Nanoindentation also allows characterizing the properties of individual constituents within composite tissues, such as enamel and dentin, or mapping mechanical properties across a sample surface [13].

During a nanoindentation test, a loading process up to maximum load and a subsequent unloading are imposed on the material surface by an indenter of known geometry. Load-displacement data are continuously recorded to obtain a corresponding load-displacement curve. From the unloading branch and following the Oliver-Pharr method [14] is possible to obtain the elastic modulus and hardness. The nanoindentation test, described above, is known as conventional method (CM). However, there are others nanoindentation methods, like the Continuous Stiffness Measurement procedure (CSM), consisting of applying multiple unloading cycles of very small displacement (2nm), during the loading process. The Oliver-Pharr methodology [14] is also applied on each of these partial unloading cycles, providing values of elastic modulus and hardness as a continuous function of load or penetration depth.

Due to the test procedure, the values of mechanical properties, measured by nanoindentation, are affected by the superficial and subsuperficial conditions of the indented sample. In fact, in teeth chemical mapping coupled with nanomechanical mapping have determined that enamel and dentin properties are affected by variations in specimens moisture, mineralization, orientation of prisms and dentinal tubule density [15]. It can be inferred that elastic modulus and hardness values progressively decrease from the outermost surface to the pulp, dentin being softer and less stiff than enamel [10, 15].

The objectives of the present work were to determine the elastic modulus and hardness of enamel and dentin at different maximum indentation loads using two nanoindentation testing procedures. Conventional method, CM, and continuous stiffness measurement method, CSM, were used to establish if both methods provide mechanical properties dependent on the load.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Two bovine incisor teeth were extracted, cleaned and stored at 4°C for up one month. They were immersed in distilled water to which several crystals of thymol were added. The teeth were transversally sectioned in order to eliminate their root portion. Afterwards, the crowns were cross-sectioned into slices 2 mm thick, obtaining 6 sections from each tooth (Accutom-5, Struers, Copenhagen, Denmark). Slices from the incisal and cervical thirds were rejected. Both sections from the central portion were further bucco-lingually cut in two halves involving enamel and dentin.

All the specimens (n=12) were polished using a mechanical grinder (Labopol-5, Struers, Copenhagen, Denmark) on polishing cloths with alumina suspension slurry of 3 µm and OP-A (Struers, Copenhagen, Denmark) [16]. Afterwards the specimens were kept fully hydrated in artificial saliva at room temperature for 24 hours.

### 2.1. Nanoindentation measurements

Enamel-dentin specimens were studied by nanoindentation test using a Berkovich tip mounted on a nanoindenter (Nanoindenter XP-MTS) in order to determine their modulus of elasticity and hardness. Before every test, the Berkovich diamond indenter was calibrated on a standard fused silica specimen.

The central section of each specimen was divided into two halves. Each half section was studied using the CM method and the other one was evaluated by CSM method.

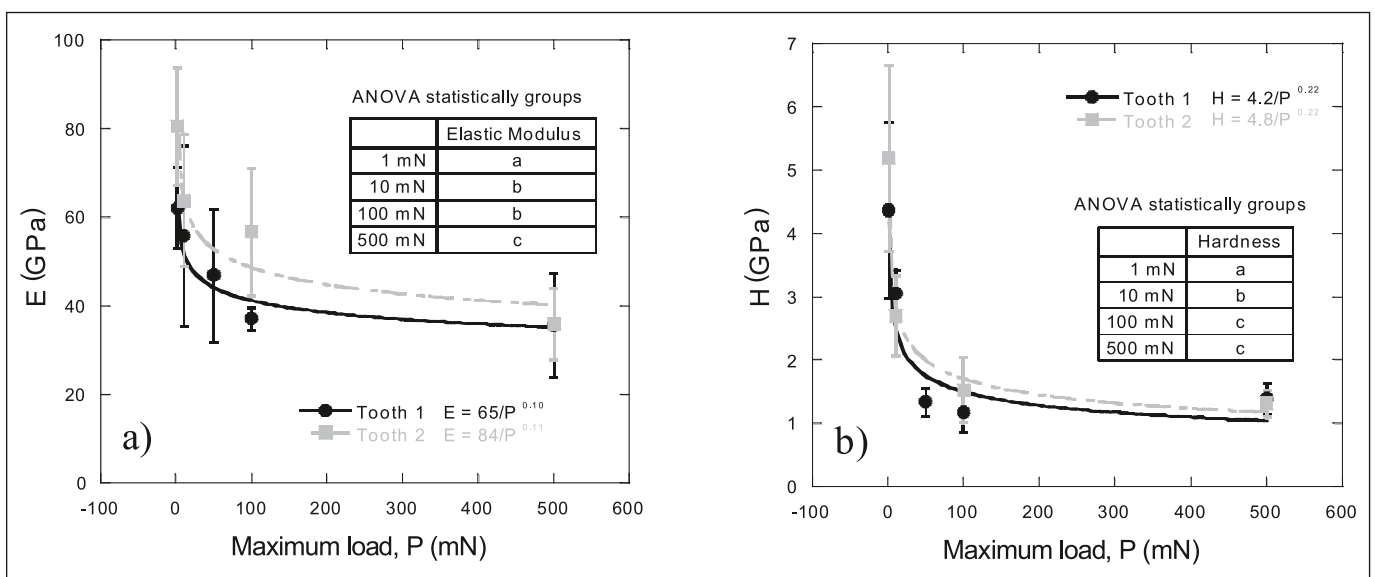


Figure 1. Mechanical properties of enamel as a function of maximum indentation load on two similar teeth using the CM nanoindentation methodology: a) elastic modulus, E; b) hardness, H.

2.1.1. MEASUREMENT WITH CM METHODOLOGY

Three parallel rows of 20 indentations were carried out at each 100 μm from the enamel outer surface to the pulp chamber, avoiding the enamel-dentin junction, for each maximum indentation load. The test control was in force. Rows of indentations were made applying maximum loads of 1 mN, 10 mN, 100 mN and 500 mN. In the last case, distance between indentations was increased to 200 μm in order to avoid residual stresses from other impressions.

2.1.2. MEASUREMENTS WITH CSM METHODOLOGY

Indentations were also performed on enamel and dentin, from the enamel surface to the pulp chamber. The test control was in displacement. Three rows of 20 indentations were done applying a load enough to penetrate 2 μm deep into the enamel and dentin; each indentation was separated 100 μm to each other. Consequently, for each row, ten indentations were carried out on the enamel and other ten on the dentin tissue. During the loading branch, continuous loading-unloading cycles with amplitude of 2 nm and a frequency of 45 Hz were superimposed.

The influence of the indentation load on elastic modulus and hardness determined with both nanoindentation methods was analyzed by Analysis Of Variance statistics (ANOVA). Statistical significance was considered at the 95% confidence level.

3. RESULTS

3.1. Mechanical characterization with CM method

Figures 1 and 2 show the mechanical properties as a function of maximum indentation load. Similar values of elastic modulus and hardness are obtained for both enamel and dentin, on two similar teeth. Therefore, these samples show a good reproducibility. In addition, for both samples, the elastic modulus and hardness of enamel and dentin decrease as indentation load increases. Furthermore, this trend is less

pronounced in dentin than in enamel. For this reason, in order to characterize enamel and dentin using CM and CSM indentation methods, the subsequent study has focused on the analysis of one tooth sample, since similar results and conclusions are expected with other similar tooth.

Figures 1 and 2 include the ANOVA statistics. It has been applied on the results of the nanoindentation tests with CM method in enamel and dentin, respectively, in order to separate the different statistical groups at different loads. This statistic checks if the differences observed in the values of elastic modulus and hardness obtained at different maximum indentation loads were significant.

In the case of enamel, Figure 1a, two-way ANOVA showed influence of the load applied on the values of modulus of elasticity (p<0.001). Values of modulus of elasticity decreased significantly as the loads increase. The maximum enamel stiffness was reached at 1 mN load and the minimum one at 500 mN load. Intermediate and similar values were obtained after 10 or 100 mN load application.

Similar to elastic modulus results, hardness values were only affected by the load applied (p<0.0001). Again, hardness decreased as loads increased (Figure 1b). The highest enamel hardness values were obtained when 1 mN load was applied. Lower values of hardness were registered for 10 mN load and statistically similar and lower values were determined for 100 mN and 500 mN loads.

In the case of dentin, Figure 2b, two-way ANOVA showed influence of the load applied on the values of elastic modulus (p<0.001) and hardness (p<0.001). Values of Young’s modulus were similar for 1 mN, 10 mN and 100 mN loads and significantly lower for a 500 mN load. Dentin hardness also showed a statistically reduction when loads were increasing with significantly different values among the four loads applied (Figure 2b).

3.2. Mechanical characterization with the CSM method

Using this method a continuous recording of elastic modulus and hardness values was obtained during the

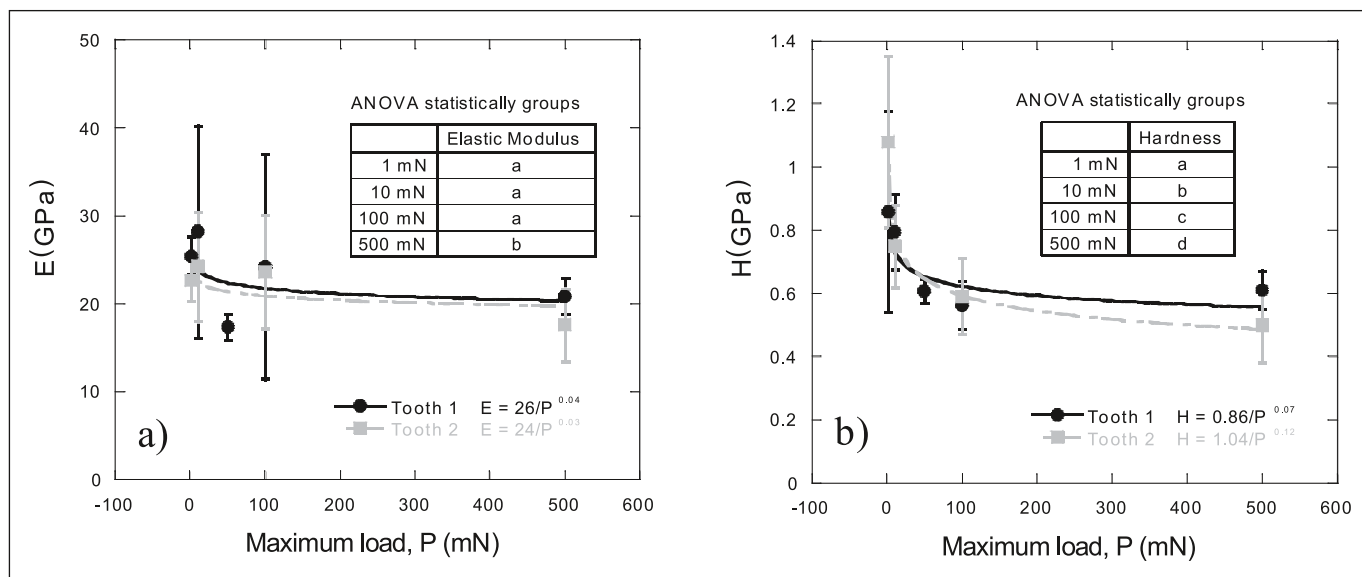


Figure 2. Mechanical properties of dentin as a function of maximum indentation load on two similar teeth using the CM nanoindentation methodology: a) elastic modulus, E; b) hardness, H.

indenter penetration up to 2  $\mu\text{m}$  deep into the enamel or dentin. Therefore elastic modulus and hardness data are obtained as a continuous function of penetration depth. Using the force-displacement curve data of each CSM test, each penetration depth can be related with an indentation load. Consequently, elastic modulus and hardness data can be obtained as a function of indentation load. In order to compare the results determined with both nanoindentation methods, selected indentation loads of CSM method were chosen. Therefore, 1mN, 10mN, 100mN, 200mN for enamel and 1mN, 10mN, 60mN for dentin were selected on CSM tests.

Figure 3a shows the average values of elastic modulus and hardness corresponding to CSM method for 1mN, 10mN, 100mN and 200mN on enamel. These values were slightly higher than those obtained with conventional method on enamel (Figure 1a).

In the case of enamel, Figure 3a, two-way ANOVA showed a significant influence on elastic modulus and hardness values of the load applied ( $p < 0.001$ ). A decreasing of both mechanical properties of enamel was observed as increased the indentation load ( $p < 0.0001$ ). Statistically significant differences among the lowest indentation loads (1 and 10mN) can be observed for both properties. In addition statistically differences are observed at the highest loads (100 and 200 mN) for elastic modulus; however no differences are shown for hardness.

In the case of dentin, Figure 3b, two-way ANOVA showed no influence of the load applied on the values of elastic modulus ( $p = 0.446$ ) and hardness ( $p = 0.168$ ). Values of elastic modulus and hardness were similar for 1 mN, 10 mN and 60 mN loads to those obtained with conventional method (Figure 1b).

Figure 4 shows the comparison of mechanical properties for enamel (figure 4a) and dentin (figure 4b) obtained from CM and CSM methods.

In comparing elastic modulus and hardness obtained from CM and CSM method on enamel, the values from CSM method are slightly higher than those obtained from CM method. This trend is obtained on dentin for the highest indentation loads; however no tendency is observed for the lowest ones.

#### 4. DISCUSSION

In the present study bovine lower central incisors were used instead of human ones. Previous reports have proven the similarity between human and bovine teeth regarding enamel and dentin radiodensity [17, 18, 19], number and diameter of dentin tubules [20] and dentin permeability [21]. Recently, it has been described that bovine enamel exhibits a greater presence of interprismatic substance and "fibril-like" structures around prisms [19]. However, Fonseca et al. [19] evaluated the influence of these microstructural differences on enamel hardness of bovine teeth in comparison with human ones, reporting no relevant effect. These authors consider that mineral concentration is more relevant than enamel microstructure on hardness values.

Different variables can affect to elastic modulus and hardness values obtained from nanoindentation tests. The variables analyzed in the present work are related to nanoindentation methodology and the material response:

- *Load effect:* Figure 4a shows that the elastic modulus and hardness values from CM method on enamel are lower than those obtained from CSM method. Furthermore, Figure 1 and 3a show a load-dependent behavior of these mechanical properties for both methods, respectively.
- *Microcracking process effect:* The enamel is a brittle material [17] and it could be affected during the indentation test. The solicitation on the material due to the Berkovich indentation may produce microcracks around the area indented. According to other authors [17] this decrease in elastic modulus and hardness of enamel with increasing load may be due to an increase in energy dissipation through the development of cracks and brittle fracture. This microcracking process could explain the notable decreasing in the mechanical properties with the maximum indentation load, independently of the nanoindentation method used (Figures 1, 2 and 3).

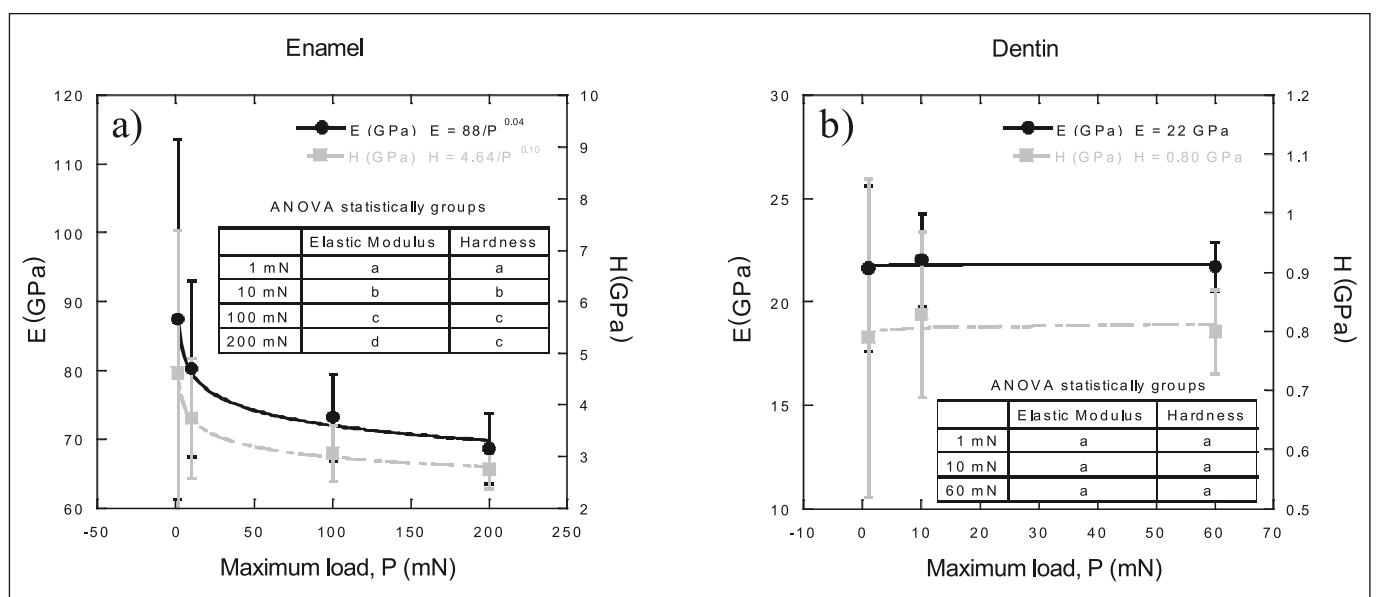


Figure 3. Values of elastic modulus and hardness corresponding to CSM method for 1mN, 10mN, 100mN and 200mN: a) on enamel; b) on dentin.

- *Test methodology effect:* In addition, the elastic modulus and hardness values are dependent of the nanoindentation procedure. The CSM method provides mechanical properties values lightly higher than CM one (Figure 4a). These differences could be a consequence of the test procedure. The CM method, a simple loading and unloading cycle of 30 s is applied; however CSM method a continuous loading and unloading cycles of 2nm with a frequency of 45 cycles/s are applied; and therefore, the test frequency is fairly different.

Figure 5 shows the contact stiffness of CM and CSM nanoindentation tests versus contact depth. According to Oliver and Pharr method [14], the contact stiffness should be a linear function of contact depth. The linear relation is maintained linear when both methods are used. The lack of linearity is evident at the highest loads when the CM method is applied, maybe due to a microcracking processes. In addition, comparing the linear tendency slope of contact stiffness versus contact depth for the lowest and medium loads, CSM method shows a lightly higher slope than CM method. Therefore, the contact stiffness seems to be dependent of the nanoindentation method.

The main cause of this discrepancy could be related to the different characteristic frequency of each method. Therefore, the creep effect developed by the protein-based organic layer between the prismatic rods could be more relevant when CM method is used. The CSM method seems to be less affected by the organic layer between the enamel rods than CM method.

On the contrary, dentin is a more ductile material and therefore should be less affected by the test procedure. The differences in elastic modulus and hardness values obtained from CSM and CM method are less marked than those obtained on enamel (Figure 4b).

Both methods show a linear tendency when the contact stiffness is plotted versus contact depth (Figure 5). In addition, for both indentation methods, no significant lack of linearity for indentation contact stiffness versus contact depth is observed (Figure 5), except for highest indentation loads (500mN) when the mechanical properties decrease considerably.

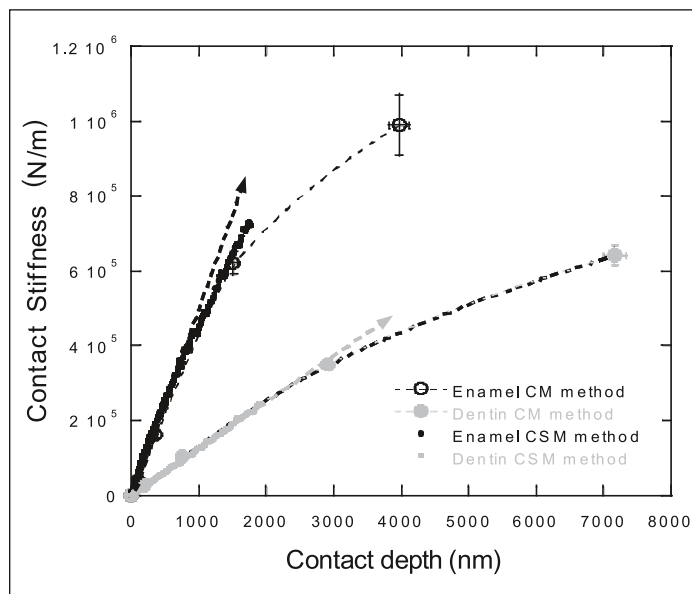


Figure 5. Contact stiffness of CM and CSM nanoindentation tests versus contact depth for enamel and dentin.

Young’s modulus and hardness results obtained in enamel are in agreement with those reported by other authors and it must be pointed out that these values span in a wide range [10, 16-17, 22-25].

Elastic modulus values ranged between 80.5 (13.20) and 35.98 (8.07) GPa determined with CM method and hardness values between 5.19 (1.46) and 1.32 (0.22) GPa. The highest results were obtained when the lowest indentation load was applied (1mN). Young’s modulus and hardness values reported by other authors are similar to those obtained in the present study with 1mN and 10 mN loading [2,4,12]. Elastic modulus and hardness obtained at 100 mN are in agreement with those previously determined by others authors [26]. However, the application of 500 mN produced a pronounced reduction in elasticity and hardness, with values lower than previously reported. It might be a consequence of microcracking phenomena.

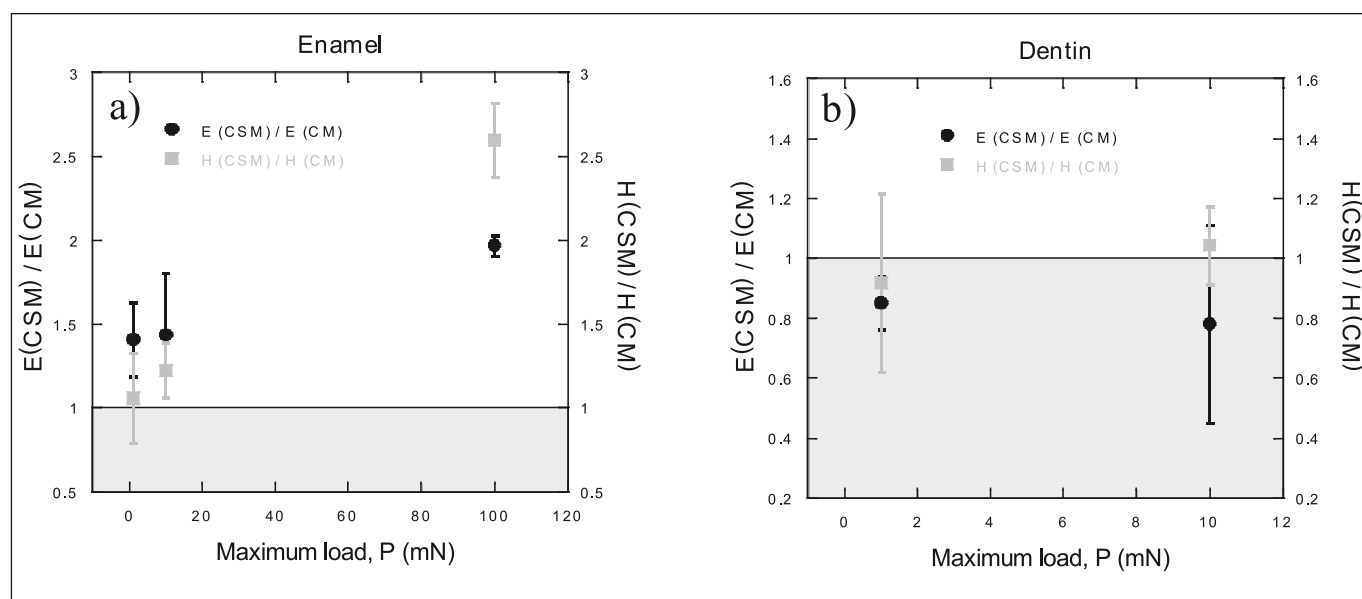


Figure 4. Relative values of mechanical properties obtained from CM and CSM methods: a) for enamel; b) for dentin.

With CSM method, elastic modulus values were between 87.48 (26.10) and 68.67 (5.03) GPa and hardness ranged between 4.62 (2.78) and 2.75 (0.38) GPa. In this case, elastic modulus and hardness values were higher than those determined by CM method.

In the present study a significant load-dependent behavior of mechanical properties of enamel was detected with both nanoindentation methods. An increase of indentation load was related to an evident decrease of elastic modulus and hardness, according to Low [27] and Park [17], and related to an increase of microcracking process. Both, indentation load and microcracking are related and affect to mechanical properties values obtained from nanoindentation tests. Thus, enamel does not exhibit a single elastic modulus or hardness for loads below 500 mN. Park [17] has previously reported that at indentation loads less than 500 mN the measurement reflects the real enamel's ability to resist permanent deformation. If the loading would be increased up to 2 N or more, enamel hardness will become load independent and reach a constant value [17]. Moreover, these hardness measurements would represent the tissue's resistance to indentation damage through the generation of new surface area (i.e. brittle fracture) [17].

In comparison with enamel, significantly lower mechanical properties were determined in dentin [15]. Modulus of elasticity values ranged between 22.68 (2.4) and 17.65 (4.14) GPa determined with CM method and 25.28 (3.67) and 16.99 (1.67) GPa measured with CSM method. These results are in agreement with those reported by Kinney [5]. Hardness values obtained with both nanoindentation methods were very similar, ranging between 0.5 (0.12) and 1.08 (0.27) GP, also agreeing with Low [27] and Roy [15].

Regarding the influence of load on the mechanical properties of dentin, modulus of elasticity values remained similar for all loads analyzed, independently of the nanoindentation method applied. In addition, elastic modulus measurements performed with CSM method were very similar and did not show a load-dependent mechanical behavior (figure 4b).

Hardness values determined with CM method decreased when higher loads are applied, in relation to the values obtained with CSM. In contrast, hardness measurements performed with CSM method were very similar and did not show a load-dependent mechanical behavior, agreeing with Low [26].

## 5. CONCLUSIONS

The main results of this work can be summarized in the following conclusions:

1. Both, elastic modulus and hardness show load dependence for both nanoindentation methodologies, CM and CSM.
2. The elastic modulus and hardness values obtained from CSM method are higher than those obtained from CM method. The test methodology could be the cause of these differences.
3. The contact stiffness decreases when the highest nanoindentation loads are applied. This effect may be a consequence of microcracking processes.

## REFERENCES

1. C. Robinson, S. Connell, J. Kirkham, R. Shorea, A. Smith. *Dental enamel-a biological ceramic: regular substructures in enamel hydroxyapatite crystals revealed by atomic force microscopy*. J. Mater. Chem. 14, p. 2242-2248, 2004.
2. S. Habelitz, S.J. Marshall, G.W. Marshall Jr., M. Balooch. *Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale*. Arch. Oral Biol. 46, p. 173-183, 2001.
3. A.R. Ten Cate. *Oral Histology: Development, Structure and Function*, Mosby, St. Louis, MO, 1994.
4. J.L. Cuy, A.B. Mann, K.J. Livi, M.F. Teaford, T.P. Weihs. *Nanoindentation mapping on the mechanical properties of human molar tooth enamel*. Arch. Oral Biol. 47, p. 281-291, 2002.
5. J.H. Kinney, M. Balooch, G.W. Marshall, S.J. Marshall. *A micromechanics model of the elastic properties of human dentine*. Arch. Oral Biol. 44, p. 813-822, 1999.
6. M. Giannini, C.J. Soares, R.M.D. Carvalho. *Ultimate tensile strength of tooth structures*. Dent. Mater. 20; p. 322-332, 2004.
7. G.W. Marshall Jr., S.J. Marshall, J.H. Kinney, M. Balooch. *The dentin substrate: structure and properties related to bonding*. J. Dent. 25; p. 441-458, 1997.
8. A. Kishen, U. Ramamurthy, A. Asundi. *Experimental studies on the nature of property gradients in the human dentine*. J. Biomed. Mater. Res. 51; p. 650-659, 2000.
9. I. R. Spears. *A three dimensional finite element model of prismatic enamel: a reappraisal of the data of the Young's modulus of enamel*. J. Dent. Res. 76; p. 1690-1697, 1997.
10. L.H. He, M.V. Swain. *Understanding the mechanical behavior of human enamel from its structural and compositional characteristics*. J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 1; p. 18-29, 2008.
11. M.L. Oyen. *Nanoindentation hardness of mineralized tissues*. J. Biomech. 39; p.2699-2702, 2006.
12. G. Balooch, G.W. Marshall, S.J. Marshall, O.L. Warren, S.A.S. Asif, M. Balooch. *Evaluation of a new modulus mapping technique to investigate microstructural features of human teeth*. J. Biomech. 37; p. 1223-1232, 2004.
13. F.M. Ebstein, L.A. Pruitt. *Nanoindentation of biological materials*. Nanotoday 1; 26-33, 2006.
14. W.C. Oliver, G.M. Pharr. *An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments*. J. Mater. Res. 7, p. 1564-1583, 1992.
15. S. Roy, B. Basu. *Mechanical and tribological characterization of human tooth*. Mater. Charact. 59, p. 747-756, 2008.
16. L. Ceballos, M.A. Garrido, V. Fuentes, J. Rodríguez. *Mechanical characterization of resin cements used for luting*. Dent. Mater. 23; p. 100-105, 2007.
17. S. Park S, J.B. Quinn, E. Romberg, D. Arola. *On the brittleness of enamel and selected dental materials*. Dent. Mater. 24; p. 1477-1485, 2008.
18. R.B. Fonseca, F. Haiter-Neto, A.J. Fernandes-Neto, G.A. Barbosa, C.J. Soares. *Radiodensity of enamel and dentin of human bovine and swine teeth*. Arch. Oral Biol. 49; p. 919-922, 2004.
19. R.B. Fonseca, F. Haiter-Neto, H.L. Carlo, C.J. Soares, M.A.C. Sinhoret, R.M. Puppim-Rontani, L. Correr-Sobrinho. *Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age*. Arch. Oral Biol. 53; p. 1023-1029, 2008.
20. R. Schilke, J.A. Lisson, O. Bauss, W. Geurtsen. *Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation*. Arch. Oral Biol. 45; p. 355-61, 2000.
21. G. Schmalz, K.A. Hiller, L.J. Nunez, J. Stoll, K. Weis. *Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions*. J. Endod. 27; p. 23-30, 2001.
22. B. Van Meerbeek, G. Willems, J.P. Celis, J.R. Roos, M. Braem, P. Lambrechts, G. Vanherle. *Assessment by nano-indentation of the hardness and elasticity of the resin-dentin bonding area*. J. Dent. Res. 72; p. 1434-1442; 1993.
23. H.H. Xu, D.T. Smith, S. Jahanmir, E. Romberg, J.R. Kelly, V.P. Thompson, E.D. Rekow. *Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin*. J. Dent. Res. 77; p. 472-80, 1998.
24. J.H. Kinney, M. Balooch, G.W. Marshall, S.J. Marshall. *A micromechanics model of the elastic properties of human dentine*. Arch. Oral Biol. 44; p. 813-822, 1999.
25. S. Park, D.H. Wang, D. Zhang, E. Romberg, D. Arola. *Mechanical properties of human enamel as a function of age and position in the tooth*. J. Mater. Sci.: Mater. Med. 19; p. 2317-2324; 2008.
26. H.H. Li, M.V. Swain. *Nanoindentation derived stress-strain properties of dental materials*. Dent. Mater. 23; p. 814-821; 2007.
27. I.M. Low, N. Duraman, U. Mahmood. *Mapping the structure, composition and mechanical properties of human teeth*. Mater. Sci. Eng. C 28; p. 243-247, 2008.

Recibido: 03/11/2009

Aceptado: 14/04/2010



# Nanotribological behaviour of tooth enamel rod affected by bleaching treatment

M.A. Garrido<sup>a</sup>, I. Giráldez<sup>b</sup>, L. Ceballos<sup>b</sup>, M.T. Gómez del Río<sup>a</sup>, J. Rodríguez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Mechanical Technology, School of Experimental Sciences and Technology, Rey Juan Carlos University, c/Tulipán s/n, Móstoles, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Stomatology, Human Anatomy and Embryology, Health Sciences Faculty, Rey Juan Carlos University, Avda. Atenas s/n, Alcorcón, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 16 September 2010

Received in revised form 10 January 2011

Accepted 10 January 2011

### Keywords:

Nanoscratch

Enamel

Wear rate

Friction coefficient

## ABSTRACT

Tooth enamel is a hybrid organic–inorganic bionanocomposite comprised predominantly of enamel rods. Understanding the effects of bleaching treatment on the biomechanical properties of this tissue is essential for clinical applications. Accordingly, this study is focused on the wear behaviour of the enamel using nanoscratch tests when a 38% hydrogen peroxide bleaching agent was applied.

A rounded conical diamond nanoindenter tip (1  $\mu\text{m}$  radius and 45° semiangle) was used to abrade untreated and bleached bovine enamel. Abraded lines of 10  $\mu\text{m}$  length were generated with constant maximum loads ranging from 100  $\mu\text{N}$  to 500  $\mu\text{N}$ . In addition normal and lateral forces were simultaneously measured along the single scratched lines. After the wear tests, the worn areas were scanned by the conical tip to determine the residual profile. Different friction coefficients and wear resistances were obtained depending on the enamel zone and the treatment applied.

The work was completed with the determination of mechanical properties by nanoindentation. Elastic modulus, hardness and fracture toughness were obtained to complete the analysis of bleaching agent effect.

Variations in the values of elastic modulus and hardness depending on the bleaching treatment have been observed. Additionally, friction coefficients and wear rates were affected by the application of bleaching. After initial increase, the enamel exhibited a recovery of properties when it was stored in artificial saliva.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The most important function of teeth is to grind food. As wear of the teeth would inevitably take place during natural function, the tissue in charged of bearing the mastication forces without failure, while retaining its shape, is the enamel [1].

Enamel is the hardest and stiffest tissue of mammals. It forms the outer layer of the coronal part of the tooth and is considered an organic–inorganic nanocomposite comprising a microstructure composed of hierarchical levels of increasing complexity and scale [2] (Fig. 1). The smallest structural units are needle or platelike hydroxyapatite crystallites which are roughly rectangular in cross section with a mean width of 45 nm and mean thickness of 25 nm [3]. These hydroxyapatite crystallites are organized and bundled together by a protein layer of not more than 2 nm creating larger scale structures called enamel prisms or rods. Enamel rods exhibit a “key-hole” or “fish-flake” appearance in a cross-section with a diameter of around 5  $\mu\text{m}$  [4]. Hydroxyapatite crystals in the cen-

tral part of the rod are parallel to the rod axis while those near the edge usually have an angle of near 45° to the longitudinal axis of the rods [5]. Enamel rods are encapsulated by a thin protein rich sheath with a width of around 800–1000 nm [6].

The enamel microstructure of all mammals appears to be very similar on a histochemical and anatomic basis [7–9]. In fact, bovine teeth are commonly used as substitute for human teeth in *in vitro* studies [10,11].

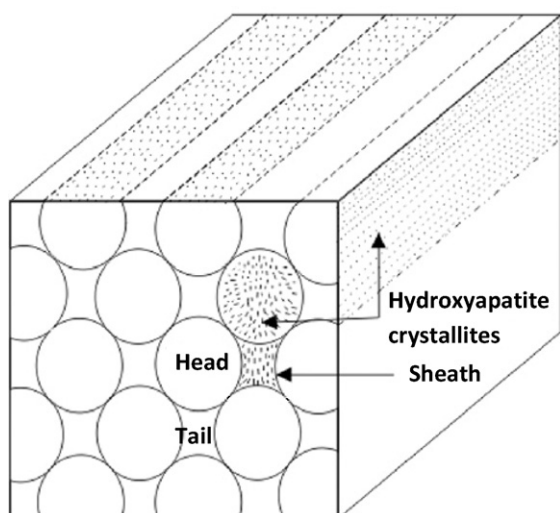
Nowadays, vital tooth bleaching has become a usually demanded treatment by patients because it represents an easy, effective and non-invasive procedure to improve the appearance of discoloured teeth [12].

The active agent included in contemporary bleaching agent's composition is hydrogen peroxide (HP) [13]. It can be applied directly or it can be obtained from carbamide peroxide decomposition. According to the peroxide product included in the composition and its concentration, professional in-office agents, professionally supervised agents for use by patients at home, and over-the-counter (OTC) bleaching can be distinguished [14].

In-office bleaching, or power bleaching, generally consists in the application of hydrogen peroxide or carbamide peroxide in high concentrations for shorter periods of time [14]. This procedure seems to be an appropriate alternative to home bleaching

\* Corresponding author at: Escuela de Ciencias Experimentales y Tecnología, Departamento de Tecnología Mecánica, Universidad Rey Juan Carlos, C/Tulipán s/n, E 28933 Móstoles, Madrid, Spain. Tel.: +34 914887159; fax: +34 914888150.

E-mail address: [jesus.rodriiguez.perez@urjc.es](mailto:jesus.rodriiguez.perez@urjc.es) (J. Rodríguez).



**Fig. 1.** Sketch of the microstructure of enamel. The main structural axes are: 0° and 90°.

applications with trays, foils or gels, especially in the case of very severe discolorations, discolorations of single teeth, lack of patient compliance or if a rapid treatment is desired [15].

The mechanism by which teeth are bleached by HP is not completely understood [16]. HP diffuses through enamel to reach the enamel dentine junction, dentine regions and the pulp and acts as a strong oxidizing agent through the formation of free radicals and HP anions [14]. As peroxide diffuses into the tooth, the chromogen molecules and stains would interact with these reactive molecules and their oxidation would lead to a reduction in colour, particularly in dentine [14,17].

The effects of this power bleaching on enamel surface are a matter of concern. Several studies have reported morphological changes in tooth surface appearance after 30% hydrogen peroxide bleaching [18,19], mineral loss [20], chemical composition [19–21], a decrease in enamel hardness and modulus of elasticity [20,22–24], and fracture toughness [25]. However, limited studies have evaluated the effects of whitening agents on nanomechanical and wear behaviour of enamel [22].

The exact mechanism by which the hydrogen peroxide affects the mechanical properties has yet to be fully understood and needs to be further studied. Hydrogen peroxide could react with both, the organic and inorganic structures of enamel. The inorganic phase may experience a process of demineralization [26,27] while the protein phase might undergo a process of denaturalization and removal. Additionally, Hegedüs et al. pointed that hydrogen peroxide could penetrate mainly along the enamel protein phase because the inorganic phase is much more compact than the organic one, and therefore, penetration through hydroxyapatite crystals would be lower [13].

According to Efeoglu [27], high concentration bleaching agents can produce a demineralization of enamel surface that could produce detrimental effects in patients susceptible to wear. Therefore, the oxidative effect, pH and composition of the bleaching agent would be relevant factors to take into consideration, as well as the immersion of the specimen in artificial saliva between treatments or the usage of fluoride [14,28–30].

The aim of this work, therefore, was to analyze the effect of a 38% HP marketed bleaching agent on the wear behaviour of bovine enamel and to determine the tribological properties evolution, immediately, 24 h and one week after the application of bleaching agent. Specimens were immersed in artificial saliva between testing procedures and nanoscratch tests were carried out on labial surfaces of enamel.

Bovine teeth are commonly used as substitute for human teeth in *in vitro* studies [10,11,31]. They are structurally similar as both dental enamels are constituted of hydroxyapatite prisms [2] which are actually cylindrical rods, and no substantial differences between their refraction indexes have been observed [32] or radiodensity [33]. Moreover, bovine dental enamel rod cross-section is described to exhibit keyhole-like shape as human enamel with similar dimensions to human prisms (8.8  $\mu\text{m}$  of major axis and 3.7  $\mu\text{m}$  of minor axis) [11].

The null hypothesis to be tested was that nanomechanical properties and wear behaviour of bovine enamel were not affected by a bleaching procedure with 38% HP, immediately after application, after 24 h or one week later.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample preparation

Two bovine incisors of 2-years-old were extracted, cleaned and stored in artificial saliva prior to the tests. The teeth crowns were sectioned in order to obtain enamel specimens from the middle third of the labial surface. The labial surfaces of the specimens were polished using a mechanical grinder (Labopol-5, Struers, Copenhagen, Denmark) on polishing cloths with alumina suspension slurry of 3  $\mu\text{m}$  and OP-A (Struers, Copenhagen, Denmark). The surface finishing was evaluated with images taking by the nanoindenter (Hysitron Triboscope, Hysitron Inc. Minneapolis, MN, USA) in an AFM mode using the nanoindenter tip prior to the scratch tests. The scanned area was squared shape of 30  $\mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$ . The resultant surface average roughness was less than 3 nm. Afterwards the specimens were kept fully hydrated at room temperature in artificial saliva. The saliva contained sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, sodium chloride, potassium phosphate, calcium chloride, magnesium chloride, hexahydrate, dihydrate, dibasic sodium diphosphate, and purified water.

The bovine incisors were bleached by the application of 38% HP (Opalescence Boost, Ultradent, USA) on the labial surface. Four applications of 15 min were performed, lasting the total procedure approximately 1 h according to manufacturer's recommendations.

To study the evolution of the bleaching effect, the mechanical and wear tests were done at different times after application of the HP agent: before bleaching treatment (Control); immediately after the bleaching agent was applied (Bleaching); 24 h after treatment application (24 h) and a week after the treatment application (Week). During the timeouts, the samples were stored in artificial saliva.

### 2.2. Mechanical tests

Hardness and elastic modulus of labial surface of bovine enamel were studied by nanoindentation using a Berkovich tip (Nanoindenter XP-MTS, Oak Ridge, TN, USA). Before each test, the Berkovich diamond indenter was calibrated on a standard fused silica specimen. A Continuous Stiffness Measurement module (CSM) was chosen to obtain these properties. This method consists of applying multiple unloading cycles of very small displacement during the loading process. The Oliver–Pharr methodology [34] was applied on each of these partial unloading cycles, providing values of elastic modulus and hardness as a continuous function of load or penetration depth. A maximum penetration depth of 300 nm was fixed for all nanoindentation tests. Three rows of 20 indentations were done on each sample and for each experimental condition. Each indentation was separated 100  $\mu\text{m}$  from each other. During the loading branch, continuous loading–unloading cycles with amplitude of 2 nm and a frequency of 45 Hz were superimposed.

Additionally, 5 indentations were done on each sample and for each experimental condition using the CSM module up to a maximum penetration depth of 2000 nm. This penetration depth is sufficient to generate a characteristic pattern of cracks, which are initiated at the corners of the Berkovich indenter and propagate along the enamel microstructure.

Combining of the model proposed by Laugier proposed toughness model [35] and the Ouchterlony's radial cracking modification factors [36], fracture toughness can be determined according to Eq. (1):

$$K_C = 1.073 \cdot x_V \cdot \left(\frac{a}{c-a}\right)^{1/2} \cdot \left(\frac{E}{H}\right)^{2/3} \cdot \frac{P}{c^{3/2}} \quad (1)$$

where  $x_V = 0.015$ ,  $a$  is the crack length from the indentation edge,  $c$  is the crack length measured from the indentation center,  $E$  is the elastic modulus,  $H$  is the hardness and  $P$  is the indentation load.

### 2.3. Scratch tests

Scratch tests were carried out using a nanoindentation device (Hysitron Triboscope, Hysitron Inc. Minneapolis, MN, USA) mounted on the scanner head of an AFM stage (Veeco-Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA).

A conical diamond indenter tip (nominal radius of  $\sim 1 \mu\text{m}$ ) was used. The actual indenter geometry was checked by a calibration procedure on fused silica. An accurate knowledge of the indenter geometry ensured that only the spherical area of the indenter had participated in the contact. The load was kept constant during the scratch test.

Five single scans at different loads of 100  $\mu\text{N}$ , 300  $\mu\text{N}$  and 500  $\mu\text{N}$  were done on the labial surface with a Tribointender equipped with an additional lateral force measurement device. The scratch distance was  $\sim 10 \mu\text{m}$  and the tip sliding speed was 0.3  $\mu\text{m/s}$ .

During each scratch test, normal load, normal displacement and lateral force were continuously measured providing the evolution of the friction coefficient.

To determine the volume of displaced material, images of the residual grooves were captured at a scan rate of 0.2 Hz with a resolution of  $512 \times 512$  lines. Wear rate was calculated as the volume of displaced material divided by the sliding distance and the normal load ( $\text{mm}^3/\text{mN}$ ).

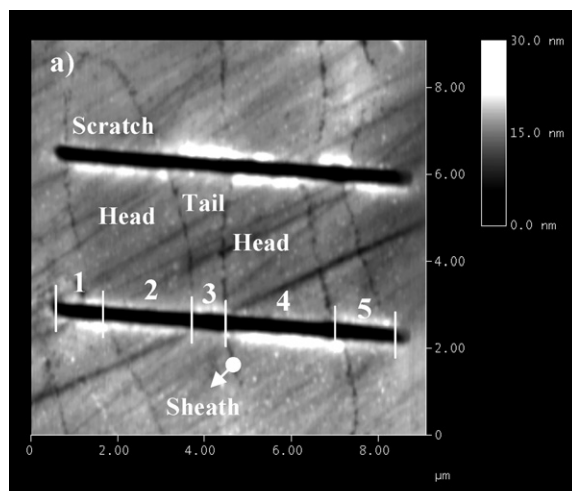


Fig. 2. Example of a scratch done on the labial surface of the enamel (control treatment and 500  $\mu\text{N}$  of normal load): (a) scratches ( $\mu\text{m}$ ); (b) normal displacement and friction coefficient versus lateral displacement.

**Table 1**  
Means and (standard deviations) of elastic modulus,  $E$ , hardness,  $H$  and fracture toughness  $K_C$  values from nanoindentation tests on labial enamel.

Treatment	$E$ (GPa)	$H$ (GPa)	$E/H$	$K_C$ ( $\text{MPa}\sqrt{\text{m}}$ )
Control	92 (6)	4.68 (0.31)	19.57 (0.39)	0.34 (0.01)
Bleaching	86 (7)	4.30 (0.46)	20.22 (3.08)	0.51 (0.02)
24 h	83 (7)	4.16 (0.50)	20.20 (3.21)	0.28 (0.01)
Week	76 (6)	4.25 (0.52)	18.04 (2.48)	0.32 (0.01)

## 3. Results

### 3.1. Mechanical properties

Table 1 summarizes the hardness and elastic modulus and the fracture toughness of labial enamel obtained from nanoindentation tests. The  $E/H$  relation has also been included. Some differences were observed as a consequence of bleaching application.

### 3.2. Scratch tests

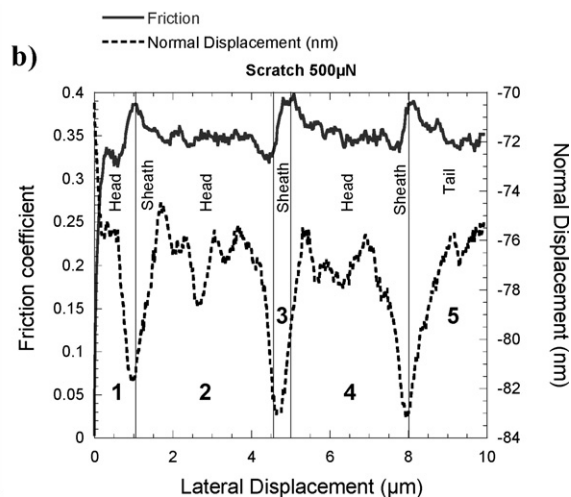
Fig. 2 shows a group of two typical scratches on the labial surface of the enamel. In Fig. 2a is possible to observe the typical “fish-flake” structure sectioned by an oblique plane (polished plane). In this arrangement, elliptical structures, corresponding to heads and tails of rods can be identified. Fig. 2b shows the normal displacement and friction coefficient obtained in the different microstructural regions (head, tail and sheath).

Note that comparing the friction coefficient and the normal displacement of the deformed heads and elongated tails, there was no appreciable difference. However, in the transition zone between both areas, the sheath, characterized by a high content of protein, both properties exhibited higher values than those obtained in the heads and tails.

### 3.3. Friction coefficient

Fig. 3 shows the friction coefficients of the labial area of enamel for all experimental conditions and microstructural locations. In general, the tail region exhibited a friction coefficient lightly higher than that of the head. Additionally, the higher the normal load, the higher the friction coefficient. Additionally, the friction coefficient for control treatment kept constant independently of normal load.

No evident trend is observed when friction coefficient is compared at different times after the bleaching treatment.





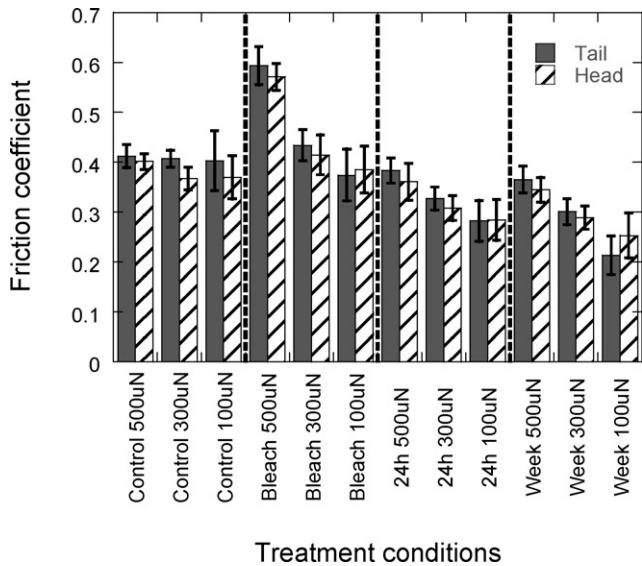


Fig. 3. Friction coefficients of the enamel corresponding to labial surface for different bleaching treatments: Control, Bleaching, 24 h and Week.

3.4. Wear rate

Fig. 4 shows the wear rate of the labial surface of enamel for all experimental conditions.

In general, the tail region showed a higher wear rate than the head region and the higher the scratch load the greater the wear rate.

Wear rates for both microstructural regions increased after the bleaching treatment. However, one week after the hydrogen peroxide application, the wear rates recovered the original values of the control samples.

The residual profiles are characterized by a pile up on the edges of the grooves (Fig. 5) which are a sign of the plastic deformation undergone by the enamel.

Fig. 6 summarizes the pile up measured respect to the labial surface. Obviously, the higher the scratch loads the higher the corresponding pile up. The pile-up developed on tail regions was always higher than that developed on heads. However, no trend of the bleaching effect has been inferred.

Fig. 7 shows the depth of the residual grooves. The depth developed on tail regions was always higher than that reached on heads. Additionally, the bleaching increased the depth of the residual

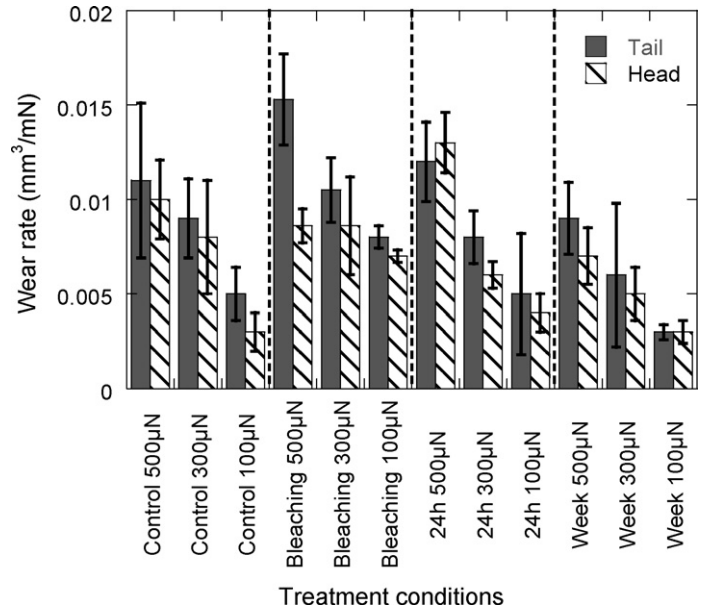


Fig. 4. shows the wear rate of the labial surface of enamel for all experimental conditions.

grooves; however, a week later these depths returned to the values obtained in control conditions. Therefore, there seems to be some recovery in the wear resistance of enamel during the storage time in saliva.

4. Discussion

There is some disagreement in the literature about the actual effect of bleaching agents on the wear properties of enamel. One of the driving forces of this work is to clarify this situation.

According to the results, nanomechanical and wear behaviour of enamel was affected by the application of 38% hydrogen peroxide and storage time in artificial saliva. Therefore, the null hypothesis has to be rejected.

4.1. Mechanical properties

The elastic modulus and hardness values showed in Table 1 are consistent and in agreement with values reported by others authors using nanoindentation technique [37–43]. These values

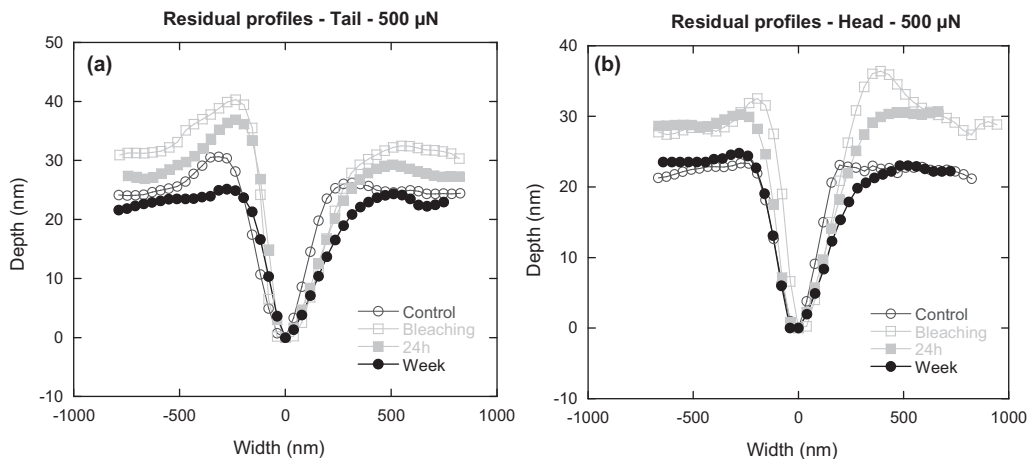


Fig. 5. Example of residual transversal profiles of scratch tests with different experimental conditions at 500 uN of normal load: (a) tail microstructural area; (b) head microstructural region.

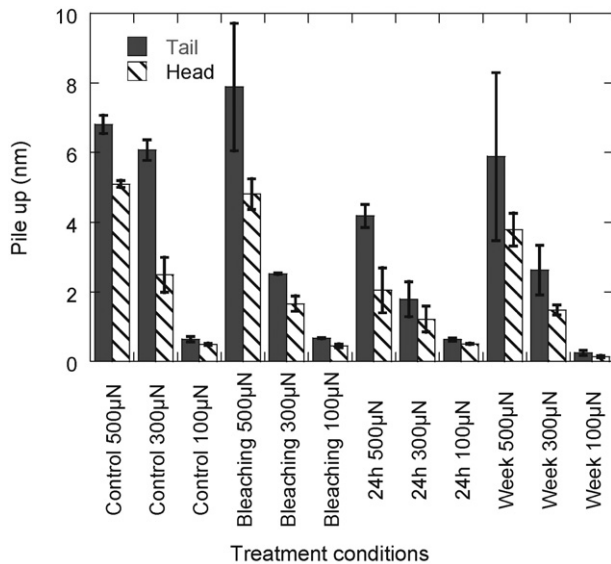


Fig. 6. Pile up developed during the scratch tests.

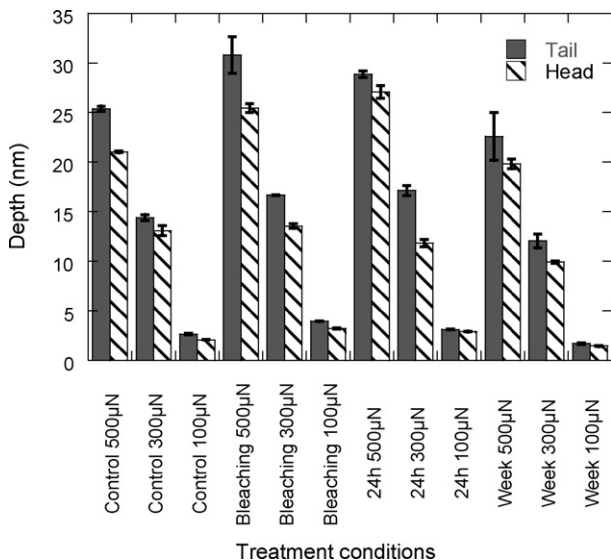


Fig. 7. Maximum penetration depth obtained in the residual profiles of scratch tests.

range between 3 and 6 GPa for hardness and 80 and 120 GPa for elastic modulus, according to variability in type of tooth, age of the donor, tooth region, orientation, specimen preparation and storage solutions.

According to the results showed in Table 1, elastic modulus and hardness decreased as a consequence of bleaching application. This effect has also been described by Azer et al. after the application of different home bleaching agents, including low hydrogen peroxide concentrations. Although studies with high concentrations of hydrogen peroxide are scarce a reduction in mechanical properties has been also determined. Nizam, 2005, reported significant decreases in the mean hardness (13–28%) and Young's modulus (18–32%) for enamel after 30% hydrogen treatment for 24 h. And, using microhardness technique, Al-Salehi [20] and Jiang [19] also demonstrated a significant microhardness loss using 30% hydrogen peroxide.

These changes in mechanical properties are presumed to be due to compositional or structural changes in specimens, however, the exact mechanism is not completely understood. Hydrogen peroxide has been described to produce demineralization of enamel rods

[20,27] and recently, more relevance is given to the possible loss and damage of the organic rod sheath material by free radical oxygen [24,42]. Proteins comprise only a minor part of enamel, but have the function of gluing hydroxyapatite crystallites together and maintaining the hierarchical structure of enamel. Therefore, the hazardous effect of bleaching agents on the protein fragments may compromise the mechanical behaviour of enamel [40].

Table 1 shows the evolution of elastic modulus and hardness values with time after bleaching application. One week after the bleaching treatment, the mechanical properties values continued decreasing. Therefore, the bleaching agent is still acting although it has been erased of the enamel surface. During time steps studied in this work, no remineralization process can be inferred according with the values of elastic modulus and hardness showed in Table 1. In contrast, other authors have proven that artificial saliva was effective for rehardening softened enamel surfaces [44].

However, when the fracture toughness is analyzed, a certain recovery is observed one week after the bleaching application. It could be consequence of a remineralization process. Therefore, this property seems to be more sensible to mineralization effect than elastic modulus or hardness.

It must be pointed out that although an evident reduction in mechanical properties has been determined, these results cannot be extrapolated to a clinical situation.

#### 4.2. Scratch discussion: friction coefficient, wear rate

One of the limitations is the difficulty in identifying the dominant wear mechanisms by conventional methods. Scanning Electron Microscopy observation generates uncontrolled damage in the samples and makes uncertain any type of conclusion in this sense. Despite of this, some relevant results have been obtained.

The most important results emerging from this work are shown in Figs. 3 and 4. Variations in the friction coefficient as well as in the wear rate were evident in our study. The observations suggest that the friction coefficient (Fig. 3) increased as a consequence of bleaching agent, but this effect was only relevant immediately after the bleaching application. 24 h and a week later, friction coefficient was similar or even lower than before the bleaching application.

This apparent recovery after some time of storage in artificial saliva is also observed in the measurement of wear rates and depth of the residual grooves. The initial increase in the wear rate after the bleaching application turned into values quite similar to those of the enamel before the treatment was applied. A direct relationship between degradation wear behaviour and demineralization is a plausible hypothesis, but more research is needed to confirm it. Mechanical properties measurements showed in Table 1 should contribute to understand this phenomenon, but although some differences were observed, the tendency is not evident except for fracture toughness.

Possibly, the observed reduction in the development of pile-up (Figs. 5 and 6) and depth of the residual grooves (Fig. 7) after application of the bleaching agent (24 h and Week) may be due to the remineralization process during storage of the teeth in artificial saliva [30].

More helpful is the analysis of the deformation mechanism during a scratch test. The response of the enamel under the conical tip was mainly elastic–plastic as indicates the development of pile-up in the residual groove edges (Figs. 5 and 6). Consequently, plastic deformation reveals as a plausible wear mechanism.

The contact pressures developed during the scratch tests range from 2.76 GPa to 7.53 GPa (Hertzian pressures). These high values are sufficient to shear and squeeze the protein phase between the mineral one and also to nucleate and propagate microcracks through the organic phase [45]. Therefore, both plastic deformation and microcracking wear mechanisms can influence on the

process of wear. Microcracking is also supported by Xu et al. [37] after indentation of human teeth with low indentation energy. This behaviour was explained by a cutting mechanism [37].

## 5. Conclusions

From the scratch experiments done, the following conclusions can be drawn:

Variations in the values of elastic modulus and hardness depending on the bleaching treatment have been observed; however no evident tendencies on the effect of bleaching on these mechanical properties could be established.

The fracture toughness showed a certain recovery one week after the bleaching application. This property seems to be more sensible to possible remineralization processes.

Friction coefficients and wear rates were affected by the application of bleaching. After initial increase, the enamel exhibited a recovery of properties when it was stored in artificial saliva during a week. The bleaching application caused an immediate dip in the wear resistance and friction properties. It seems that the enamel recovered both properties after being stored in artificial saliva. The final friction coefficients and wear rates were roughly similar to those characteristics of the enamel before bleaching agent was applied.

## References

- [1] G.M. Guidoni, M.V. Swain, I. Jäger, Wear behaviour of dental enamel at the nanoscale with a sharp and blunt indenter tip, *Wear* 266 (2009) 60–68.
- [2] D.R. Eisenmann, Enamel structure, in: A.R. Ten Cate (Ed.), *Oral Histology. Development, Structure and Function*, Mosby Co., St. Louis, 1998, pp. 218–235.
- [3] P.D. Frazier, Adult human enamel: an electron microscopic study of crystallite size and morphology, *J. Ultrastruct. Res.* 22 (1968) 1–11.
- [4] S. Habelitz, S.J. Marshall, G.W. Marshall, M. Balooch, Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale, *Arch. Oral Biol.* 46 (2001) 173–183.
- [5] D.F.G. Poole, A.W. Brooks, The arrangement of crystallites in enamel prisms, *Arch. Oral Biol.* 5 (1961) 14–27.
- [6] J. Ge, F.Z. Cui, X.M. Wang, H.L. Feng, Property variations in the prism and the organic sheath within enamel by nanoindentation, *Biomaterials* 26 (2005) 3333–3339.
- [7] H. Leicester, *Biochemistry of the Teeth*, Mosby Co, St. Louis, 1949, pp. 13–102.
- [8] T. Fujita, *Histology of the Teeth*, Ishiyaku Shuppan, Tokyo, 1957, pp. 21–132.
- [9] S. Suga, M. Kondo, K. Onodera, Y. Kubora, M. Ohtsuka, Electron microprobe analyses on the distributions of Cl, Mg, and Na in the enamels of various animals, *Jpn. J. Oral Biol.* 13 (1971) 85–94.
- [10] N.D. Ruse, C.C. Smith, C.D. Torneck, K.C. Tittley, Preliminary surface analysis of etched, bleached, and normal bovine enamel, *J. Dent. Res.* 69 (1990) 1610–1613.
- [11] R.P. Sanches, C. Otani, A.J. Damiao, W. Miakawa, AFM characterization of bovine enamel and dentine after acid-etching, *Micron* 40 (2009) 502–506.
- [12] P.W. Kihn, Vital tooth whitening, *Dent. Clin. North Am.* 51 (2007) 319–331.
- [13] A. Joiner, The bleaching of teeth: a review of the literature, *J. Dent.* 34 (2007) 412–419.
- [14] A. Joiner, Review of the effects of peroxide on enamel and dentine properties, *J. Dent.* 35 (2007) 889–896.
- [15] A.C. Pedreira de Freitas, L. Cardoso, S. Brossi, F. de Sa Teixeira, M.A. Cerqueira, N. Garone-Netto, A. Bona, M.C. Barbosa, AFM analysis of bleaching effects on dental enamel microtopography, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 2915–2919.
- [16] M. Sulieman, An overview of bleaching techniques. I. History, chemistry, safety and legal aspects, *Dent. Update* 32 (2005) 39–46.
- [17] I. Potočník, L. Kosec, D. Gašpersič, Effect of 10% carbamide peroxide bleaching gel on enamel microhardness, microstructure, and mineral content, *J. Endodont.* 26 (2000) 203–206.
- [18] C. Hegedüs, T. Bistley, E. Flora-Nagy, G. Keszthelyi, A. Jenei, An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface, *J. Dent.* 27 (1999) 509–515.
- [19] T. Jiang, X. Ma, Y. Wang, H. Tong, X. Shen, Y. Hu, Investigation of the effects of 30% hydrogen peroxide on human tooth enamel by Raman scattering and laser induced fluorescence, *J. Biomed. Opt.* 13 (2008) 014019.
- [20] S.K. Al-Salehi, D.J. Wood, P.V. Hatton, The effect of 24 h non-stop hydrogen peroxide concentration on bovine enamel and dentine mineral content and microhardness, *J. Dent.* 35 (2007) 845–850.
- [21] T. Bistey, I.P. Nagy, A. Sim, C. Hegedus, In vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel, *J. Dent.* 35 (2007) 325–330.
- [22] B.R. Hairul Nizam, C.T. Lim, H.K. Chang, A.U.J. Yap, Nanoindentation study of human premolars subjected to bleaching agent, *J. Biomech.* 38 (2005) 2204–2211.
- [23] I. Lewinstein, Z. Hirschfeld, A. Stabholz, I. Rotstein, Effect of hydrogen peroxide and sodium perborate on the microhardness of human enamel and dentin, *J. Endodont.* 20 (1994) 61–63.
- [24] T. Jiang, X. Ma, Z. Wang, H. Tong, J. Hu, Y. Wang, Beneficial effects of hydroxyapatite on enamel subjected to 30% hydrogen peroxide, *J. Dent.* 36 (2008) 907–914.
- [25] R.R. Seghi, I. Denry, Effects of external bleaching on indentation and abrasion characteristics of human enamel in vitro, *J. Dent. Res.* 71 (1992) 1340–1344.
- [26] A. Ben-Amar, R. Lieberman, C. Gorfil, Y. Bernstein, Effect of mouthguard bleaching on enamel surface, *Am. J. Dent.* 8 (1995) 29–32.
- [27] N. Efeoglu, D.J. Wood, Thirty-five percent carbamide peroxide application causes in vitro demineralization of enamel, *Dent. Mater.* 23 (2007) 900–904.
- [28] V. Cavalli, M. Giannini, R.M. Carvalho, Effect of carbamide peroxide bleaching agents on tensile strength of human enamel, *Dent. Mater.* 20 (2004) 733–739.
- [29] H.P. Chen, C.H. Chang, J.K. Liu, S.F. Chuang, J.Y. Yang, Effect of fluoride containing bleaching agents on enamel surface properties, *J. Dent.* 36 (2008) 718–725.
- [30] P. Tschoppe, K. Neumann, J. Mueller, A.M. Kielbassa, Effect of fluoridated bleaching gels on the remineralization of predemineralized bovine enamel in vitro, *J. Dent.* 37 (2009) 156–162.
- [31] A.F. Reis, M. Giannini, A. Kavaguchi, C.J. Soares, S.R. Line, Comparison of microtensile bond strength to enamel and dentin of human, bovine, and porcine teeth, *J. Adhes. Dent.* 6 (2004) 117–121.
- [32] D. Spitzer, J.J. Bosch, The absorption and scattering of light in bovine and human dental enamel, *Calcif. Tissue Res.* 17 (1975) 129–137.
- [33] R.B. Fonseca, F. Haiter-Neto, A.J. Fernandes-Neto, G.A. Barbosa, C.J. Soares, Radiodensity of enamel and dentin of human bovine and swine teeth, *Arch. Oral Biol.* 49 (2004) 919–922.
- [34] W.C. Oliver, G.M. Pharr, An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments, *J. Mater. Res.* 7 (1992) 1564–1583.
- [35] M.T. Laugier, New formula for indentation toughness in ceramics, *J. Mater. Sci. Lett.* 6 (1987) 355–356.
- [36] F. Ouchterlony, Stress intensity factors for the expansion loaded star crack, *Eng. Fract. Mech.* 8 (1976) 447–448.
- [37] H.H.K. Xu, D.T. Smith, E. Romberg, Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin, *J. Dent. Res.* 77 (1998) 472–480.
- [38] J.H. Kinney, M. Balooch, G.W. Marshall, S.J. Marshall, A micromechanics model of the elastic properties of human dentine, *Arch. Oral Biol.* 44 (1999) 813–822.
- [39] S. Park, D.H. Wang, D. Zhang, E. Romberg, Mechanical properties of human enamel as a function of age and location in the tooth, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (6) (2008) 2317–2324.
- [40] L.H. He, M.V. Swain, Understanding the mechanical behavior of human enamel from its structural and compositional characteristics, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 1 (2008) 18–29.
- [41] S.S. Azer, C. Machado, E. Sanchez, R. Rashid, Effect of home bleaching systems on enamel nanohardness and elastic modulus, *J. Dent.* 37 (2009) 185–190.
- [42] B. Zimmerman, L. Datko, M. Cupelli, S. Alapati, D. Dean, M. Kennedy, Alteration of dentin–enamel mechanical properties due to dental whitening treatments, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 3 (2010) 339–346.
- [43] I. Giráldez de Luis, M.A. Garrido, T. Gómez-del Río, L. Ceballos, J. Rodríguez, Comparison of the mechanical properties of dentin and enamel determined by different nanoindentation techniques: conventional method and continuous stiffness measurement, *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr.* 49 (2010) 177–182.
- [44] T. Attin, W. Buchalla, M. Gollner, E. Hellwig, Use of variable remineralization periods to improve the abrasion resistance of previously eroded enamel, *Caries Res.* 34 (2000) 48–52.
- [45] E. Maia, L.N. Baratieri, M.A. Caldeira de Andrada, S. Monteiro Jr., L.C. Vieira, The influence of two home-applied bleaching agents on enamel microhardness: an in situ study, *J. Dent.* 36 (2008) 2–7.