



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Análisis químico del esmalte dental humano tratado con una sustancia remineralizante experimental

Jennifer González García

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Odontología, Posgrado de Rehabilitación Oral
Bogotá, Colombia
2015

Análisis químico del esmalte dental humano tratado con una sustancia remineralizante experimental

Jennifer González García

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en Rehabilitación Oral

Directora:

Carolina Torres Rodríguez. PhD en Investigación en Estomatología

Codirector:

Edgar Delgado Mejía, MSc of Science,

Asesor:

Pedro Álvarez LLoret. PhD en Investigación en Mineralogía y Petrología

Línea de Investigación:

Materiales Dentales

Grupo de Investigación:

Grupo de investigación de Materiales Dentales GRAMO

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Odontología

Bogotá, Colombia

2015

NOTA DE ACEPTACIÓN

FIRMA DE JURADO

FIRMA DE JURADO

Bogotá, 6 de noviembre de 2015

A Dios, mi hijo, a mis padres y mi familia por su apoyo incondicional y paciencia durante esta etapa tan importante de mi vida profesional.

Agradecimientos

A Dios, a mi hijo y a mis padres por su apoyo incondicional, motivación y confianza en el transcurso de esta importante etapa importante en mi vida. Han sido de gran ayuda para la elaboración de este proyecto.

A mis directores: Doctora Carolina Torres por su apoyo, entrega, y confianza en mi trabajo. Su colaboración y su guía han sido indispensables para el desarrollo de este proyecto y para mi formación profesional. Al Profesor Edgar Delgado por su importante aporte y su colaboración en este proyecto. Al Profesor Pedro Álvarez de la Universidad de Granada por su apoyo y aporte en esta investigación.

Al Departamento de Ingeniería Química y de Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional, por su apoyo en esta investigación con la prestación de servicio de laboratorio de Infrarrojo y de Difracción de Rayos X. A la colaboración de Edgar Avendaño coordinador del laboratorio de Infrarrojo por su gran ayuda, Al profesor Luis Carlos Moreno de la facultad de química de la Universidad Nacional de Colombia or su colaboración en el análisis de DRX.

Al Doctor Edgar Torres coordinador del laboratorio CEREC de la Fundación CIEO, por su apoyo con la prestación del laboratorio y del espectrofotómetro Vita Easy Shade de la facultad.

A mis compañeras del posgrado por su apoyo, y compañía durante esta importante etapa de mi vida profesional.

A la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia, especialmente al Centro de Investigación y Extensión de la Facultad de Odontología por su y apoyo económico para la ejecución del proyecto.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue analizar químicamente el efecto de la aplicación de una sustancia remineralizante experimental (SRM) sobre el esmalte dental humano. Se tomaron 40 molares humanos repartidos aleatoriamente en 4 grupos, cada uno de 10 especímenes. Grupo 1: grupo sin tratamiento, Grupo 2: grupo tratado con peróxido de hidrógeno al 35%, Grupo 3. Grupo tratado con la sustancia remineralizante experimental, Grupo 4: grupo tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y después con la sustancia remineralizante experimental. Se tomaron registros de color con el espectrofotómetro antes y después del tratamiento. Los datos obtenidos fueron usados para calcular los diferentes parámetros de color (*L; *a; *b) y las diferencias de color (ΔL ; ΔA ; ΔB ; y ΔE). Se obtuvo polvo de la superficie vestibular de los especímenes y se por espectrometría Infrarroja FT IR y DRX de todas las muestras, para la composición orgánica e inorgánica del esmalte. Se realizó un análisis descriptivo de las pruebas aplicadas. Los resultados indican que la sustancia remineralizante experimental afectó las variables ΔL , ΔA ΔB y ΔE , mediante los resultados de FT IR, se encontró que en los grupos tratados con la sustancia remineralizante , no disminuyeron las bandas correspondientes a las proteínas y a los fosfatos por lo tanto disminuye la desmineralización dental. En los análisis por Difracción de rayos X no se encontraron cambios significativos en el contenido mineral en ninguno de los 4 grupos, en todas las muestras se observaron picos correspondientes a fases de hidroxiapatita. La sustancia remieralizante afecta el color y no afecta la composición química del esmalte dental humano.

Palabras clave: esmalte dental, blanqueamiento dental, espectroscopia infrarroja, remineralización del diente, difracción de rayos X.

Abstract

The aim of this study was to chemically analyze the effect of the application of an experimental remineralizing substance (SRM) on human dental enamel. 40 human molars randomly divided into 4 groups, each of 10 specimens were taken. Group 1: untreated group, Group 2: treated with hydrogen peroxide 35% group, Group 3. Group treated with the experimental remineralizing substance, Group 4: treated with hydrogen peroxide 35% and after with the remineralizing substance group. Color records taken with the spectrophotometer before and after treatment. The data obtained were used to calculate the various color parameters (L^* , a^* , b^*) and color difference (ΔL , ΔA , ΔB and ΔE). The dust of the labial surface of the specimens was obtained by abrasión all samples were analyzed by FTIR and XRD to determine their organic and inorganic composition. A descriptive analysis of the applied testing was performed. The experimental results indicate that the remineralizing substance affected the variables ΔL , ΔA , ΔB and ΔE , the FTIR results It was found that in the groups treated with substance remineralizing not decreased bands corresponding to proteins and phosphates so It decreases both dental demineralization. In the analysis by XRD, no significant changes were found in the mineral content in any of the 4 groups, in all samples corresponding to peaks hydroxyapatite phases were observed. Remieralizing substance affects the color and does not affect the chemical composition of human dental enamel.

Keywords: infrared spectroscopy, dental enamel, dental whitening, tooth remineralization, X-ray diffraction.

Contenido

Lista de figuras	¡Error! Marcador no definido.
Lista de tablas.....	13
Introducción.....	1
Objetivos	3
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1. ESMALTE DENTAL	4
1.1.1. Definición	4
1.1.2. Composición y Organización Estructural	4
1.1.2.1. Fase Inorgánica.....	4
1.1.2.1. Fase orgánica.....	8
1.1.3. Propiedades físicas del esmalte dental	9
1.1.3.1. Color.....	9
1.1.3.2. Reflexión	9
1.1.3.3. Translucidez	10
1.1.3.4. Opalescencia.....	11
1.1.3.5. Fluorescencia	12
1.1.3.6. Metamerismo.....	13
1.1.3.7. Brillo	13
1.2. COLOR.....	14
1.2.1. Definición.....	14
1.2.1. Dimensiones del color	15
1.2.2. Sistema de color CIE	16
1.2.2. Mediciones del color	17
1.3. BLANQUEAMIENTO DENTAL.....	19
1.3.1. Agentes blanqueadores.....	19
1.3.1.1. Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂):	20
1.3.1.2. Otras Sustancias blanqueadoras de tipo fisiológico y naturaleza inorgánica.....	22
1.4. REMINERALIZACIÓN.....	23
1.4.1. Sustancias remineralizantes y aplicación:.....	23
1.5. SUSTANCIA REMINERALIZANTE EXPERIMENTAL	30
1.6. Técnicas de análisis microquímico	32
1.6.1. Espectroscopia Infrarroja (IR).....	32
1.6.1.1. Espectroscopia con Transformada de Fourier (FTIR)	34
1.6.1.2. Reflectancia Total Atenuada (ATR)	38
1.6.2. Difracción de Rayos X	40
2. MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.1. Selección de la muestra	42
2.2. Tratamiento de la muestra.....	42
2.3. Análisis de la muestra	49
2.3.1. Análisis de color por espectrofotometría	49

2.3.2. Espectrometría infrarroja transformada de Fourier.....	50
2.3.3. Difracción de Rayos X	51
2.4. Análisis Descriptivo	52
3. Resultados y Discusión	53
3.1. Análisis de color por espectrofotometría.....	53
Delta L.....	54
Delta A	55
Delta B	55
Delta E	56
3.2. Espectrometría infrarroja transformada de Fourier	57
3.3. Difracción de Rayos X.....	69
4. Conclusiones y recomendaciones	73
Recomendaciones	74
Bibliografía.....	75

Lista de Figuras

Figura 1 Organización del esmalte, desde la formación de un cristalito hasta su espesor. Tomado del artículo de. Fu-Zhai Cui, Jun Ge. (17)	7
Figura 2 Reflexión de un objeto azul (21).....	10
Figura 3 Translucidez de un objeto (21).....	11
Figura 4 Opalescencia de un objeto (21)	12
Figura 5 Fluorescencia de un cuerpo (21).....	12
Figura 6 Espectro electromagnético tomado de www.reflexionesfotograficas.blogspot.com (24).....	14
Figura 7 Escala de Munsell. Imagen tomada de www.redgeomatica.rediris.es (25).....	15
Figura 8 Escala de de color CIE Lab. Imagen tomada de www.grimaldos.es (27)	16
Figura 9 Espectro de luz visible.	32
Figura 10 Zonas IR. Imagen tomada de http://www.urg.es (72)	33
Figura 11 Interferómetro de Michelson.Tomada de Tesis Doctora Carolina Torres (3). ..	34
Figura 12 Espectro IR de esmalte dental humano sin tratamiento. Se observan diferentes bandas características de los grupos funcionales correspondientes a los grupos Amidas, Fosfatos y Carbonatos.Tomada de Tesis Carolina Torres (3).	36
Figura 13 Esquema de funcionamiento del ATR. Tomada de Tesis Doctora Carmen Lucía Soares (73).	39
Figura 14 Variación de carbono en los tres grupos antes y después del tratamiento. (78)	40
Figura 15 Representación de la condición necesaria para la difracción de rayos X. Tomada de la tesis de la Doctora Carmen Soares (73).....	41
Figura 16 15 Limpieza, desinfección y conservación de los dientes. A). Retiro de tejido blando remanente. B). Lavado de espécimen con agua corriente. C). Secado del diente con papel absorbente. D). Posicionamiento del tapón de acrílico. F). Almacenamiento...	43
Figura 17 Espectrofotómetro Vita Easy Shade Advance. Imagen tomada de www.vita-zahnfabrik.com	44
Figura 18 Marcación de puntos equidistantes en cara vestibular	44
Figura 19 Peróxido de hidrógeno Pola oficce® 35%. Imagen tomada de www.ideiasweb.com.br	45
Figura 20 Grupo2, especímenes tratados con peróxido de hidrógeno al 35%.	45
Figura 21 Imagen de la sustancia remineralizante experimental.....	46

Figura 22 Tratado con la sustancia remineralizante experimental.....	46
Figura 23 Espécimen 434 del grupo 3, después de aplicar la sustancia remineralizante, se aplicó la sustancia maduradora por 12 horas y se cubrió con papel de cocina humedecido y cristaflex, para conservar humedad.	47
Figura 24 Grupo 4. Tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante experimental.	48
Figura 25 Lijas de óxido de aluminio de grano medio Microdont®. Imagen tomada de http://www.microdont.com.br/produtos/tiras-diamantadas-de-aco-inoxidavel-com-centro-neutro/	48
Figura 26 . Polvo de esmalte y frascos roscables rotulados.....	49
Figura 27 Formula Delta E. Imagen tomada del artículo de alghazali, N. (81).....	50
Figura 28 Manejo de la muestra para la toma de FTIR del esmalte. Fotografías tomadas en el laboratorio de espectrometría de infrarrojos en la Facultad de Química de la Universidad Nacional.....	50
Figura 29 Espectrometro de infrarrojo Nicolet iS10, ThermoScientific ®. Ubicado en el laboratorio 322 del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.	51
Figura 30 Difractómetro Panalytical X'Pert PRO MPD ® del Laboratorio de Difracción de RX del Departamento de Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.	52
Figura 31 Formula Delta E. Imagen tomada del artículo de alghazali, N. (81).....	53
Figura 32 Superposición de bandas de los 4 grupos. Grupo 1 control, Grupo 2 tratado con peróxido de hidrógeno al 35% (PH35%), Grupo 3 tratado con sustancia remineralizante experimental (SR), Grupo 4 tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante	58
Figura 33 Banda correspondiente a Amida A (3500-3300 cm-1).....	59
Figura 34 Banda correspondiente a Amida I (1660 cm-1).	60
Figura 35 Banda correspondiente a Amida II (a1550 cm-1).	61
Figura 36 Banda correspondiente a Amida III (1637 cm-1).	62
Figura 37 Banda correspondiente a Carbonatos (a1405 cm-1).	63
Figura 38 Banda correspondiente a ν_1, ν_3 (PO ₄) (1200-900 cm-1).	64
Figura 39 Comparación banda de fosfatos de grupo control color naranja y grupo 2 correspondiente al grupo tratado con peróxido de hidrógeno 35% color azul.	65

Figura 40 Comparación banda de fosfatos de grupo 3 y 4 correspondientes al grupo tratado con sustancia remineralizante experimental y con peróxido de hidrógeno 35% y sustancia remineralizante experimental.	66
Figura 41 Banda correspondiente a $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ (890-850 cm^{-1}).....	67
Figura 42 Difractogramas Grupo 1 (412), Grupo 2 (426), Grupo 3 (436), Grupo (537)....	70
Figura 43 Picos grupo control (Peak List), picos de patrón de hidroxiapatita (01-084-1998)	71

Lista de tablas

Tabla 1 Composición inorgánica del esmalte. Tomado del artículo de Sakae T 2006 (11).	4
Tabla 2 Tolerancia de coincidencia de color. Imagen tomada del libro de materiales de O'Brien (21).	17
Tabla 3 Clasificación de agentes blanqueadores. Tomada de trabajo de grado de Kerly Pulido (30). Se agregó la sustancia remineralizante experimental en el cuadro de sustancias blanqueadoras fisiológicas.	19
Tabla 4 Asignación de de bandas de FTIR del esmalte. (74)(3).	36
Tabla 5 Asignación de regiones y grupos moleculares en espectroscopia infrarroja.(7)(3).	37
Tabla 6 Análisis de correlación de la composición del esmalte a partir de FTIR y el tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%.(R) representa los coeficientes de correlación de Pearson. Los valores de $P < 0,05$ se encuentran con *, (N) es el número de especímenes estudiados. Los valores en rojo representan los componentes minerales y en azul los componentes orgánicos. Tomada de Tesis Doctoral Dra. Carolina Torres (3)	38
Tabla 7 Tabla de clasificación de los resultados de color.	53
Tabla 8 Gráfica de barras de variables L, A y B, antes y después de cada tratamiento.	54

Introducción

En la actualidad la estética dental se establece como patrón de belleza y se entiende bajo el concepto de tener dientes blancos, alineados y bien contorneados. El blanqueamiento de los dientes puede mejorar la belleza de la sonrisa y de este modo aumentar la demanda de los pacientes para recibir tratamientos estéticos. Entre las diversas terapias, el blanqueamiento dental ha ganado rápidamente la demanda como una forma fácil y asequible de tratar a los dientes pigmentados (1). A pesar de la controversia sobre su eficacia y seguridad, aún permanecen las preocupaciones generales sobre el impacto negativo de estas sustancias en el esmalte y demás tejidos dentarios.

Se conocen actualmente varias sustancias como el peróxido de hidrógeno, peróxido de carbamida y perborato de sodio para realizar blanqueamiento dental, la mayoría de estas sustancias funcionan por oxidación y ocasionan daños reversibles e irreversibles en los tejidos dentales como el esmalte dental donde se producen cambios químicos; como la pérdida de contenido mineral de calcio y fósforo que alteran su estructura la proporción Ca/Pa, superficie y por ende alteraciones en las propiedades mecánicas (1)(2). Los mecanismos de acción de los agentes oxidantes sobre el esmalte son: la degradación de la matriz extracelular, alteración de la hidroxiapatita y la oxidación de los agentes cromóforos que producen cambio de color. Estos cambios varían según la técnica y el producto utilizado (3)(4).

Debido a esto actualmente se están trabajando sustancias alternativas de tipo fisiológico como agentes blanqueadores como son la hidroxiapatita y el fosfato de calcio (5), que permiten obtener un cambio de color sin daño de la estructura. La Universidad Nacional trabaja actualmente en una sustancia remineralizante experimental que ha mostrado cambios en el color del esmalte dental después de su uso (6).

Uno de los métodos para conocer los cambios en la estructura química es la espectrometría de infrarrojos, que se define como una técnica de análisis que estudia la interacción entre la radiación infrarroja que corresponde a una zona del espectro electromagnético y la materia (3)(7). Esta técnica puede ser utilizada para identificar la

composición química del esmalte dental y sus cambios después de ser tratado con alguna sustancia (3).

Este estudio nos permitirá conocer y comprender los efectos de la sustancia remineralizante experimental sobre esmalte dental sano y tratado con agentes blanqueadores de tipo químico y fisiológico sobre los componentes orgánicos e inorgánicos mediante la técnica de análisis de espectrometría infrarroja, difracción de rayos X y cambios de color mediante mediciones con el espectrofotómetro Vita EasyShade.

Objetivos

Objetivo General

Analizar químicamente el efecto de la aplicación de una sustancia remineralizante experimental (SRM) sobre el esmalte dental humano.

Objetivos Específicos

Describir la composición química del esmalte humano sano

Establecer los efectos sobre la composición química del esmalte dental después de ser tratado con peróxido de hidrógeno.

Establecer los efectos sobre la composición química del esmalte dental después de ser tratado con la sustancia remineralizante (SRM)

Establecer los efectos sobre la composición química del esmalte dental después de ser tratado con peróxido de hidrógeno seguido de la sustancia remineralizante (SRM)

Analizar y comparar los resultados

MARCO TEÓRICO

1. 1. ESMALTE DENTAL

1.1.1. Definición

El esmalte dental es un tejido conectivo acelular altamente mineralizado y de elevada resistencia. Contiene más de 95% de apatito carbonatado, 1% de materia orgánica y 4-5% de agua en peso, deriva de un epitelio que cubre la corona del diente y una vez formado no se puede remplazar. (8)

La amelogenesis o el proceso de formación y biomineralización del esmalte se realiza en dos etapas, en la primera se produce un esmalte parcialmente mineralizado (aproximadamente 30%), el segundo paso implica, la entrada de minerales adicionales para la renovación de la materia orgánica y la entrada de agua para alcanzar el 96% del contenido mineral. Los ameloblastos secretan proteínas de la matriz y son los responsables de crear y mantener un ambiente extracelular favorable para la deposición de minerales. (9)(10)

1.1.2. Composición y Organización Estructural

1.1.2.1. Fase Inorgánica

Tabla 1 Composición inorgánica del esmalte.
Tomado del artículo de Sakae T 2006 (11).

Constituent	Tsuzuki (1967)	Brudevold and Soremark (1967)	LeGeros (1991)	Elliot (1994)	Mason (2003)
Ca	36.0	33.0—39.4	36.5	37.6	37.35
P	17.5	16.1—18.0	17.7	18.3	17.66
PO ₄		(49.4—55.2)	54.3		
Ca/P molar ratio	1.94		1.63		
Mg	0.42	0.25—0.56	0.44	0.2	0.27
Na	0.77	0.25—0.90	0.5	0.7	0.75
CO ₂	2.5	1.80—2.17	3.5	3.0	3.6
Cl	0.25	0.19—0.30	0.30	0.4	

Constituye un 95 - 96% de su estructura, su contenido básicamente es un fosfato cálcico cristalino (hidroxiapatita) (12), Esta composición permite realizar múltiples sustituciones en las que encontramos: El calcio por magnesio, sodio, potasio, los fosfatos e hidroxilo por CO_3^{2-} , F^- , HPO_4^{2-} , Cl^- , H_2O (11)(13). Modificando el tamaño del cristal, la dureza y la tasa de disolución (3).

- **Calcio y Fosfato:** Los cristales hidroxiapatita del esmalte están constituidos por calcio, fosfato y grupos hidroxilo ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$), pero pueden presentar sustituciones de iones como magnesio, sodio, cloro, potasio, carbonato, flúor y otros iones en porcentajes variables (14). Estas sustituciones modifican la red cristalina del apatito, altera el tamaño cristalino, afecta la dureza y disolución y otras propiedades(3). Los microanálisis por exploración electrónica del esmalte muestran que la concentración de calcio y fosfato aumenta ligeramente desde la unión dentina-esmalte hacia la superficie del esmalte. Por lo general el calcio se encuentra en un porcentaje más alto en la zona superficial, lo que genera un porcentaje de calcio y fosfato mayor en el esmalte dental. (11)

En los cristales de hidroxiapatita del esmalte los iones de calcio (Ca^{+2}), fosfato (PO_4^{-3}) e hidroxilo (OH^-) permanecen unidos por enlaces iónicos, debido a sus fuertes cargas eléctricas opuestas, estos iones pueden interactuar con las moléculas de agua, que también tienen carga eléctrica (30).

Durante la aplicación de sustancias ácidas se liberan H^+ y disminuye el pH. Los H^+ se difunden hacia el esmalte; allí reaccionan con los iones PO_4^{-3} y OH^- para formar fosfatos primarios (HPO_4^{-2}), fosfatos secundarios ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$), ácido fosfórico y agua. La disminución de la concentración de los iones PO_4^{-3} y OH^- define el estado de subsaturación que favorece que se sigan perdiendo más iones desde los cristales del esmalte. Por el contrario, si el pH aumenta (baja la concentración de H^+), los iones PO_4^{-3} , OH^- y Ca^{+2} quedan disponibles para reconstruir los prismas que han perdido iones (sobresaturación). Por lo tanto, se produce la remineralización (14).

- **Carbonato:** La superficie del esmalte es variable en cuanto a concentración del carbonato; un aumento en la concentración del carbonato hace más fácil la disolución ácida del esmalte. Las concentraciones en el esmalte externo disminuyen con la edad, mientras que en la parte central del esmalte no se observa ningún cambio; estas variaciones en la composición podrían deberse a la reducción de la actividad ameloblástica en la etapa final de la formación del esmalte (15).

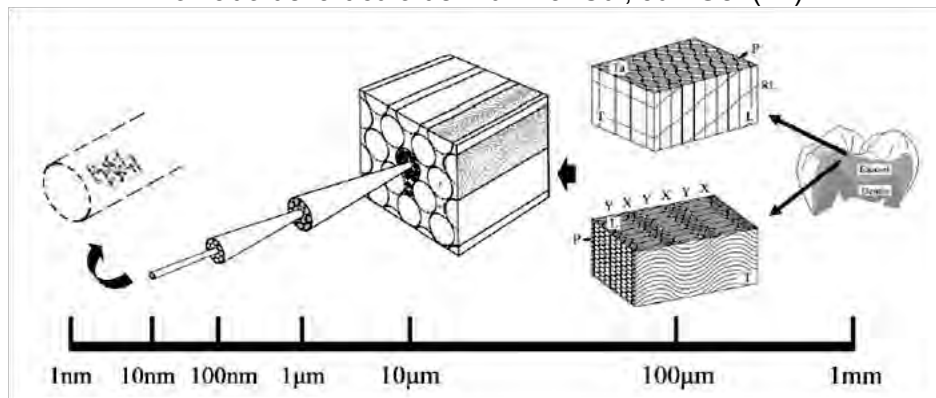
ELEMENTOS MINORITARIOS

- **Magnesio:** La función del magnesio en la fase inorgánica del esmalte, dentina y hueso no está clara. Se ha demostrado que el Mg que inhibe la remineralización. Estudios in vitro muestran que el Mg suprime la cristalización de la apatita, estabiliza DCPD (fosfato dicalcico dihidratado) y promueve su formación incluso en pH neutro; estabiliza el ACP y aumenta la solubilidad de apatitas sintéticas (16). Brudevold y Col., demostraron que el esmalte superficial tiene menor contenido de Mg que en el centro del esmalte intacto, y este aumenta hasta la unión amelodentinal. (15)
- **Flúor:** Se encuentra presente en el esmalte dental en un porcentaje bajo, y se encuentra en niveles más altos progresivamente desde la unión amelodentinal hasta la pulpa, siendo la dentina cercana a la pulpa la que contiene mayor cantidad de ión flúor. En el esmalte cumple protección contra la caries, cuando uno de los grupos hidroxilo de la hidroxiapatita es reemplazado por ión flúor. (11)
- **Cloro:** El cloro es capaz de intercambiarse con el grupo hidroxilo de hidroxiapatita, pero no está fijado en los tejidos calcificados. La distribución de la concentración de cloro disminuye desde la superficie del esmalte hasta la unión amelodentinal. (15)
- **Estroncio:** La absorción de estroncio ocurre antes de la erupción del diente, y durante su formación. La concentración es igual en la superficie y en la parte interna del esmalte, no se reportan cambios de concentración con la edad. (15)

La celdilla unitaria o unidad estructural del esmalte son las nanofibrillas formadas por cristales de hidroxiapatito (figura 1). Las nanofibrillas se unen con otras formando una unidad densa cristalina. El cristal tiene una forma hexagonal con una longitud de 60-70 nm y un ancho de 25-30 nm. Estos cristales se agrupan formando prismas y diferenciando la zona prismática y la sustancia interprismática. (17)

La zona prismática está compuesta por prismas o varillas alineadas que se ubican desde la unión amelodentinaria hasta la superficie externa del esmalte. Cuando estos prismas llegan a la porción cervical se tornan ondulados. Estas varillas tienen un ancho cercano a los 5 micrómetros y están compuestas por cristales de hidroxiapatita carbonatada y están re-cubiertas por enamelinas (17) (Figura 1).

Figura 1 Organización del esmalte, desde la formación de un cristalito hasta su espesor. Tomado del artículo de. Fu-Zhai Cui, Jun Ge. (17)



El esmalte tiene una porosidad apreciable, debido a la organización de los minerales, los poros internos son pequeños y variables en forma, orientación y distribución. Esta porosidad del esmalte determina la permeabilidad y difusión a través del mismo. Existen diferencias entre la porosidad inter e intraprismáticos en un diente y entre los diferentes tipos de dientes. La estructura del poro afecta las propiedades mecánicas y ópticas del esmalte. Los poros más grandes se asocian con las zona interprismática, muchos de los poros se relacionan con el cuerpo y las colas de los prismas, allí son elongados,

pequeños y en forma de túbulos, y pueden comunicarse con los que se ubican en la zona interprismática o intervarillar.(18)

1.1.2.1. Fase orgánica

Compuesta por proteínas no colágenas, las cuales son sintetizadas y secretadas por los ameloblastos. En la matriz del esmalte existen proteínas solubles e insolubles, péptidos, glucosaminoglicanos, proteoglicanos y diversas clases de lípidos (8).

Entre las proteínas de la matriz orgánica del esmalte encontramos:

- **Amelogeninas:** Son las más abundantes, son segregadas por los ameloblastos y odontoblastos, y constituyen la unidad primaria para la formación de la matriz del esmalte (18). Están presentes en un 90% al comienzo de la amelogénesis y disminuyen progresivamente a medida que aumenta la madurez del esmalte. Son moléculas hidrofóbicas, fosforiladas y glicosiladas. Se encuentran en los espacios, entre e incorporados a los cristales, ayudan a la permeabilidad del esmalte, inhiben el crecimiento lateral de los cristales y participan en la remineralización (9).

La formación de la matriz orgánica del esmalte ocurre simultáneamente que crecen y maduran los cristales de apatita, por lo que se ha propuesto que la maduración de las amelogeninas controlan el crecimiento cristalino y el espesor del esmalte (3)(19).

- **Enamelinas:** Conforman entre el 2-3% de la matriz orgánica. Son moléculas hidrofílicas y glicosiladas. Está presente en la superficie del cristal en crecimiento, específicamente en el estadio secretorio, y resultan de la degradación de amelogeninas (9).

- **Ameloblastinas o amelinas:** Son sintetizadas por los ameloblastos desde la etapa secretora hasta la etapa de maduración del esmalte. Ayuda al ameloblasto en la adherencia a la superficie del esmalte en el estado de secreción, y no interviene en la remineralización (9). Organizan la microestructura de la matriz creando espacios entre los cristales, impidiendo que se fusionen entre sí (19)

- **Tuftelina:** Son proteínas ácidas que se localizan cerca de la conexión amelodentinaria. Participan en la nucleación de los cristales de hidroxiapatita mediante el proceso de biomineralización (9).
- **Palvumina:** Proteína identificada en el polo distal del proceso de Tomes del ameloblasto secretor. Su función es transportar calcio del medio intracelular al extracelular. (9)

1.1.3. Propiedades físicas del esmalte dental

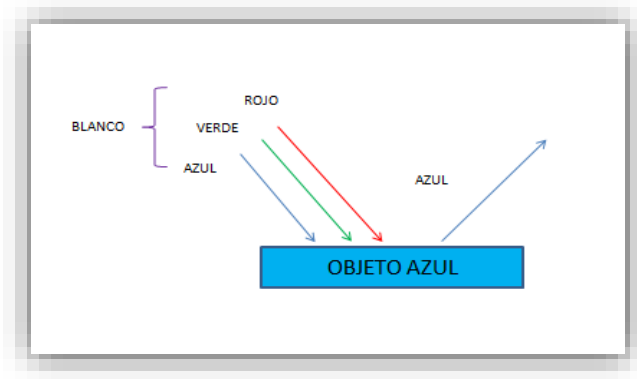
1.1.3.1. Color

El color de los dientes es el resultado de la combinación de factores intrínsecos (asociados con la dispersión de la luz, propiedades de absorción de esmalte y dentina) y extrínsecos (pigmentaciones por absorción o adsorción de materiales sobre la superficie del esmalte y la película dental). Existen cuatro fenómenos que se relacionan con la interacción entre los dientes y el flujo de luz: La transmisión de la luz a través del diente, la reflexión especular de la superficie, el reflejo de la difusión de la luz en la superficie y la absorción y dispersión de la luz dentro de los tejidos dentarios. En los dientes, el esmalte participa a través de la dispersión en longitudes de onda del rango y el color está dado por la dentina y sus cristales de hidroxiapatita (20).

1.1.3.2. Reflexión

Un material puede ser reflectivo cuando parte del espectro de luz que incide sobre él es absorbido y este refleja solo una parte de ese espectro de luz. Una superficie azul solo refleja la parte del espectro de luz azul y el resto es absorbido. Un objeto blanco refleja todas las ondas de luz que inciden sobre él mientras que uno negro las absorbe todas (21)(22).

Figura 2 Reflexión de un objeto azul (21)



1.1.3.3. Translucidez

Propiedad de la materia que permite el paso de la luz pero dispersa los rayos luminosos, de forma que a través del material no es posible ver los objetos situados detrás (21).

Los dientes humanos se caracterizan por diversos grados de translucidez, la cual puede ser definida como el gradiente entre transparente y opaco (21). El valor de la translucidez en la corona dental es menor porque vuelve menos luz al ojo, la cantidad de luz que atraviesa el esmalte depende del ángulo de incidencia (23).

Un color con alta translucidez parece ser más claro, la translucidez disminuye con el aumento de dispersión de la luz (22).

Figura 3 Translucidez de un objeto (21)



- **Translucencia:** También se puede definir como el gradiente entre transparencia y opacidad(23).
- **Transparencia:** Un cuerpo es transparente cuando deja pasar la luz por su interior sin dispersarla variando o no su color. Un cuerpo es transparente cromático cuando solo permite el paso de luz de una determinada longitud de onda y absorbe el resto, y es transparente acromático cuando permite el paso de luz sin variar el color. (22)

1.1.3.4. Opalescencia

La opalescencia se da cuando un material parece ser de un color cuando la luz se refleja de él y de otro color cuando la luz se transmite en él. En el esmalte dental la opalescencia se da en los prismas en los que se reflejan diferentes longitudes de onda en diversos grados. La opalescencia del esmalte le otorga profundidad óptica y la vitalidad dental (23) Una superficie dental refleja a través de partículas finas los rayos de longitud de onda cortos, las otras longitudes de onda del espectro luminoso se absorben. Por lo tanto el diente tendrá algunas zonas azuladas. La luz transmitida dará al diente una apariencia rojo anaranjada, ya que las longitudes de onda cortas han sido reflejadas y el observador sólo verá la luz a la longitud de onda mayor. (23)

Figura 4 Opalescencia de un objeto (21)



1.1.3.5. Fluorescencia

La fluorescencia es la absorción de luz de un material y su emisión en una longitud de onda. En los dientes esto ocurre inicialmente en la dentina, donde se absorbe la luz ultravioleta y se genera el espectro azul. El esmalte dental transforma los rayos ultravioletas invisibles para el ojo humano, en rayos de onda mayores a 400nm lo que los hace visibles hasta que termine la estimulación lumínica (23).

Figura 5 Fluorescencia de un cuerpo (21)



1.1.3.6. Metamerismo

Es el cambio en la coincidencia de colores de dos objetos bajo diferentes fuentes de luz. Sus diferentes curvas de reflectancia de color causan este fenómeno. (21)

1.1.3.7. Brillo

El brillo de la superficie es la propiedad óptica que produce una apariencia brillante. El lustre es la capacidad que tiene el objeto de difundir la reflexión. (21)

1.2. COLOR

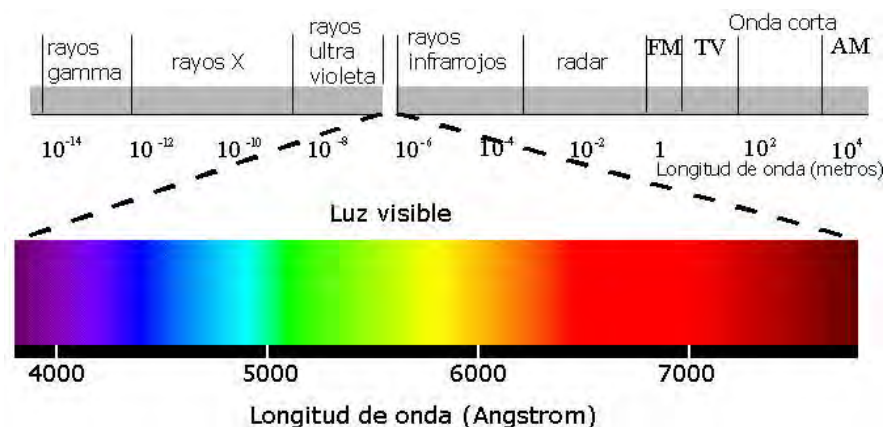
1.2.1. Definición

El color es el resultado de la impresión de los rayos de luz reflejados por un (22).

Es un fenómeno en el que influyen factores como la iluminación, la translucidez, la opacidad, la dispersión de la luz y el brillo. En la percepción del color pueden influir el ojo y el cerebro humano, la fuente de luz y el objeto (20).

La longitud de onda dominante de un color es la longitud de onda de una luz monocromática que, al mezclarse en las proporciones adecuadas con un color aramático (gris), da lugar al color percibido. La luz de longitud de onda más corta (350 nm) es de color violeta y la luz de longitud de onda más larga (700 nm) es roja. Entre estas dos longitudes de onda se encuentran las correspondientes a las luces azul, verde, amarillo y naranja (22) (Figura 6).

Figura 6 Espectro electromagnético tomado de www.reflexionesfotograficas.blogspot.com (24)



1.2.1. Dimensiones del color

Escala de Munsell

La escala de Munsell basa su análisis en las tres dimensiones del color: matiz, valor y croma. (17) (Figura 7).

- **Matiz - Tono:**

Calidad que distingue de un color a otro, al mezclarse se obtiene una gama de colores derivados formando un círculo, cromático (21).

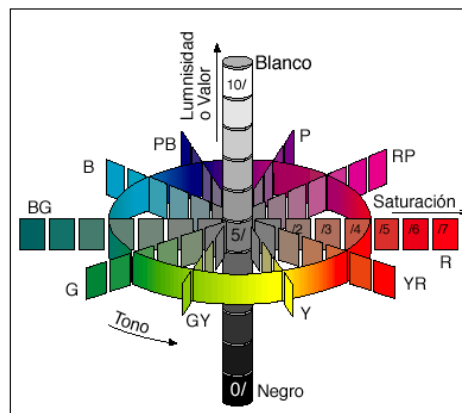
- **Valor**

Cantidad de luz reflejada de un objeto, en esta dimensión se distinguen los colores neutros de los cromáticos (21).

- **Croma**

Saturación, la intensidad o la fuerza del color (21).

Figura 7 Escala de Munsell. Imagen tomada de www.redgeomatica.rediris.es (25)



Munsell organizó la escala en tres dimensiones, en su eje central ordenó los valores de los colores que conocemos como la escala de luminosidades o claridades en una escala de grises, con valores del 1 al 10 donde el número uno corresponde al negro puro con un

0% de reflectancia y un 100% de absorción de color, y el número diez corresponde al blanco puro con un 100% de reflectancia y un 0% de absorción del color (26).

En forma circular encontramos los matices y en el eje vertical descendente ubicó los colores de acuerdo con su cromaticidad (21).

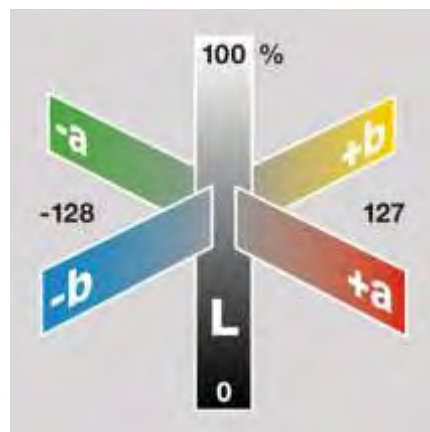
1.2.2. Sistema de color CIE

Evalúa el color en tres dimensiones de la percepción del estímulo del color (L^* , a^* , y b^*) (21).

Este sistema cuenta con un eje vertical que expresa la claridad o la oscuridad relativas. Los dos ejes horizontales reflejan los componentes de rojo/verde y amarillo/azul (21).

- “L” es una medida de la claridad de un objeto que va desde 0 (negro) hasta 100 (blanco).(20)
- “a” es una medida para la cualidad de rojo ($a > 0$) o de verde ($a < 0$). (20)
- “b” es una medida para la cualidad de amarillo ($b > 0$) o de azul ($b < 0$). (20)

Figura 8 Escala de de color CIE Lab. Imagen tomada de www.grimaldos.es (27)



El espacio cromático $L^*a^*b^*$ proporciona una representación tridimensional de la percepción del color. Cuando dos puntos que representan dos mediciones están superpuestos en el espacio, el valor de la diferencia de color es cero. Si la distancia entre dos puntos (L^*1, a^*1, b^*1 y L^*2, a^*2, b^*2) en el espacio cromático aumenta, se indica como " ΔE ". El término ΔE se deriva de la palabra alemana *Empfindung* (percepción), por lo que ΔE significa diferencia en la percepción (21).

La diferencia de color ΔE se define como:

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (21).$$

Tabla 2 Tolerancia de coincidencia de color. Imagen tomada del libro de materiales de O'Brien (21).

Diferencia de Color Delta E*	Similitud color clínico
<ul style="list-style-type: none"> • 0 • 0.5-1 • 1-2 • 2-3.5 • >3.5 	<ul style="list-style-type: none"> • Perfecto • Excelente • Bueno • Clínicamente aceptable • No aceptable

1.2.2. Mediciones del color

Se han descrito diferentes métodos de medición del color, como son los espectrofotómetros, colorímetros, cámaras digitales, sistemas de imagen y el sistema de Munsell.

Espectrofotómetro es un instrumento para la medición del color, mide los componentes de reflexión espectrales de un color y los convierte en un valor de triestímulo o en un valor

numérico internacionalmente reconocido. Puede indicar datos espectrales y proporciona una definición detallada del color medido (28).

Es uno de los instrumentos más precisos, útiles y prácticos para medir el color, en comparación el ojo humano u otras técnicas convencionales.(28).

Con un espectrofotómetro y una esfera de integración se pueden obtener curvas de reflectancia espectral en función de la longitud de onda para todo el intervalo de luz visible (405-700nm). A partir de los valores de reflectancia se pueden obtener los valores triestímulo (L^* , a^* , b^*) (22).

El Espectrofotómetro Vita Easy Shade permite determinar cromáticamente dientes naturales y restauraciones, donde se encuentran amplia gama de colores incluido colores blanqueados (28).

Un espectrofotómetro cubre todo el espectro de la luz visible desde 400 nm hasta 700 nm. A partir de este espectro se pueden calcular las funciones cromáticas XYZ y los valores $L^*a^*b^*$ y $L^*C^*h^*$ (28)

El Colorímetro es un instrumento que mide la absorción de longitudes de onda de la luz. Mide valores triestímulo y filtra la luz en rojo, azul y verde del espectro visible. Los colorímetros no registran reflectancia espectral y puede ser menos precisos que el espectrofotómetro (26).

Las cámaras digitales adquieren información de la imagen azul, roja y verde y la utilizan para crear una imagen a color. Se utiliza con un software que realiza una comparación de la imagen obtenida por la cámara con una guía del color previamente configurada (26). Se debe tener un adecuado manejo de balance de luz y una cámara con las especificaciones necesarias para captar el color real del objeto, ya que puede ocasionar variaciones en el color (21).

1.3. BLANQUEAMIENTO DENTAL

Es un procedimiento químico o físico por el cual se disminuye el croma y se aumenta el valor del diente afectado por manchas extrínsecas o intrínsecas. (29)

1.3.1. Agentes blanqueadores

Los agentes blanqueadores o sustancias se pueden clasificar en:

Tabla 3 Clasificación de agentes blanqueadores. Tomada de trabajo de grado de Kerly Pulido (30). Se agregó la sustancia remineralizante experimental en el cuadro de sustancias blanqueadoras fisiológicas.

Fisiológicas	Mecánicas	Químicas	Ópticas
<ul style="list-style-type: none"> • Hidroxiapatita • Fosfato de calcio • Sustancia remineralizante experimental (SRE) 	<ul style="list-style-type: none"> • Sílice hidratada • Carbonato cálcico • Fosfato dicálcico dihidrato • Pirofosfato de calcio • Alúmina • Perlita • Bicarbonato de sodio 	<ul style="list-style-type: none"> • Hexametáfosfato de sodio • Peróxido de calcio • Citrato de sodio • Tripolifosfato de sodio • Peróxido de hidrógeno • Peróxido carbamida 	<ul style="list-style-type: none"> • Blue covarine

1.3.1.1. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂):

El peróxido de hidrógeno es un agente oxidante que tiene capacidad de formar radicales libres, que pueden afectar las biomoléculas incluyendo lípidos, proteínas y carbohidratos, (1)

Cuando se aplica sobre el esmalte su ruta de difusión es a través de las vainas de los prismas, la matriz intercrystalina, las estrías de Retzius, y los cuerpos fusiformes o husos adamantinos. El peróxido de hidrógeno se difunde mediante la matriz orgánica del esmalte; generando una reacción de óxido-reducción (1)(31)(29). La penetración de la sustancia activa libera moléculas de oxígeno gaseoso, las cuales producen radicales libres como el anión superóxido y el anión hidroxilo, moléculas que generan una alta inestabilidad(1).

Con el uso de peróxido de hidrógeno se producen cambios estructurales en el esmalte dental con presencia de estrías, alteraciones de la capa aprismática y un aumento de la rugosidad superficial (31)(29). Esta sustancia actúa reduciendo los pigmentos cromóforos del diente, pero produce pérdida de elementos minerales ocasionado por el pH ácido que tiene esta sustancia, disminuyendo el pH del tejido dental (3)(32)(33). Se reporta que hay una pérdida de contenido mineral de calcio y fósforo asociada al uso de peróxido de hidrógeno al 38% y que este cambio puede deberse a que el blanqueamiento induce un fenómeno de oxidación que produce una pérdida de la matriz orgánica del esmalte (1)(32)(33). Zalkind y colaboradores (2) y Tezel y colaboradores (34), utilizando peróxido de hidrógeno al 35% y al 38%, hallaron que el peróxido al 38% causa mayor pérdida de calcio, dichos cambios dependen de la concentración y el tipo de peróxido, lo cual afecta la sustancia mineralizada del esmalte dental.

El peróxido de hidrógeno cambia la estructura de la apatito donde el fosfato es sustituido por carbonato, Otra sustitución que se puede presentar en el hidroxapatito es la formación de complejos metálicos (hierro), también el CO₃²⁻ es sustituido por iones OH⁻ que son liberados del peróxido de hidrógeno. Se cree que estas sustituciones pueden ser reversibles mediante la acción de fluoruros(3).

Actualmente se le han agregado a las diferentes fórmulas de peróxido de hidrógeno agentes espesantes como el Carbopol y la glicerina que aumentan la capacidad de adherencia a la superficie dental y aumentan el tiempo de contacto (3).

El carbopol es el agente espesante más comúnmente usado en blanqueamientos dentales, su concentración es por lo general entre 0,5% y 1,5%. Este polímero de ácido acrílico aumenta el tiempo de liberación de oxígeno activo del material de blanqueo hasta 4 veces más (35). El carbopol aumenta la capacidad desmineralizante del agente blanqueador, ya que no permite el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita por su alta unión al calcio. Mientras que la glicerina puede ser una barrera para el efecto desmineralizante del agente blanqueador (36)

Recientemente se añadió fosfato de calcio amorfo ACP a algunos agentes blanqueadores para uso doméstico, con el fin de que se precipite rápidamente en los defectos causados en la superficie del diente, y ayude a formar apatita, dando como resultado la remineralización del tejido dental, pero estos resultados no han sido ampliamente reportados en la literatura (37). Rodríguez y col. En su estudio demostraron que la adición de ACP a peróxido de hidrógeno puede producir un efecto remineralizante si el peróxido de hidrógeno está a bajas concentraciones (DayWhite ACP 7.5%), en relación con el efecto remineralizante de la saliva (37). Giniger y col. Demostraron que al agregar ACP al peróxido de carbamida al 16% disminuye considerablemente la sensibilidad durante y después del blanqueamiento dental.(38)

También se ha reportado que la adición de fluoruro de sodio al peróxido de hidrógeno produce menos desmineralización de la superficie dental e impide una disminución mayor de la microdureza del esmalte y disminuye la sensibilidad dental. (39)(40).

También se ha agregado a los agentes blanqueadores nitrato de potasio para disminuir la sensibilidad dental (41).

Algunos agentes blanqueadores necesitan activación por luz o calor, que acelera la descomposición del peróxido de hidrógeno, disminuyendo el tiempo del tratamiento. Este calor aumenta la temperatura intrapulpar y puede generar una necrosis pulpar o aumentar la sensibilidad dental (42)(43).

1.3.1.2. Otras Sustancias blanqueadoras de tipo fisiológico y naturaleza inorgánica

▪ **Fosfatos de calcio**

Es una sustancia con buena osteoconductividad, biodegradabilidad, bioactividad y ninguna citotoxicidad. Se ha reportado que es importante como precursora de la bioapatita en la biomineralización, por ejemplo, el fosfato de calcio amorfo en soluciones, se convierte en fases cristalinas estables, como fosfato octocálcico o productos de apatito (44). Vasconcelos y Col (45) en su estudio demostraron que el fosfato de calcio fue capaz de producir cambios en el color específicamente en los valores de a^* y L^* en su trabajo con espectrofotometría, concluyendo que estos cambios se realizaron sin la adición de peróxidos, y los relacionan con su acción remineralizante que puede aumentar el brillo y la translucidez del esmalte.

▪ **Hidroxiapatita**

Es un fosfato de calcio, que representa un alto porcentaje del contenido óseo, de la dentina y el esmalte dental (46). La hidroxiapatita se puede obtener de forma sintética y posee características de biocompatibilidad. También se ha reportado que la hidroxiapatita en la crema dental, no es un agente abrasivo. En el estudio de Motooniwa, Tsutomu Sato y Col (2001) (47) se observó que los dientes que se cepillaron con este tipo de cremas dentales blanquearon considerablemente, y que por el efecto de remineralización de la hidroxiapatita se da un blanqueamiento a partir de una reacción fisiológica y no química-mecánica como otros agentes(47).

▪ **Carbonato de calcio**

El carbonato de calcio es un polvo blanco, microcristalino, inodoro e insípido. Su fórmula química es CaCO_3 , resultado de la doble descomposición del cloruro de calcio y carbonato de sodio en solución acuosa (5).

La incorporación de carbonato de calcio en pasta de dientes muestra que realiza eliminación y prevención de manchas (31). Se ha reportado la eficacia de eliminación de manchas con cremas dentales que contienen carbonato de calcio y perlita, demostrando que esta formulación eliminó más manchas que las otras fórmulas utilizadas. (5)

1.4. REMINERALIZACIÓN

Se define remineralización como el proceso físico-químico donde se hay una ganancia de material calcificado en la estructura dental (46).

Se presenta una sobresaturación de iones en la solución con respecto al esmalte, produciéndose la formación de núcleos y el crecimiento de cristales. Cuando la solución está sobresaturada de iones, estos comienzan a formar enlaces y a deshidratarse, formando núcleos sólidos (46). Estos núcleos se agrupan y precipitan en forma de cristales en aquellos espacios del esmalte que por causa de la desmineralización, tienen una mayor área de contacto. Finalmente, los cristales recién precipitados crecen de forma isotrópica (en diferentes direcciones y velocidades), por deposición de iones en sus diferentes caras (46).

Los agentes remineralizantes más comunes son: saliva natural, saliva artificial que es una solución con solutos similares a los de la saliva natural y diferentes soluciones remineralizantes que contienen calcio y fosfato en concentraciones altas (48).

1.4.1. Sustancias remineralizantes y aplicación:

Saliva

Es un agente remineralizante natural (46) por su contenido de PO_4^{3-} . En condiciones fisiológicas mantiene el equilibrio entre la sustancia dental y la biopelícula. Los componentes de la saliva son un 99% agua con una variedad de electrolitos (calcio, fosfato, sodio, cloruro, potasio, bicarbonato y magnesio) y en un 1% proteínas formadas por enzimas con propiedades inmunológicas (inmunoglobulinas) y no inmunológicas (lisoenzima, lactoferrina, peroxidasa, glicoproteínas de mucina, aglutininas, histatinas, proteínas ricas en prolina, estaterinas y cistatinas (49)(50), también tiene glucosa y urea y amonio (51). Las proteínas ricas en prolina y las estaterinas ayudan a la remineralización

del esmalte, estas atraen iones calcio que se unen a la hidroxiapatita, impidiendo el crecimiento del cristal y la precipitación de sales fosfato cálcicas (52)(53). Estas proteínas contienen fosfoserilo que junto con los iones de calcio y fosfato impiden que los iones calcio y fosfato alcancen el tamaño requerido para la precipitación y la transformación a la fase cristalina (54).

La saliva se considera un vehículo para llevar a cabo el proceso de remineralización del esmalte a través de otros agentes remineralizantes (46). Después de un ataque ácido, el fluido salivar amortigua los H^+ , cuando el pH es superior a 5,5, hay remineralización, debido a que la saliva está sobresaturada de Ca^{+2} , PO_4^{-3} y F^- (39). También juega un papel importante en el proceso remineralización-desmineralización, ayudando en mantenimiento fisicoquímico del esmalte de las siguientes maneras: (55)

- Tiene actividad antibacteriana.
- Sirve como limpiador mecánico de la placa dental.
- Disminuye la solubilidad del esmalte por su contenido de iones de calcio y fosfato
- Amortigua y neutraliza la acción de los ácidos

La remineralización se realiza lentamente en la superficie de la lesión (56). La cantidad de calcio y fosfato que se gana, es menor a la que se pierde, dando como resultado una pérdida pequeña de minerales (56).

Saliva artificial

Puede ayudar en la remineralización del esmalte dental, pero por su contenido de carboximetilcelulosa, componente que aumenta la viscosidad, disminuye su difusión, este componente adicionalmente se une con los iones calcio, lo cual hace que no estén disponibles para que actúen en el proceso de remineralización (18).

Flúor

Entre los agentes remineralizantes del esmalte encontramos el fluoruro (46). Este ion se encuentra presente en los procesos de remineralización de la hidroxiapatita, favorece el

reemplazo de los hidroxilos por fluoruros, y de esta forma se produce el proceso de remineralización. El fluoruro se absorbe en la superficie de los cristales parcialmente desmineralizados y atrae iones de calcio para formar Ca_2F , que se disuelve liberando el fluoruro, que después se estabiliza formando en la superficie fluorhidroxiapatita, a expensas de la hidroxiapatita original, estos nuevos cristales son más resistentes al ácido, más estables y de menor solubilidad (57). La fluorhidroxiapatita que se forma en la superficie del esmalte aumenta su resistencia debido a que esta tiene menos carbonato y más fluoruro, por lo tanto el tamaño de los cristales aumenta (58).

En el momento que se forma la fluorapatita, la hidroxiapatita se disuelve (18). Este proceso no es considerado como remineralización debido a que el mineral que es depositado no es igual al que se le perdió, pero si disminuye la tasa de desmineralización, teniendo como resultado una disminución en la disolución del esmalte (59).

La reacción del flúor con el esmalte depende de la concentración, duración, pH y frecuencia del tratamiento (18).

Diversos estudios sugieren que la aplicación tópica de los fluoruros como en enjuagues y geles ayuda en la prevención de la caries dental. La presencia de flúor en agua, cremas dentales, enjuagues y geles, entre otros, disminuye la desmineralización (60).

Remineralización con fosfato de calcio amorfo (FCA)

Es un sistema ideal de suministro de iones de calcio y fosfato libremente disponibles, que interviene en el balance de desmineralización y remineralización dental; previniendo caries o remineralizando las lesiones iniciales (61). El FCA o ACP está compuesto principalmente por calcio y fosfato, que se encuentra principalmente en los dientes en hueso, cartílago y dentina (61).

Los fosfatos de calcio amorfos (FCA) forman un calcio y fosfato no estabilizado donde una sal de calcio (como el sulfato de calcio) y una sal de fosfato (como el fosfato de potasio) se liberan por separado y se mezclan con la saliva, liberando iones calcio y

fosfato, dando como resultado la precipitación de FCA, o si está presente el fluoruro da como resultado fosfato de fluoruros de cálcicos amorfos (ACFP) (18).

El fosfato de calcio amorfo (FCA), es normalmente insoluble, es decir, forma una estructura cristalina en el pH neutral. Cuando se añade a la cavidad oral el FCA se adhiere al esmalte, película, placa y tejido suave, suministrando el calcio y el fosfato exactamente donde es necesario y se complementa el efecto de la saliva, suministrando una concentración de calcio y fosfato sueltos en el medio oral, restaurando así el balance mineral (52). El FCA tiene un efecto remineralizador en una solución poco concentrada (0.5 - 1% de CPP-FCA) equivale a 500 ppm de fluoruro, reduce la actividad cariogénica en un 55% y además inhibe la adherencia de la placa al diente (62)(63).

El FCA puede ser agregado a los alimentos con azúcar. Por lo tanto el FCA puede ser una alternativa para la prevención y para una mínima intervención dental (61).

Además de remineralizador, el FCA añadido al peróxido de carbamida produce una reducción significativa en la hipersensibilidad dentinaria durante y después del tratamiento de aclaramiento dental. Ofrece un tratamiento adicional para casos de disfunción salival y erosión. Se utiliza como suplemento en chicles, enjuagues bucales, dentífricos, pastas profilácticas y últimamente en materiales de obturación y tiene por objeto reparar la pérdida de mineral en ambientes ácidos producida por bacterias (61).

Remineralización con fosfopéptidos de caseína-fosfatos de calcio amorfo (CPP-ACP)

Los fosfopéptidos de caseína-fosfatos de calcio amorfo (CPP-ACP) son nanocomplejos de caseína, calcio y fosfato. La caseína es la fosfoproteína predominante en la leche bovina y representa aproximadamente el 80% de su proteína total, principalmente en forma de complejos de fosfato de calcio (18).

Está constituida por una secuencia de dos serinas fosforiladas (pSer) y dos ácidos glutámicos (pSer-pSer-Glu-Glu) que es la responsable de asociarse con cristales de fosfato de calcio, estabilizándolos en una forma de cristal amorfo (ACP). Cuando se

mezclan los fosfopéptidos de caseína con una solución de sales de fosfato y de calcio, los péptidos ayudan a organizar un cristal amorfo de fosfato de calcio, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Este complejo péptidos-cristales crece lentamente sin que se induzca la precipitación de los iones, que los mantiene estabilizados pero solubles. Esa es la explicación de por qué tales nanocomplejos funcionan como donadores de Ca^{+2} y PO_4 en el medio oral (46).

Los CPP pueden estabilizar iones de calcio y fosfato libres, así mismo ayuda a mantener un estado de sobresaturación que inhibe la desmineralización y aumenta la remineralización. Adicionalmente, se ha encontrado que CPP-ACP interactúa con iones fluoruro para producir fosfatos de fluoruro de calcio amorfos (ACFP), que se estabiliza por CPP en la superficie del diente. Este complejo ACFP proporciona todos los elementos que son necesarios para promover la remineralización con fluorapatita, que es más resistente a los ataques ácidos (64).

Reynolds y col. Reportaron que CPP-ACP se une fácilmente a la superficie del diente, así como a las bacterias de la placa que rodea el diente, en condiciones ácidas, el complejo CPP-ACP amortigua los iones de calcio y fosfato libres, aumentando sustancialmente el nivel de fosfato de calcio en la placa y, por lo tanto, mantener un estado de sobresaturación que inhibe la desmineralización del esmalte y aumenta la remineralización (65).

Estos actúan gracias al tamaño y la electroneutralidad de los nanocomplejos, ingresando a las porosidades de la lesión subsuperficial del esmalte y difundiendo por gradiente de concentración dentro de la lesión (66)(67). Los CPP-ACP liberan iones calcio y fosfato que se depositan en los vacíos del cristal. Los CPPs tienen una alta afinidad por el apatito (68). El mineral que se forma se une con la hidroxiapatita y cuando el fluoruro está presente, el mineral se une con fluorhidroxiapatita (67).

Vidrio bioactivo

Es un material sintético, compuesto de calcio, sodio, fósforo y silicato que fue desarrollado inicialmente para la regeneración ósea y luego se evidenció su importancia

en la prevención de la desmineralización y la ayuda en la remineralización de la estructura dental (46).

Es un material altamente biocompatible que posee notable osteoconductividad, osteoinductividad y biodegradabilidad. Este material es capaz de formar apatito hidroxicarbonato que se asemeja al mineral biológico, y por lo tanto se utilizan ampliamente en la regeneración de huesos e ingeniería (46).

Diferentes estudios sugieren que el vidrio bioactivo puede ocluir los túbulos dentinales, inhiben la desmineralización y ayuda a la remineralización de la dentina precipitando apatita que se une herméticamente a los túbulos dentinales haciéndola más resistente a los ácidos. También se ha demostrado que el vidrio bioactivo es capaz de inhibir e invertir la progresión de las lesiones iniciales de caries (69).

Cuando este material entra en contacto con un medio acuoso, se libera sílice y también iones sodio, calcio y fósforo al medio oral. Su mecanismo de acción inicia con la liberación de sodio, aumento de pH y formación de complejos de calcio y fósforo, incluidos los iones presentes en la saliva, formando una capa de fosfato y calcio (Ca-P) sobre la superficie dental. Esta capa se organiza en forma de cristales de hidroxiapatita de calcio carbonatada, que se utilizan como aditivo en productos de cuidado oral (46).

Brushita

Se ha adicionado a productos como los dentífricos para aumentar la remineralización. Este material es una de las fases más solubles de los fosfatos de calcio cristalinos, sin embargo no se ha encontrado un efecto importante en la remineralización dental (18).

Fosfato tricálcico (TCP)

También se ha adicionado a diferentes productos dentales para remineralizar lesiones iniciales de caries, pero aún no se conoce su habilidad remineralizante (18).

Péptidos sintéticos aniónicos

Se han utilizado para tratar lesiones subsuperficiales de esmalte *in vitro* y los resultados han mostrado una reducción significativa en la desmineralización (5).

1.5. SUSTANCIA REMINERALIZANTE EXPERIMENTAL

La sustancia remineralizante es una sustancia biomimética, se compone de dos sustancias: un acondicionador modificado y una sustancia remineralizante. La sustancia remineralizante está formada por iones calcio, fosfato y otros iones que hacen parte de la composición del esmalte dental, con un tamaño de partícula aproximado de 5-15 μm determinado con imagen de microscopía electrónica de barrido a 500X (18).

En estudios previos realizados en la Universidad Nacional de Colombia entre el Departamento de Química y la Facultad de Odontología se observó que el acondicionador modificado y la sustancia remineralizante aplicados sobre defectos del esmalte producidos por la cementación y el retiro de brackets, son capaces de cubrir defectos del esmalte tipo grieta y afectar el color dental (18).

Con la aplicación de la sustancia remineralizante se depositaron minerales de apariencia clara y con patrón irregular, que disminuyeron el número y tamaño de los defectos existentes en el área de aplicación(18).

En otro estudio con la misma sustancia donde se recolectaron dientes un año atrás se obtuvieron resultados similares, pero con disminución en la cantidad de depósitos minerales. Se propuso como la causa de disminución en los depósitos minerales y el cambio en los resultados fue el tiempo transcurrido desde la extracción y la pérdida de humedad de las muestras dentales, dado que se almacenaron en seco (70).

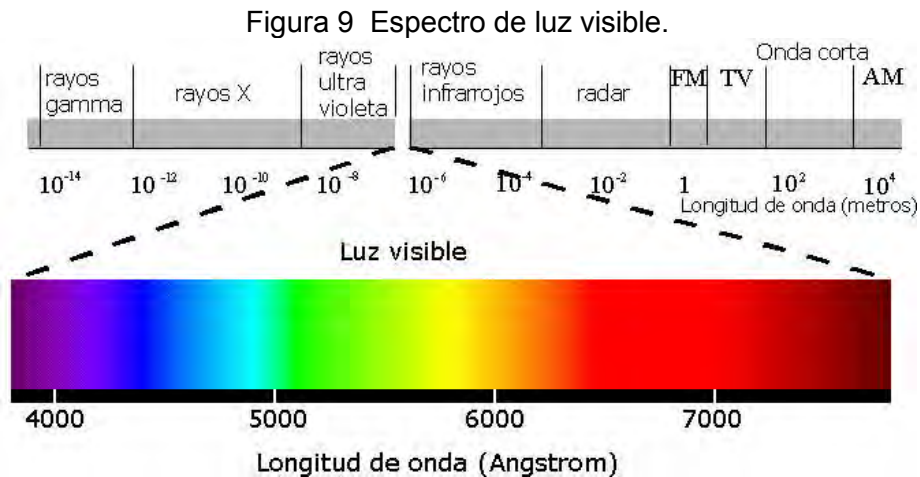
También se ha comprobado que la sustancia remineralizante experimental puede tener un efecto sobre el color dental, sobre todas las variables planteadas en la escala Cie Lab ΔA (verde-rojo), ΔB (amarillo-azul), ΔL (luminosidad), ΔE (interacción L^* , a^* , b^*), índice de blanqueamiento W e índice de blanqueamiento WIO) sin causar daños nivel de la estructura y la química del esmalte (6)

Las anteriores sustancias producidas y probadas en la Universidad Nacional de Colombia hacen parte de los antecedentes de esta investigación y hacen que se utilice las bondades de dichas sustancias para realizar una modificación que sea útil en esta investigación.

1.6. Técnicas de análisis microquímico

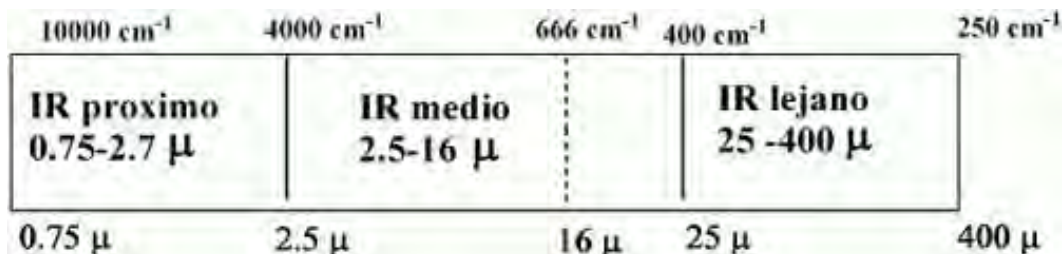
1.6.1. Espectroscopia Infrarroja (IR)

La espectroscopía infrarroja (IR) estudia la interacción entre la radiación infrarroja que corresponde a una zona del espectro electromagnético y la materia (3).



La región del espectro electromagnético corresponde a las longitudes de onda entre los 0,78 y 1.000 μm , este rango se encuentra entre la zona superior de la región visible y la de micro-ondas (3).

Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los aparatos se puede dividir en tres zonas: IR cercano (NIR): $12800\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$, IR medio: $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$; IR lejano: $400\text{-}10 \text{ cm}^{-1}$, siendo en el IR el medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales (71) (72) (figura 10)

Figura 10 Zonas IR. Imagen tomada de <http://www.urg.es> (72)

El IR permite identificar especies químicas con la frecuencia a los que diferentes grupos funcionales presentan bandas de absorción en el espectro IR. Es sensible a la presencia de grupos funcionales como por ejemplo: un metileno. - CH₂ -, un hidrocarburo, un carbonilo, C=O, una cetona, o un hidroxilo, - OH-, un alcohol (3).

Permite analizar todo tipo de muestras sólidas, líquidas o gaseosas, de una manera rápida donde se analiza la muestra y se registra el espectro en pocos minutos(71).

Un espectro IR se obtiene al pasar radiación a través de una muestra y determinar qué fracción de esta radiación incidente ha sido absorbida. La energía particular a la que aparece cada pico en un espectro guarda relación con la frecuencia de vibración de una parte de la molécula (72).

Hay diferentes modos de vibración en las moléculas, están asociadas un movimiento característico de los átomos, los principales son: las deformaciones de enlace, ángulos de valencia, ángulos diedros, etc. (3)

La transmitancia (T) es la relación entre intensidad de radiación que sale de las muestras y la que estas reciben (3).

$$T = I/I_0$$

$$\%T = 100T$$

El valor de I contiene información de la muestra, las contribuciones del espectrómetro y el ambiente se miden en I_0 , que es llamado espectro de fondo. La relación entre I y I_0 , es decir la transmitancia, contribuciones del equipo y del ambiente se eliminan.

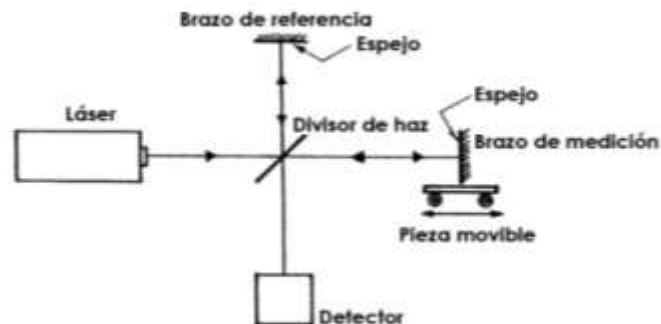
Para el análisis cuantitativo, el espectro se mide en unidades de absorbancia (A) que se calcula con el logaritmo decimal de la inversa de la transmitancia: (3)

$$A = \log (I_0/I) = \log (1/T)$$

El modo más común para medir un espectro de una muestra es por transmisión, sin embargo cuando la muestra dispersa la radiación o se encuentra sobre un soporte que absorbe la radiación esto no es posible. Para casos como estos se puede usar otras metodologías como la Reflectancia Total Atenuada (ATR), donde las muestras no necesitan ninguna preparación y pueden recuperarse. En el caso de usar transmisión las muestras sólidas deben mezclarse con KBr para formar una pastilla. (72)

1.6.1.1. Espectroscopia con Transformada de Fourier (FTIR)

Figura 11 Interferómetro de Michelson. Tomada de Tesis Doctora Carolina Torres (3).



El equipo divide un haz de radiación en dos, que después de recorrer diferentes longitudes son nuevamente re combinados, formando una interferencia del haz que emerge por la diferencia de los haces separados (3),

El interferómetro tiene dos espejos planos perpendiculares entre sí, uno de ellos puede moverse en dirección perpendicular a la superficie a una velocidad constante. Hay un separador entre los dos espejos, donde parte de la radiación que llega a la fuente se refleja hacia uno de los espejos y en parte se transmite hacia el otro espejo. Después de que los haces vuelven al separador, interfieren y nuevamente una parte se transmite y la otra se refleja (3).

Debido a la interferencia, la intensidad del haz que llega al detector varía por la diferencia que recorren los haces de radiación en las dos ramas del interferómetro. Esta interferencia se denomina interferograma y contiene la información espectral de un espectrómetro FT (3).

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier tienen ciertas ventajas con respecto a los espectrómetros dispersivos, una de ellas es que el interferómetro recibe simultáneamente todas las longitudes de onda del espectro, mientras que el de dispersión, registra cada punto del espectro sucesivamente (3). Otra ventaja que se reporta es que en los espectrómetros FTIR la intensidad del haz de luz es mayor que en los equipos dispersivos y mayor precisión de longitud de onda (73).

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

La intensidad de la absorbancia, varía linealmente dependiendo de la concentración de la muestra, esto permite realizar análisis cuantitativos por espectroscopia infrarroja (3).

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

Donde A es absorbancia, T (ν) y a (ν) son la transmitancia, a el coeficiente de absorción que se trata de un valor de frecuencia dado, b es la longitud de paso óptico, y c es la concentración de la muestra. Este coeficiente de absorción se da por cada modo vibracional y depende de la variación de la molécula durante la vibración.

En el esmalte dental sin tratamiento se observan tres regiones correspondientes a las bandas de los grupos funcionales amidas, fosfatos y carbonatos (figura 4 y 5) (71)(72). La región A900- 1200 corresponde el grupo de los fosfatos (parte mineral), y la región A 1200-1700 a los grupos amidas (parte orgánica). La región de los carbonatos se encuentra entre las bandas 850-890 (Figura 12).

Figura 12 Espectro IR de esmalte dental humano sin tratamiento. Se observan diferentes bandas características de los grupos funcionales correspondientes a los grupos Amidas, Fosfatos y Carbonatos. Tomada de Tesis Carolina Torres (3).

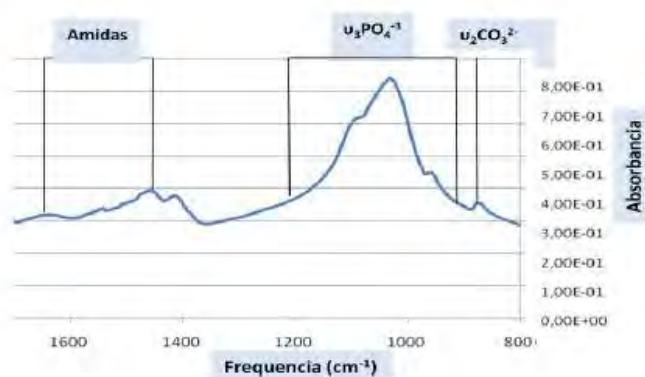


Tabla 4 Asignación de de bandas de FTIR del esmalte. (74)(3).

No	Frecuencia del Esmalte (cm ⁻¹)	Asignación de las bandas espectrales
1	3570-3450	N(OH)
2	3500-3300	v(N-H) Amida A
3	1637	v(C=O) Amida I
4	1544	δ(N-H) + vC-N (Amida), v ₃ CO ₃ ²⁻ (mineral)
5 a 7	1200-900	v ₁ , v ₃ (PO ₄) (mineral)
8	890-850	v ₂ (CO ₃ ²⁻) (mineral)
9 a 10	700-450	v ₄ (PO ₄) (mineral)

Dependiendo del tipo de IR (FTIR transmitancia o reflectancia) las bandas de menor frecuencia no son detectadas por el interferómetro (3), por lo que se le realiza un análisis de deconvolución (Tabla 5).

Tabla 5 Asignación de regiones y grupos moleculares en espectroscopia infrarroja.(7)(3).

Región cm^{-1}	Grupos moleculares
A500-650	$\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$
a527	HPO_4^{2-}
a540	HPO_4^{2-}
a560	PO_4^{3-}
a603	PO_4^{3-}
A850-890	$\nu_2 \text{CO}_3^{2-}$
a865	Carbonato inestable
a872	CO_3^{2-} tipo B (sustitución PO_4^{3-})
a880	CO_3^{2-} tipo A (sustitución OH)
A900-1200	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$
a956	HPO_4^{2-}
a1000	Apatito poco cristalino
a1010	Apatito poco cristalino
a1027	Apatito altamente cristalino
a1054	Apatito altamente cristalino
a1078	Apatito cristalino
a1124	Apatito poco cristalino
A1350-1950	Grupos amidas y carbonatos
a1413	CO_3^{2-} tipo B (sustitución PO_4^{3-})
a1460	Amida III
a1540	Amida II
a1645	Amida I
A2800-3800	OH "tensión-deformación"

Otro estudio, mostró que después de la aplicación de peróxido de hidrógeno al 30%, sobre polvos de esmalte bovino y al hacer análisis a través de los espectros IR, determinaron que el grado de mineralización (gradmin) medido como la relación entre el fosfato y la amida total no cambia significativamente con el tiempo de exposición, lo que indica que la parte mineral como la parte orgánica se pierden simultáneamente. Hay pérdida de la parte mineral rica en carbonatos (minCO_3), que puede ocurrir debido a que se encuentra en la parte más superficial de los cristales y está íntimamente asociada a la parte orgánica que es oxidada por el peróxido y no hay pérdida estadísticamente significativa de los fosfatos y de la parte orgánica amida III (a1460), amida II (a1550), amida I (a1660) en función del tiempo (3) (Tabla 6).

Tabla 6 Análisis de correlación de la composición del esmalte a partir de FTIR y el tiempo de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30%. (R) representa los coeficientes de correlación de Pearson. Los valores de $P < 0,05$ se encuentran con *, (N) es el número de especímenes estudiados. Los valores en rojo representan los componentes minerales y en azul los componentes orgánicos. Tomada de Tesis Doctoral Dra. Carolina Torres (3)

	Log Tiempo		
	R	P	N
gradmin	0,715	0,110	6
min CO ₃ ²⁻	-0,813	0,049*	6
a1405	-0,133	0,802	6
a1460	0,388	0,447	6
a1550	0,292	0,574	6
a1660	-0,663	0,177	6
a956	0,720	0,107	6
a985	-0,426	0,399	6
a1005	0,282	0,589	6
a1030	-0,619	0,191	6
a1058	-0,583	0,224	6
a1095	-0,681	0,137	6
a1138	0,720	0,107	6
Cl	-0,306	0,555	6

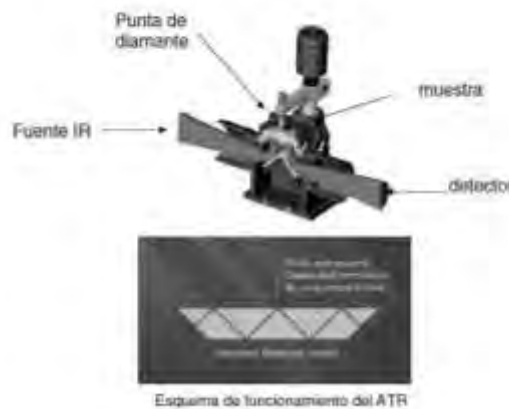
1.6.1.2. Reflectancia Total Atenuada (ATR)

La presencia de moléculas en la superficie de la muestra absorbe radiación y produce una atenuación de la radiación reflejada. Esto se realiza porque el medio absorbente cambia el índice de refracción local, por lo que parte de la radiación penetra en el medio menos denso y por lo tanto sea atenuada, de ahí el término de reflectancia total atenuada (73).

Con la técnica de ATR las muestras no necesitan preparación previa y pueden recuperarse, y en algunos casos es necesario que las muestras sólidas se mezclen con KBr para formar pastillas. La técnica sirve para analizar cualquier tipo de muestra no gaseosa (73).

Con el ATR se utiliza un accesorio transparente sobre el que se deposita la muestra a analizar, el haz incide en la muestra, y al tratarse de una interfaz donde el medio externo tiene una densidad óptica menor que donde incide, la radiación sufre reflexión total. La distancia de penetración de la radiación puede variar según el ángulo de incidencia, lo que permite analizar el cambio de composición de la muestra (75)(76).

Figura 13 Esquema de funcionamiento del ATR.
Tomada de Tesis Doctora Carmen Lucía Soares
(73).



Sun L. y Col (2011) (77), analizaron por medio de espectro ATR-FTIR el esmalte dental humano después de ser tratado con peróxido de hidrógeno ácido (pH 3,6), peróxido de hidrógeno neutro (pH 7) y con agua destilada (pH 6,8). Se encontraron grandes alteraciones en el grupo de peróxido de hidrógeno ácido después de realizar el tratamiento, mientras que se detectaron pequeños cambios en los otros dos grupos. El carbonato y la relación mineral (C: M) se calculó y analizó (Figura 14), encontrando disminución significativa de C: M en el grupo tratado con peróxido de hidrógeno ácido.

Figura 14 Variación de carbono en los tres grupos antes y después del tratamiento. (78)

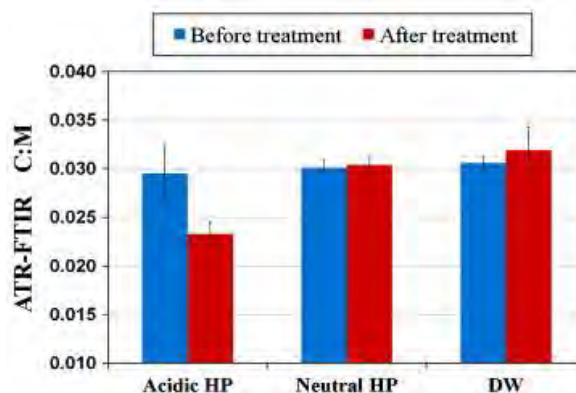


Fig. 2.

1.6.2. Difracción de Rayos X

La difracción de rayos X es un fenómeno que se produce al interactuar un haz monocromático de rayos X de una determinada longitud de onda, con una sustancia cristalina. La dispersión de rayos X mantiene la misma longitud de onda que el haz incidente, esto se conoce como dispersión de rayos X coherente que no se encuentra distribuida uniformemente en el espacio, sino que es una función de la distribución electrónica de la muestra (73).

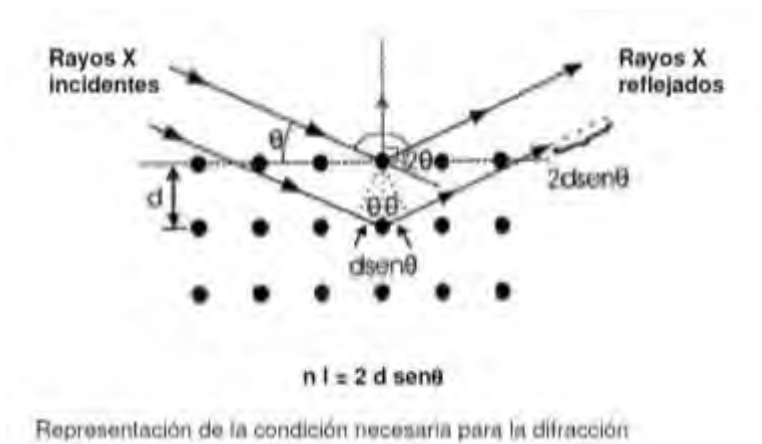
Esta técnica es utilizada para el estudio de materiales cristalinos orgánicos e inorgánicos para determinar su estructura atómica molecular. Cuando la muestra tiene sus átomos ordenados periódicamente, la intensidad y distribución de los rayos X dispersados forman un patrón de difracción que está relacionado con la estructura de interna de la muestra (73).

La ley de Bragg describe la difracción, esta ley predice la dirección en la que se da interferencia constructiva entre haces de rayos X dispersados coherentemente por un cristal (73):

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

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

Figura 15 Representación de la condición necesaria para la difracción de rayos X.
Tomada de la tesis de la Doctora Carmen Soares (73).



Materiales y Métodos

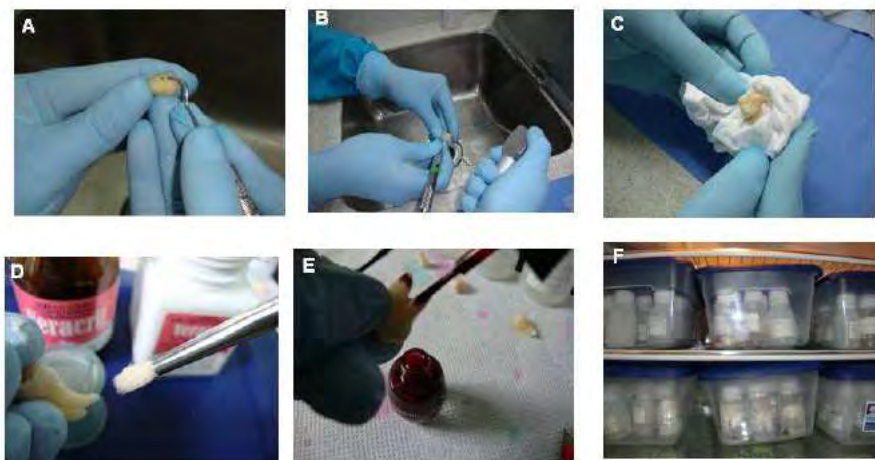
1.7. Selección de la muestra

Previa cartilla informativa y firma del consentimiento informado por parte de los donantes y con el aval del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia CIE-028-15, se seleccionaron 40 terceros molares humanos sanos entre las edades de 18 y 28 años, con extracción indicada. Posteriormente se realizó una inspección visual cuidadosa donde no se evidencian signos de grietas o anomalías estructurales, historia de fractura, pérdida de vitalidad y/o tratamientos con sistemas adhesivos, de rehabilitación o blanqueamientos.

1.8. Tratamiento de la muestra

Los dientes se sometieron a procesos de limpieza, desinfección y conservación de acuerdo al protocolo establecido en el Banco de Dientes de la Universidad Nacional de Colombia (79) (Figura 15). Posteriormente, se almacenaron los dientes en cloramina T 0.5% a 4°C y en recipientes de polietileno de alta densidad con selle hermético.

Figura 16 15 Limpieza, desinfección y conservación de los dientes. A). Retiro de tejido blando remanente. B). Lavado de espécimen con agua corriente. C). Secado del diente con papel absorbente. D). Posicionamiento del tapón de acrílico. F). Almacenamiento.



Luego se secó la superficie del esmalte con papel de cocina y se tomó el color inicial de cada espécimen con el espectrofotómetro Vita Easy Shade advance 4,0 serial B80774, del Laboratorio CEREC de la Universidad CIEO previamente calibrado el equipo y el examinador, Se registró el color según guía Vita Master D y el valor de L, a, b, c, y h.

Figura 17 Espectrofotómetro Vita Easy Shade Advance. Imagen tomada de www.vita-zahnfabrik.com



Posteriormente se demarcó la zona a tratar a través de 4 puntos equidistantes realizados en la cara vestibular, estableciendo un área de 5 x 5 mm.

Figura 18 Marcación de puntos equidistantes en cara vestibular



Los dientes se dividieron en cuatro grupos al azar, cada uno con 10 especímenes

G1: Especímenes sin tratar

G2: Especímenes tratados con peróxido de hidrógeno al 35% Pola Oficce ® Bulk Kit Lote 64/452453, se realizaron 4 aplicaciones de 8 minutos cada una, y se lavaron con agua

desionizada entre cada aplicación, para un total de 32 minutos. En cada sesión se colocó papel de cocina humedecido con peróxido de hidrógeno para conservar la humedad. Posteriormente fueron lavados con agua desionizada.

Figura 19 Peróxido de hidrógeno Pola oficce® 35%. Imagen tomada de www.ideiasweb.com.br



Figura 20 Grupo2, especímenes tratados con peróxido de hidrógeno al 35%.



G3: Especímenes tratados con sustancia remineralizante experimental por un tiempo de 6 horas, se colocó papel de cocina humedecido con la sustancia remineralizante para conservar la humedad, luego fueron lavados con agua desionizada. Posteriormente se

aplicó una sustancia estabilizadora por 12 horas, se colocó papel de cocina humedecido con la sustancia estabilizadora para conservar la humedad. Finalmente fueron lavados con agua desionizada.

Figura 21 Imagen de la sustancia remineralizante experimental.



Figura 22 Tratado con la sustancia remineralizante experimental.



Figura 23 Espécimen 434 del grupo 3, después de aplicar la sustancia remineralizante, se aplicó la sustancia maduradora por 12 horas y se cubrió con papel de cocina humedecido y cristaflex, para conservar humedad.



G4: Especímenes tratados con peróxido de hidrógeno al 35% Pola Oficce ® Bulk Kit Lote 64/452453, se realizaron 4 aplicaciones de 8 minutos cada una, y se lavaron con agua desionizada entre cada aplicación, para un total de 32 minutos. En cada sesión se colocó papel de cocina humedecido con peróxido de hidrógeno para conservar la humedad. Posteriormente fueron lavados con agua desionizada y secados en horno ESCO Isotherm® por 15 minutos a 37°C. Después se realizó aplicación de sustancia remineralizante experimental por un tiempo de 6 horas, se colocó papel de cocina humedecido con la sustancia remineralizante para conservar la humedad, luego fueron lavados con agua desioizada. Posteriormente se aplicó una sustancia maduradora por 12 horas, se colocó papel de cocina humedecido con la sustancia maduradora para conservar la humedad. Finalmente fueron lavados con agua desionizada.

Figura 24 Grupo 4. Tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante experimental.



Después de la aplicación de los diferentes tratamientos, se procedió a tomar la toma final del color con el espectrofotómetro Vita Easy Shade advance® 4,0 serial B80774, del Laboratorio CEREC de la Universidad CIEO previamente calibrado el equipo y el examinador, Se registró el color según guía Vita Master D y el valor de L, a, b, c, y h.

Posteriormente se realizó la obtención de polvo del esmalte de la superficie externa vestibular que fue previamente tratada, con lijas de óxido de aluminio de grano medio, color azul de la casa Microdont® Lote TDN 0020/13. El polvo de esmalte se pesó y se almacenaron en recipientes de alta densidad con tapa roscable, previamente rotulados.

Figura 25 Lijas de óxido de aluminio de grano medio Microdont®. Imagen tomada de <http://www.microdont.com.br/produtos/tiras-diamantadas-de-aco-inoxidavel-com-centro-neutro/>



Figura 26 . Polvo de esmalte y frascos roscables rotulados.



1.9. Análisis de la muestra

1.9.1. Análisis de color por espectrofotometría

Los datos recolectados de la toma de color las muestras del antes del después del tratamiento, fueron agrupados en una tabla Excel registrando los siguientes datos de cada espécimen: Edad del diente, color de la guía vita 3D master antes y después de cada tratamiento, L, a, B antes y después de cada tratamiento, promedio de L, a, B antes y después de cada tratamiento, se calculó el delta L, delta a y delta B y delta E, para cada grupo (6)(80).

Se calculó Delta E utilizando la siguiente formula:

Figura 27 Formula Delta E. Imagen tomada del artículo de alghazali, N. (81)

$$\Delta E_{1,2}^* = \sqrt{(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2}$$

1.9.2. Espectrometría infrarroja transformada de Fourier

Para el análisis de espectrometría de FTIR, se analizó 1 mg de polvo de esmalte que se obtuvo después de realizar los diferentes tratamientos, mezclado y homogenizado con 9 mg de KBr utilizado como dispersante, en mortero de ágata, compuesto que no absorbe en la región de 4000-600 cm^{-1} , y prensado al vacío con una prensa de 8 toneladas/cm² métricas por 30 segundos. (6)(72)

Figura 28 Manejo de la muestra para la toma de FTIR del esmalte. Fotografías tomadas en el laboratorio de espectrometría de infrarrojos en la Facultad de Química de la Universidad Nacional.



Los datos espectrales de infrarrojos se tomaron en un espectrómetro de infrarrojo transformado de Fourier (Nicolet iS10 de la casa ThermoScientific®, ubicado en el Laboratorio 232 del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia) a 4 cm^{-1} de resolución. Una función de Gauss-Lorentz mixta fue utilizada para adaptarse a los contornos de las bandas de IR a partir de los espectros adquiridos en el modo de absorbancia. Las cantidades de fosfato, carbonato, y matriz orgánica en el esmalte se

determinaron desde el área del pico de bandas de absorción asociadas con los grupos fosfato, carbonato y amida en el espectro infrarrojo (72)

Figura 29 Espectrómetro de infrarrojo Nicolet iS10, ThermoScientific ®. Ubicado en el laboratorio 322 del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.



Se realizó un análisis descriptivo de la composición química a partir de las gráficas obtenidas del polvo de esmalte dental sin tratamiento, tratado con peróxido de hidrógeno, tratado con la sustancia remineralizante experimental, y con tratado con las dos sustancias. Se midieron los picos que corresponden a las bandas que representan la matriz orgánica y los componentes inorgánicos en el esmalte: banda amida I de 1637 cm^{-1} , componente relacionado con la matriz orgánica (A1637), $\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$ (A900-1200), $\nu_4\text{ PO}_4^{3-}$ (A500-650), carbonato ión $\nu_2\text{ CO}_3^{2-}$ (A850-890) y $\text{CO}_3\ \nu_3^{2-}$ (A1405) (72).

1.9.3. Difracción de Rayos X

Se empleó un Difractómetro Panalytical X'Pert PRO MPD ® con tubo de Cu a 40 mA y 45 kV. del Laboratorio de Difracción de RX del Departamento de Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, con un rango de 4 a 60 grados. Todas

las exploraciones se midieron en modo de reflexión. Todas las muestras de los grupos G1, G2, G3 y G4 fueron analizadas en polvo.

Figura 30 Difractómetro Panalytical X'Pert PRO MPD® del Laboratorio de Difracción de RX del Departamento de Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.



1.10. Análisis Descriptivo

Se realizó un análisis descriptivo con el fin de cada uno de los métodos de análisis.

Las hipótesis a comprobar son las siguientes:

Ho: La sustancia remineralizante no afecta el color dental

Ha: La sustancia remineralizante afecta el color dental

Ho: La sustancia remineralizante no afecta la composición química del esmalte dental

Ha: La sustancia remineralizante sí afecta la composición química del esmalte dental

Ho: La sustancia remineralizante no afecta la composición mineral del esmalte dental

Ha: La sustancia remineralizantes afecta la composición mineral del esmalte dental

Resultados y Discusión

1.1. Análisis de color por espectrofotometría

Los datos recolectados de la toma de color de las muestras antes y después del tratamiento, fueron agrupados en una tabla Excel registrando los siguientes datos de cada espécimen: Edad del diente, color del diente, L, a, B antes y después de cada tratamiento, Se calculó el promedio de L, a, B antes y después de cada tratamiento, t también se calculó el delta L, delta a y delta B y delta E, para cada grupo (6)(80).

Delta E se calculó utilizando la siguiente formula:

Figura 31 Formula Delta E. Imagen tomada del artículo de alghazali, N. (81)

$$\Delta E_{1,2}^* = \sqrt{(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2}$$

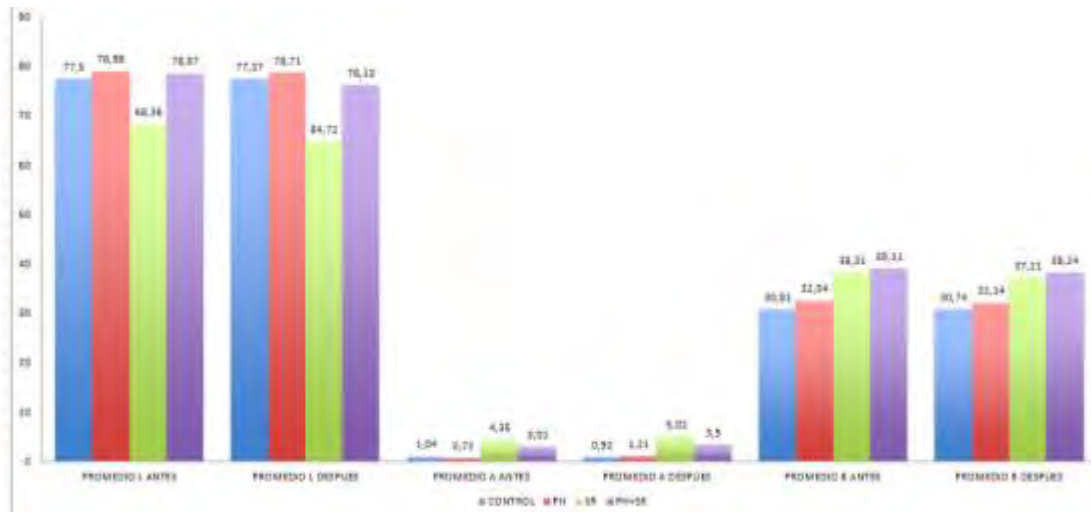
Las variables analizadas en este estudio fueron ΔA, ΔL, ΔB, ΔE,

Tabla 7 Tabla de clasificación de los resultados de color.

The image shows a highly detailed and complex table with many columns and rows. The table is color-coded into horizontal bands: blue, yellow, and green. Each band contains multiple columns of data, including numerical values and text labels. The table appears to be a classification or summary table for color measurement results, as indicated by the caption. The text is small and difficult to read, but the structure suggests a multi-factorial analysis of color data.

A todos los datos obtenidos se les realizó un análisis descriptivo.

Tabla 8 Gráfica de barras de variables L, A y B, antes y después de cada tratamiento.



Se realizó una comparación de las variables L, A, B, tomadas antes y después de cada tratamiento, donde se encontró que el valor de L disminuyó en todos los grupos, pero bajo en mayor cantidad en el grupo 3 correspondiente al grupo tratado con la sustancia remineralizante experimental. En la variable A se encontró un aumento no muy significativo en todos los grupos después de realizar los diferentes tratamientos, llevándolos a una tendencia hacia el rojo. En la variable B todos los grupos presentaron una disminución no muy significativa después de realizar los diferentes tratamientos, llevándolos a ser menos amarillos.

1.1.2.Delta L

En esta variable se observó que el grupo 3 correspondiente al grupo tratado con sustancia remineralizante experimental, fue el grupo donde se presentó un cambio mayor en la

luminosidad, disminuyendo los valores de L de la primera a la segunda toma de color, por eso el valor de Delta L es mayor en este grupo, seguido por el grupo 4 correspondiente al grupo tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y con la sustancia remineralizante experimenta. El grupo que menos valor de delta L obtuvo fue el grupo 2 correspondiente al grupo tratado con peróxido de hidrógeno al 35%, donde sólo se disminuyó delta L en 0.14 con respecto al grupo 1 o grupo control.

1.1.3. Delta A

En esta variable se observó que el grupo control disminuyó el valor de A de la primera a la segunda toma de color, para los otros grupos aumentó el valor de A de la primera a la segunda toma de color de los especímenes. El delta A que más varió fue el del grupo 3 correspondiente a la sustancia remineralizante, seguido por el grupo 2 de peróxido y grupo 4 que tienen el mismo valor. Esto quiere decir que los grupos 2, 3 y 4 tendieron más al rojo.

1.1.4. Delta B

En esta variable se observó que el grupo 3 correspondiente al grupo tratado con sustancia remineralizante experimental, fue el grupo que disminuyó más el valor B de la primera a la segunda toma de color, por eso en la gráfica se evidencia una variación mayor en delta B es decir, fue el que tuvo más efecto sobre el balance azul-amarillo, lo que se traduce en la reducción del amarillo, seguido por el grupo 4 correspondiente al grupo tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y con la sustancia remineralizante experimental. El grupo que menos valor de delta B obtuvo fue el grupo 2 correspondiente al grupo tratado con peróxido de hidrógeno al 35% con un valor de 0,4 con respecto al grupo 1 o grupo control.

1.1.4.Delta E

En esta variable se observó que el grupo 3 correspondiente al grupo tratado con la sustancia remineralizante experimental fue el que más variación tuvo, por lo tanto fue el que más efecto tuvo sobre la interacción de L^* , a^* , b^* .

Los resultados nos indicaron que para las variables Delta L, Delta a, Delta B, Delta E, el tipo de sustancia utilizada afecta el color. Para la variable Delta L la sustancia remineralizante experimental es la que generan más cambio en la luminosidad. Para la variable Delta a la sustancia remineralizante experimental afectó el balance verde rojo, tendiendo más hacia el rojo. Para la variable Delta B también la sustancia remineralizante experimental (SR) generó más cambio en el balance azul amarillo, tendiendo más hacia el amarillo. El Delta E, que representa la distancia euclidiana entre las variables L^* , a^* y b^* inicial y final, nos mostró que la sustancia remineralizante experimental es la que tiene más efecto sobre el color.

A través de este estudio se rechaza la hipótesis nula (H_0) en la que la sustancia remineralizante experimental no afecta el color dental y se comprueba hipótesis alterna (H_a), la sustancia remineralizante experimental si afecta el color del esmalte dental.

Los resultados de este estudio indican cambios en la luminosidad, balance azul-amarillo y balance verde-rojo con la sustancia remineralizante experimental, resultados que coinciden con el estudio realizado por Vargas y colaboradores (6).

El estudio de Eimar y colaboradores (82) reportan que los dientes que fueron tratados con peróxido de hidrógeno al 30% aumentan la luminosidad o el valor de delta L con respecto a dientes del grupo control que no fueron sometidos a ningún tratamiento. Sampaio y colaboradores (83) reportaron que el peróxido de carbamida al 37% o la combinación de perborato de sodio + peróxido de hidrógeno al 35% aumentó el valor de L^* (luminosidad) donde también se empleó el espectrofotómetro vita Easy Shade. Ma X y col determinaron que agentes blanqueadores como el peróxido de carbamida al 10% generaron cambios significativos en L^* y en b^* , el primero de estos aumenta dándole una mayor luminosidad, y el segundo disminuye reduciendo el amarillo (84).

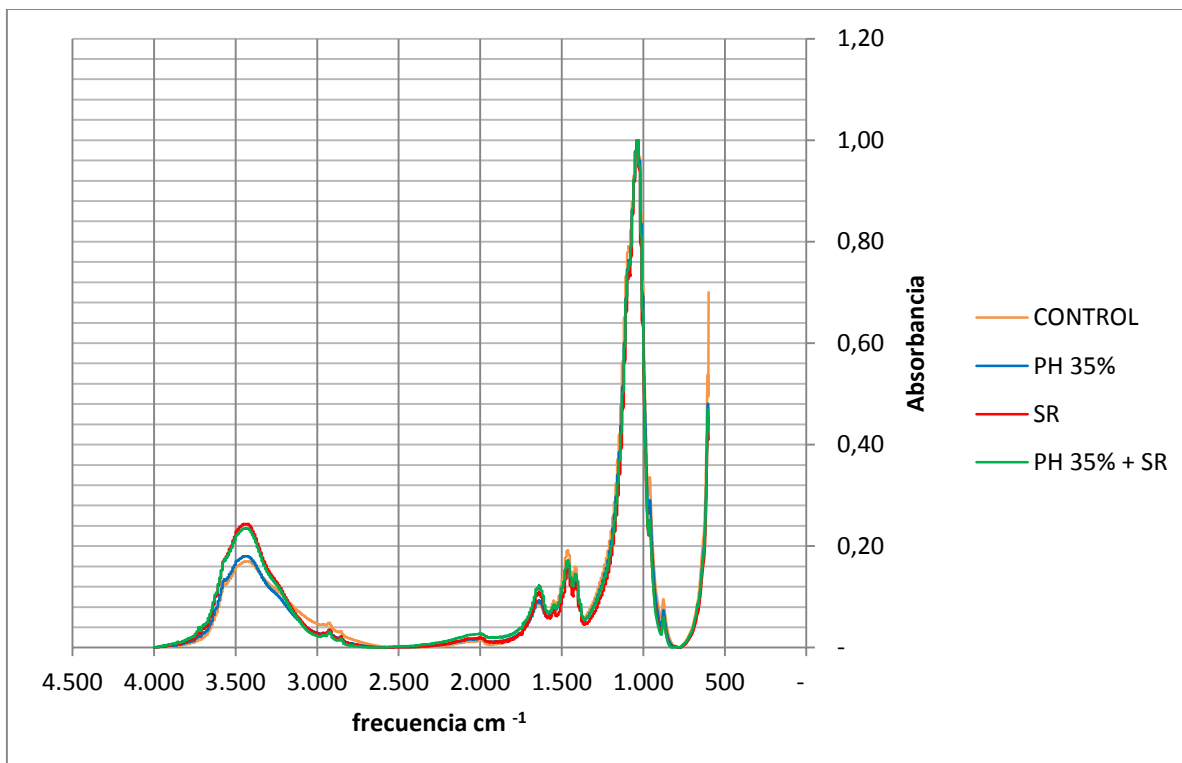
Al contrario de todos estos estudios, en el nuestro se encontró que el peróxido de hidrógeno, la mezcla de peróxido más sustancia remineralizante y la sustancia remineralizante disminuyó el valor de L . Esto puede atribuirse a la pérdida de sustancia orgánica e inorgánica en el peróxido y al aumento de la rugosidad del esmalte que cambian los fenómenos de reflexión y refracción. Para la sustancia remineralizante también se encontró un aumento en el delta A (aumento del rojo) y una disminución del amarillo en todos los grupos. La sustancia remineralizante fue la que produjo mayores cambios en delta L, delta a y delta b, lo que se representa por el valor del delta E.

A través de los resultados de este estudio comprobamos como una sustancia remineralizante biomimética puede tener un efecto sobre el color dental, sobre todas las variables planteadas en la escala Cie Lab ΔA (verde-rojo), ΔB (amarillo-azul), ΔL (luminosidad), ΔE (interacción L^* , a^* , b^*).

1.2. Espectrometría infrarroja transformada de Fourier

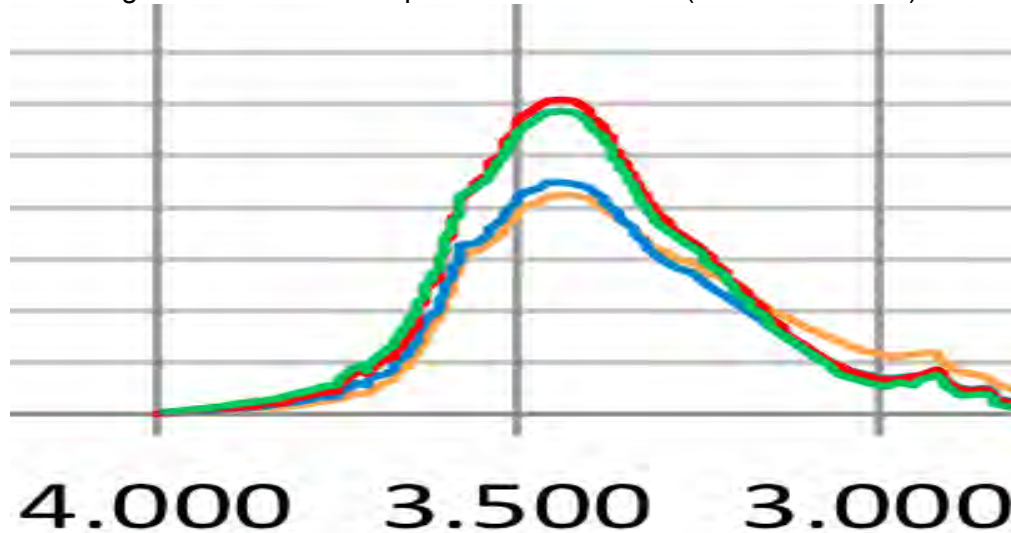
Para este método se hicieron 40 espectros uno por cada una muestra. Se tomó un espectro por muestra y se determinaron los picos de las bandas de absorción de amidas, fosfatos y carbonatos del esmalte dental humano, la cuales concuerdan con las asignaciones reportadas en la literatura (3)(74). En la figura 35 se observan la superposición de los espectros de los cuatro grupos.

Figura 32 Superposición de bandas de los 4 grupos. Grupo 1 control, Grupo 2 tratado con peróxido de hidrógeno al 35% (PH35%), Grupo 3 tratado con sustancia remineralizante experimental (SR), Grupo 4 tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante



Banda Amida A (3500-3300 cm^{-1})

Figura 33 Banda correspondiente a Amida A (3500-3300 cm^{-1}).

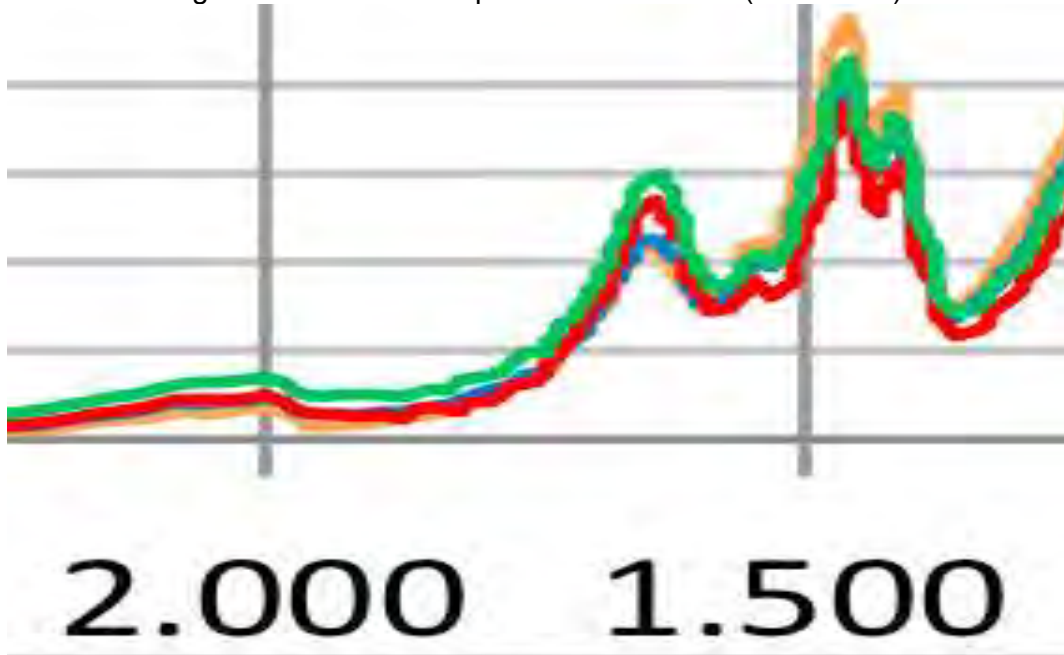


Grupo 1 o control color naranja, Grupo 2 o tratado con peróxido de hidrógeno al 35% (PH35%) color azul, Grupo 3 o tratado con sustancia remineralizante experimental (SR) color rojo y Grupo 4 tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante experimental (PH 35%+SR) color verde.

Se observa en la banda correspondiente a Amida A, que la sustancia remineralizante experimental, es la banda con mayor proyección, seguida por la banda del grupo 4 correspondiente al grupo tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante experimental, lo que indica que la sustancia remineralizante experimental protege las proteínas del esmalte ante los efectos deletereos del peróxido de hidrógeno. En la banda correspondiente al grupo tratado con peróxido de hidrógeno, no se observa una disminución aparente con respecto al grupo control.

Banda Amida I (1660 cm^{-1})

Figura 34 Banda correspondiente a Amida I (1660 cm^{-1}).

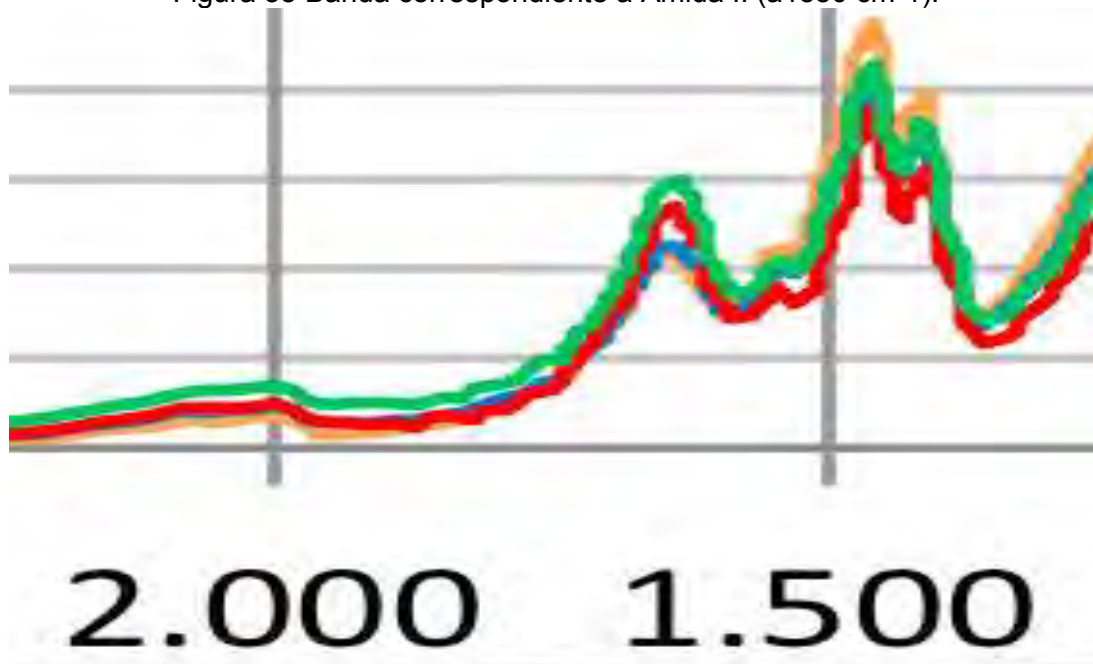


Grupo 1 o control color naranja, Grupo 2 o tratado con peróxido de hidrógeno al 35% (PH35%) color azul, Grupo 3 o tratado con sustancia remineralizante experimental (SR) color rojo y Grupo 4 tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante experimental (PH 35%+SR) color verde.

Se observa en la banda correspondiente a Amida I, que la banda del grupo 4 correspondiente al grupo tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante experimental y la banda del grupo 3 correspondiente sustancia remineralizante experimental, son las bandas con mayor proyección, esto indica y confirma que la sustancia remineralizante experimental (SR) protege las proteínas del esmalte ante los efectos deletereos del peróxido de hidrógeno. En el grupo tratado con peróxido de hidrógeno y el control se observó un solapamiento de la banda lo que no permite determinar si el peróxido afecta la amida I

Banda amida II a 1550

Figura 35 Banda correspondiente a Amida II (1550 cm^{-1}).

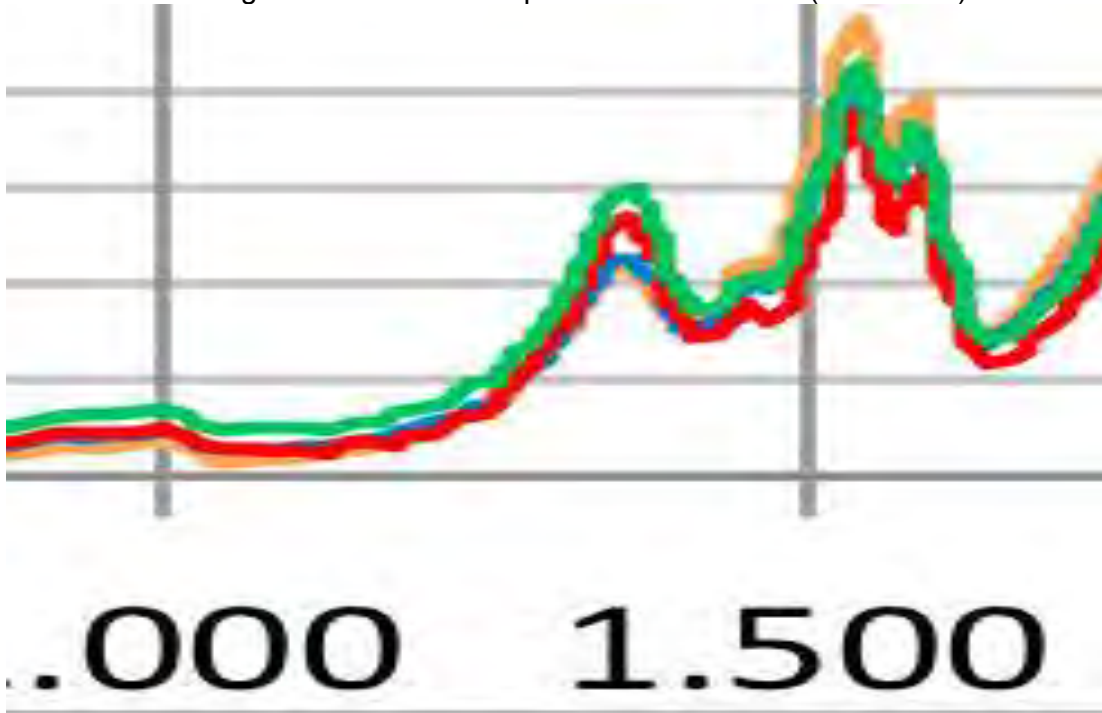


Grupo 1 o control color naranja, Grupo 2 o tratado con peróxido de hidrógeno al 35% (PH35%) color azul, Grupo 3 o tratado con sustancia remineralizante experimental color rojo y Grupo 4 tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante experimental color verde.

Para la banda amida II se observa una disminución con respecto al grupo control, primero del grupo 4, seguido por el grupo 2 y finalmente el grupo 3. Al parecer el grupo 3 tratado con la sustancia remineralizante es el que más disminuye la banda amida II.

Banda amida III 1460

Figura 36 Banda correspondiente a Amida III (1637 cm⁻¹).

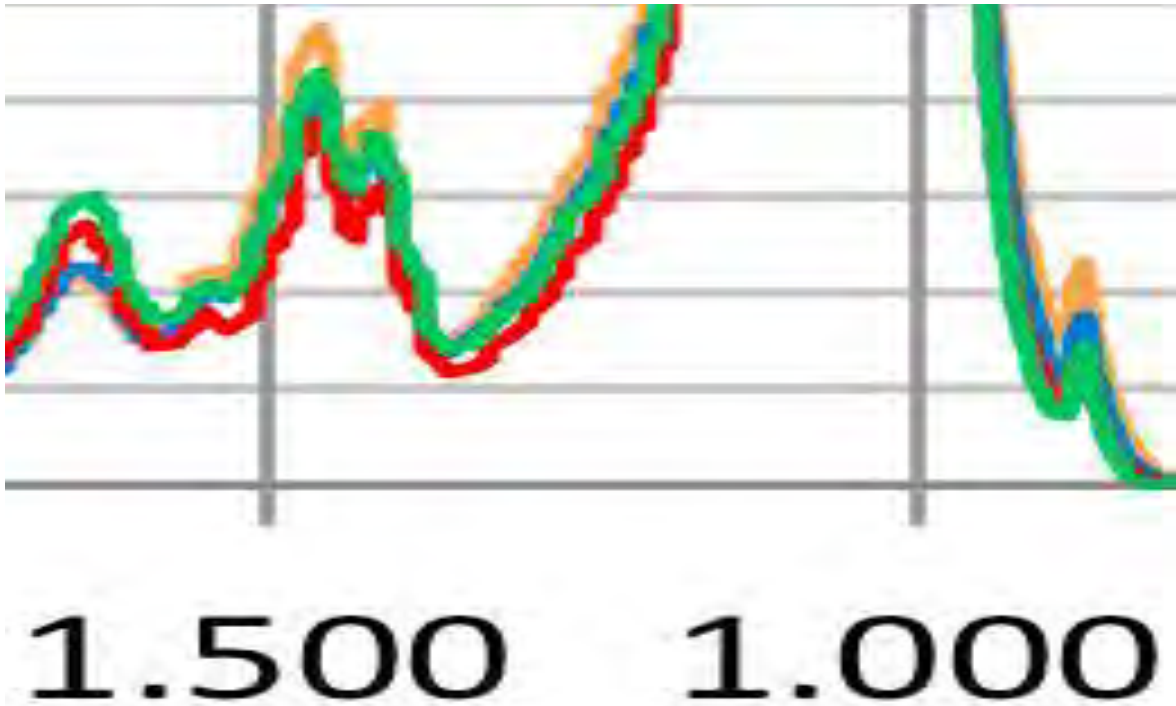


Grupo 1 o control color naranja, Grupo 2 o tratado con peróxido de hidrógeno al 35% (PH35%) color azul, Grupo 3 o tratado con sustancia remineralizante experimental (SR) color rojo y Grupo 4 tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante experimental color verde.

Para la banda amida III Se observa una disminución con respecto al grupo control primero del grupo 4, seguido por el grupo 2 y finalmente por el grupo 3.

Banda a 1405 CO_3^{2-} Carbonatos

Figura 37 Banda correspondiente a Carbonatos (a 1405 cm^{-1}).

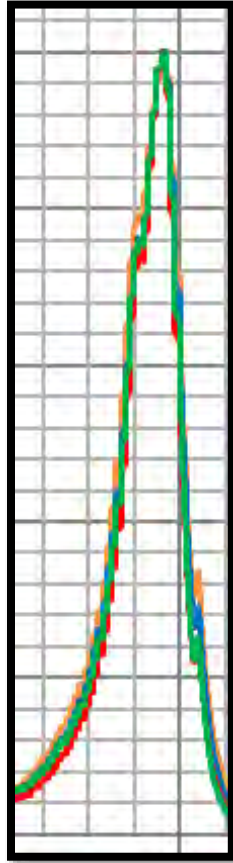


Grupo 1 o control color naranja, Grupo 2 o tratado con peróxido de hidrógeno al 35% (PH35%) color azul, Grupo 3 o tratado con sustancia remineralizante experimental color rojo y Grupo 4 tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante experimental color verde.

Para la banda de los carbonatos a 1405 se observa una disminución de la banda con respecto del grupo control primero del grupo 4, seguido por el grupo 2 y finalmente grupo 3.

Banda a ν_1 , ν_3 (PO_4) Fosfatos

Figura 38 Banda correspondiente a ν_1 , ν_3 (PO_4) (1200-900 cm^{-1}).

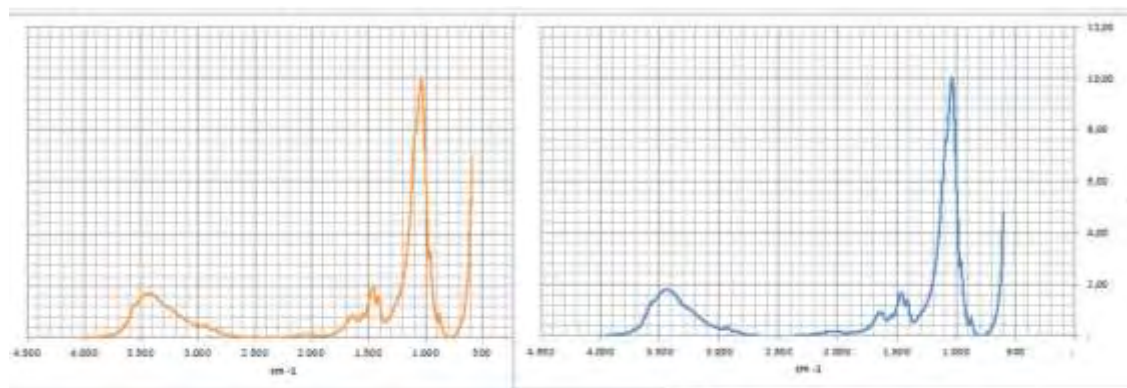


Grupo 1 o control color naranja, Grupo 2 o tratado con peróxido de hidrógeno al 35% (PH35%) color azul, Grupo 3 o tratado con sustancia remineralizante experimental (SR) color rojo y Grupo 4 tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante experimental (PH 35%+SR) color verde.

Se observa que la banda correspondiente a ν_1 , ν_3 (PO_4) (fosfatos) que hay una variación mínima en todos los grupos, No se observa una disminución en los picos de las bandas correspondientes a los grupos 3 y 4 tratados con la sustancia remineralizante experimental y peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante experimental.

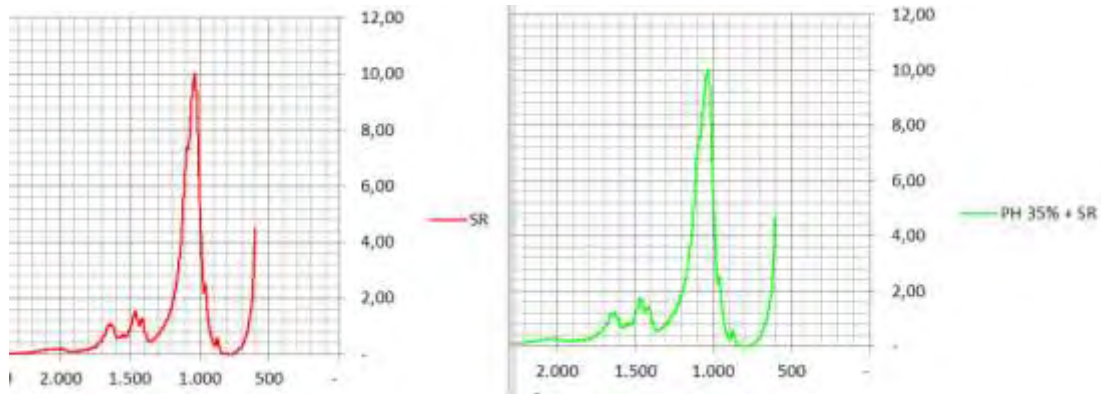
respectivamente, lo que sugiere que los fosfatos conservan su identidad y no se ven afectados

Figura 39 Comparación banda de fosfatos de grupo control color naranja y grupo 2 correspondiente al grupo tratado con peróxido de hidrógeno 35% color azul.



Se observa una disminución en la amplitud del pico del grupo 2 correspondiente al grupo tratado con peróxido de hidrógeno al 35% con respecto al grupo control.

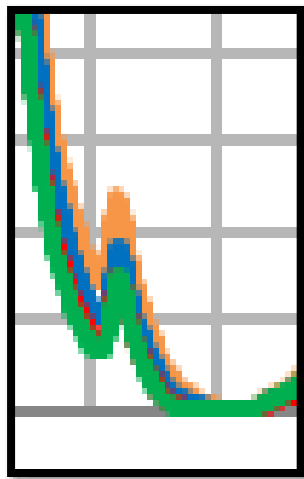
Figura 40 Comparación banda de fosfatos de grupo 3 y 4 correspondientes al grupo tratado con sustancia remineralizante experimental y con peróxido de hidrógeno 35% y sustancia remineralizante experimental.



Las bandas correspondientes a los grupos 3 y 4 tratados con la sustancia remineralizante experimental (SR) y peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante experimental (PH35% + SR) respectivamente, no muestran variaciones significativas lo que sugiere que los fosfatos no se alteran y conservan su identidad.

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

Figura 41 Banda correspondiente a $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ (890-850 cm^{-1}).



Grupo 1 o control color naranja, Grupo 2 o tratado con peróxido de hidrógeno al 35% (PH35%) color azul, Grupo 3 o tratado con sustancia remineralizante experimental color rojo y Grupo 4 tratado con peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante experimental color verde.

Se observa en la banda correspondiente a $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ (Carbonatos), que los grupos presentan una variación mínima con respecto al grupo control. Existe una disminución pequeña de los grupos 2, 3 y 4 con respecto al grupo control.

En cuanto al análisis químico, Bistey y colaboradores (85), informaron que los cambios en la superficie del esmalte son directamente proporcionales a la concentración del peróxido de hidrógeno y los cambios en el área de los picos son más evidentes cuando la duración del blanqueamiento es entre 30 y 60 minutos. Para este estudio el tiempo total

de tratamiento con peróxido de hidrógeno fue de 24 minutos, con aplicaciones de 8 minutos cada una.

En el estudio de Severcan en 2008 (86) se encontró que los valores de frecuencia y la intensidad de algunas bandas para el grupo control o grupo de dientes sin tratamiento, con respecto a los grupos que fueron blanqueados con peróxido de carbamida al 17%, y peróxido de hidrógeno al 35% se ven afectadas. Las bandas de 3500-3300 cm^{-1} , 1637 cm^{-1} y 1200-900 cm^{-1} , correspondientes a la banda de Amida A, Amida I y Fosfatos respectivamente, muestran una mayor disminución con el grupo tratado con peróxido de hidrógeno al 35% con respecto al grupo control. En nuestro estudio no se observa una variación cualitativa entre la banda amida A y amida I, pero se observa una disminución de la altura de la bandas correspondientes con amida II, III, fosfatos y carbonatos.

El estudio de Torres en el 2010 (3), también se corrobora que hay una pérdida simultánea y en igual proporción del contenido orgánico y mineral del esmalte, se presenta un ataque selectivo y una pérdida de la parte mineral rica en carbonato, esto se asocia a que esta parte está presente en la superficie de los cristales e íntimamente asociada con la parte orgánica que es oxidada por el peróxido. No se encontraron cambios significativos en las bandas relacionadas con los fosfatos, resultado que coincide con los resultados de este estudio. Sun en el 2011, también se encontró que hay una pérdida significativa de carbonato, en su estudio utiliza peróxido de hidrógeno con pH neutro y con pH ácido y relaciona una pérdida mayor de carbonato con el peróxido de pH ácido (78).

Ubal dini y colaboradores en el 2013 (87), realizaron un análisis químico sobre la difusión del peróxido de hidrógeno en los tejidos dentales, en el análisis de FTIR encontraron reducción en las bandas de amida I, y A, lo que demuestra que hay una desnaturalización de las proteínas del esmalte, debido a la reacción de oxidación que se produce como consecuencia del peróxido de hidrógeno con la interacción de los tejidos dentales.

De acuerdo al estudio de Berger u colaboradores en el 2014 (32), donde se aplicó el método de FT-Raman, encontraron que el peróxido de hidrógeno provoca una reducción en el contenido mineral del esmalte. En este estudio utilizaron concentraciones de 10%, 35% y 50 % de peróxido de hidrógeno pero no se encontró que el aumento de la concentración aumentara la pérdida de mineral.

Este estudio demuestra que se presenta una disminución en las bandas de los grupos Amidas lo que indica que hay una desnaturalización de las proteínas cuando se trata el esmalte con peróxido de hidrógeno. La pérdida de minerales en el esmalte tratado con peróxido de hidrógeno es causada por los cambios en la concentración y en la estructura de la matriz orgánica. Esto se debe a la actividad de los radicales libres formados por el peróxido de hidrógeno y a la disminución del pH, ya que la acidez de los agentes blanqueadores se asocia con la desmineralización del esmalte (1)(86).

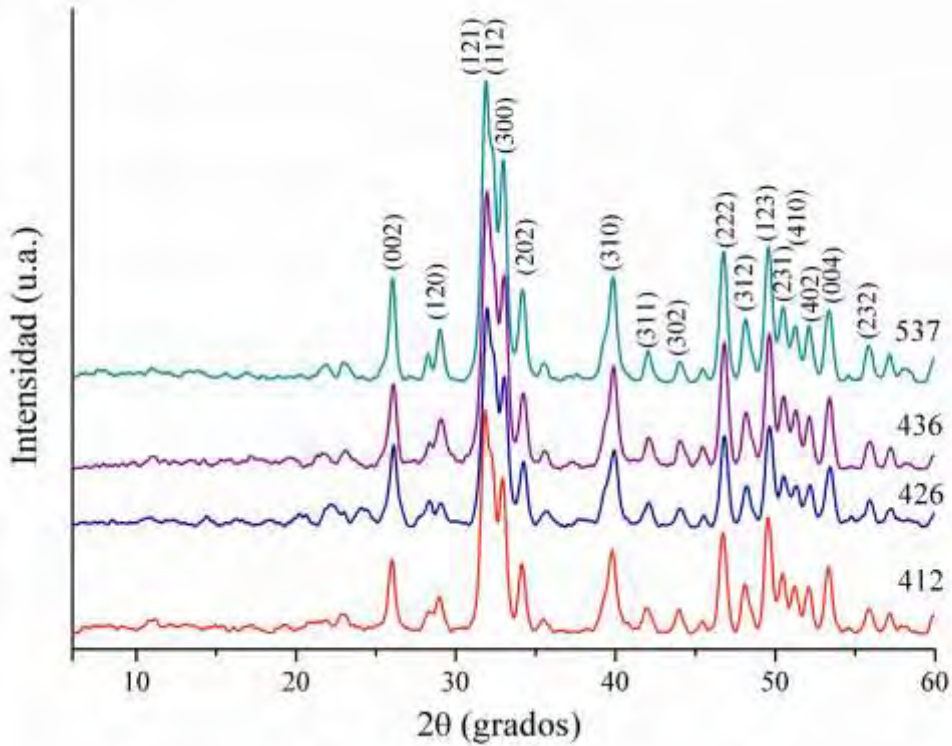
El uso de la sustancia remineralizante, evita la disminución de la banda amida A y amida, y la que menos produce reducción en los picos de las bandas amida II y III lo que sugiere que protege el contenido orgánico del esmalte dental, y como consecuencia no produce una disminución importante en el contenido mineral de carbonatos y fosfatos en el esmalte. Se presenta una variación más notoria en las bandas relacionadas con los carbonatos, pero esto se debe a que la sustancia remineralizante es una sustancia a base de fosfatos de calcio, lo hace que haya mayor concentración de fosfatos en la superficie del esmalte y se ve reflejado en la disminución del porcentaje de carbonatos. Si hay más presencia de fosfatos en el esmalte este se hace más resistente a la desmineralización y al ataque ácido (16).

Se rechaza la hipótesis nula H_0 donde la sustancia remineralizante no afecta la composición química del esmalte dental, y se acepta la hipótesis alterna H_a que sugiere que la sustancia remineralizante afecta la composición química del esmalte dental.

1.3. Difracción de Rayos X

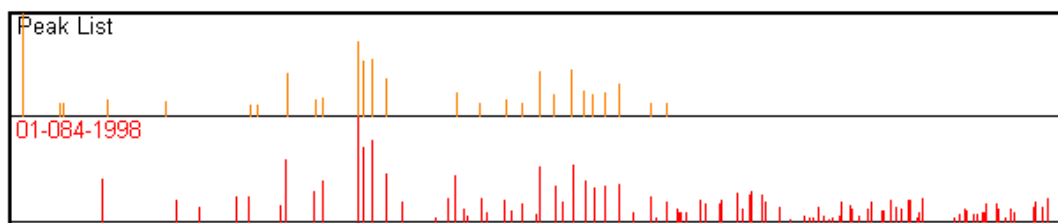
En la figura 43 se observan los difractogramas en polvo por difracción rayos X de las muestras de los grupos 2, 3 y 4 tratados con peróxido de hidrógeno al 35%, sustancia remineralizante experimental y peróxido de hidrógeno al 35% y sustancia remineralizante experimental respectivamente y su comparación con el grupo control o patrón. Como se puede observar hay una concordancia entre los picos de los grupos 1, 2, 3 y el patrón.

Figura 42 Difractogramas Grupo 1 (412), Grupo 2 (426), Grupo 3 (436), Grupo (537).



Los estudios por difracción de rayos X no revelaron ningún cambio significativo en la composición mineralógica de todos los grupos. En todos los casos solo se identificaron picos correspondientes a la fase de hidroxiapatita (fosfato cálcico). Las reflexiones de los grupos 2, 3 y 4 son similares a las posiciones de las reflexiones del grupo control y de las del patrón de referencia de la base de datos PDF (Power Diffraction File by The International Centre for Diffraction Data (ICDD®) para esta fase mineral (Figura 42 y 43)

Figura 43 Picos grupo control (Peak List), picos de patrón de hidroxiapatita (01-084-1998)



En ningún tratamiento se observó cambio de la composición mineral del esmalte, en todos los grupos se observan picos correspondientes a la hidroxiapatita, pero no se pudo determinar la cantidad presente de este mineral en cada grupo.

No se observan en ninguno de los grupos tratados con la sustancia remineralizante picos correspondientes a otras fases asociadas a fosfatos, ya que los fosfatos que aporta esta sustancia al esmalte promueve la formación de hidroxiapatita.

Por medio del análisis de difracción de rayos X se aceptó la hipótesis nula H_0 donde la sustancia remineralizante no afecta el componente mineral del esmalte dental y se rechaza hipótesis alterna H_a que sugiere que la sustancia remineralizante afecta el componente mineral del esmalte dental.

En este estudio ningún grupo se encontró cambios de la composición mineral del esmalte, en todos los grupos se observaron picos en los DRX correspondientes a la hidroxiapatita, pero no se pudo determinar la cantidad presente de este mineral en cada grupo, resultados que coinciden con el estudio realizado por Soares en el 2008 (73).

Los resultados encontrados en la investigación de Barba y colaboradores en el 2015 indican que no hay cambios en las características estructurales, ni tampoco hay cambios en los componentes inorgánicos del esmalte y dentina después de ser sometidos 30 terceros molares humanos a blanqueamiento con peróxido de hidrógeno análisis que se realizó por medio de difracción de rayos X en muestras enteras y no pulverizadas (88).

Los análisis de difracción de rayos X en el estudio de Torres y colaboradores (89) mostraron picos correspondientes a apatita. No se observaron modificaciones en la

intensidad o en la posición de los picos después de realizar blanqueamiento con peróxido de hidrógeno al 38% en dientes de humanos. Estos resultados indicaron que la cristalinidad de la apatita permanece inalterada y que las ν_1 características, ni la composición inorgánica del esmalte se alteraron después del tratamiento con peróxido.

Para este estudio se realizaron pruebas con espectrofotómetro Vita EasyShade, análisis DRX y FT IR, que permiten aplicar técnicas no destructivas, y se pueden utilizar las mismas muestras para los diferentes análisis del esmalte dental. Estos métodos proporcionar información importante sobre la composición orgánica e inorgánica del esmalte dental.

En este estudio solo se utilizó el líquido del blanqueamiento Pola Oficce ®, que está compuesto por peróxido de hidrógeno al 35%, ya que el polvo utilizado en esta marca comercial tiene en su composición algunos aditivos como iones fluoruro, potasio nitrato, espesantes, y otros, que pueden minimizar la pérdida mineral, cambios en el color dental y por lo tanto producir resultados diferentes de los obtenidos en este estudio.

4. Conclusiones y recomendaciones

De este estudio se concluye que en todos los grupos después de realizar los diferentes tratamientos disminuyeron en la variable delta L. La sustancia remineralizante (SR) afecta las variables Delta L, Delta a, Delta B, Delta E. En la variable Delta L disminuye la luminosidad, en Delta a la sustancia remineralizante experimental (SR) afecto el balance verde rojo, tendiendo más hacia el rojo. Para la variable Delta B la sustancia remineralizante experimental (SR) genero más cambio en el balance azul amarillo, disminuyendo el contenido de amarillo. El Delta E, que representa la distancia euclidiana entre las variables L^* , a^* y b^* inicial y final, nos mostró que la sustancia remineralizante experimental es la que tiene más efecto sobre el color seguida del grupo que se trató con peróxido de hidrógeno al 35% y después con la sustancia remineralizante.

El esmalte dental humano está compuesto por un componente orgánico e inorgánico representado por las diferentes bandas amidas, fosfatos y carbonatos

El esmalte dental humano después de ser tratado con peróxido de hidrógeno se observa una variación en el componente proteico representada por la disminución de la banda amida II y III y en el componente orgánico dada por la disminución de la banda de los fosfatos y los carbonatos.

El uso de la sustancia remineralizante evita que se disminuya el componente proteico evita que disminuya la banda amida A y protege el contenido inorgánico pues no muestra variaciones en la banda de fosfatos.

El uso de peróxido seguido de sustancia remineralizante no afecta el contenido orgánico del esmalte y se evidencia por que el pico de la banda amida A no disminuye, disminuye poco la banda amida I, II, III y altera muy poco la composición inorgánica por la poca disminución en la banda de carbonatos y la no disminución de la banda de fosfatos.

El uso del peróxido de hidrógeno y de la sustancia remineralizante experimental no generaron cambios en el componente mineral del esmalte dental mediante el análisis realizado por medio de DRX.

También se puede concluir que la sustancia remineralizante experimental tiene aplicación clínica, ya que modifica el color y no afecta negativamente la composición orgánica e inorgánica del esmalte dental, también se evidencio que su uso acompañado del peróxido de hidrógeno, ayuda a la protección del componente proteico del esmalte dental.

Recomendaciones

Se recomienda seguir en un análisis más profundo de la parte química a través de FT_IR y los programas de deconvolución para corroborar lo expresado cualitativamente.

Realizar un análisis más detallado de los resultados de difracciones de rayos X

Sumergir los dientes en saliva para ver como ocurren los procesos de remineralización.

Proponer la patente de invención de la sustancia remineralizante.

Bibliografía

1. Baldión PA, Arcos LC MM. composición química del esmalte dental posblanqueamiento Effect of Fluorides over the Chemical Composition of Tooth Dental Enamel Post Bleaching. 2011;30(65):41–9.
2. Zalkind M, Arwaz JR, Goldman A RI. Surface morphology changes in human enamel, dentin and cemen-tumfollowing bleaching: a scanning electronmicroscopy study. Endod Dent Traumatol. 1996;12(2):82–8.
3. Torres C, Sánchez M RA. Efectos microquímicos del peróxido de hidrógeno de alta concentración y el ácido fosfórico sobre la capa superficial y subsuperficial del esmalte bovino. Universidad de Granada; 2010.
4. Elfallah HM, Bertassoni LE, Charadram N, Rathsam C, Swain M V. Effect of tooth bleaching agents on protein content and mechanical properties of dental enamel. Acta Biomater [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2015;20:120–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706115001452>
5. Pullido K., Torres C. Sustancias blanqueadoras alternativas: Una revisión bibliográfica. Universidad Nacional de Colombia; 2013.
6. Vargas P, Torres C, Delgado E. Effect of a new remineralizing biomaterial on the color of dental enamel. Acta Odontológica Latinoam. 2014;1:3.
7. P. AL. Alteración de la Mineralización del hueso debido a la exposición a contaminantes órganos clorados y metales pesados. Universidad de Granada; 2009.
8. He B, Huang S, Zhang C, Jing J, Hao Y, Xiao L, et al. Mineral densities and elemental content in different layers of healthy human enamel with varying teeth age. Arch Oral Biol [Internet]. Elsevier Ltd; 2011 Oct [cited 2015 Aug

- 19];56(10):997–1004. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21411061>
9. Michael Ross PW. *Histología: Texto y Atlas a color con Biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana; 2007.
 10. Nanci A. *Histology: Development, Structure, and Function*. 2003.
 11. Sakae T. Variations in Dental Enamel Crystallites and Micro-Structure. *J Oral Biosci* [Internet]. Japanese Association for Oral Biology; 2006 Jan [cited 2015 Aug 19];48(2):85–93. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1349007906800216>
 12. Joiner A, Thakker G CY. Evaluation of a 6% hydrogen peroxide tooth whitening gel on enamel and dentine microhardness in vitro. *J Dent*. 2004;32:127–34.
 13. Barrancos JBP. *Operatoria Dental*. Editorial Panamericana; 2006.
 14. Zimmerli B, Jeger F, Lussi A. Bleaching of nonvital teeth. A clinically relevant literature review. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2010;120(4):306–20.
 15. Winand L. *Physio-chemical study of some apatite phosphates in Tooth Enamel*, Wright. 1965. 15-19 p.
 16. Zapanta LeGeros R. *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*. New York: Karger; 1991.
 17. Cui F GJ. New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1(3):185–91.
 18. Usuga M, Delgado E TC. Efecto de una sustancia remineralizante modificada en el llenado de defectos de esmalte dental. 2012.

19. Fincham a G, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol* [Internet]. 1999 Jun 30;126(3):270–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10441532>
20. Joiner A. Tooth colour: a review of the literature. *J Dent* [Internet]. 2004 Jan [cited 2015 Jan 21];32:3–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300571203001751>
21. O'Brien. *Dental Materials and their Selection*. Quintessence books; 2008.
22. Craig R. *Materiales de Odontología Restauradora*. Madrid: Horcouth Brace; 1997.
23. Sikri VK. Color: Implications in dentistry. *J Conserv Dent* [Internet]. 2010 Oct [cited 2015 Jun 17];13(4):249–55. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3010031&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
24. Espectro electromagnético tomado de www.reflexionesfotograficas.blogspot.com.
25. Escala de Munsell. Imagen tomada de www.redgeomatrica.rediris.es.
26. Chu SJ, Trushkowsky RD, Paravina RD. Dental color matching instruments and systems. Review of clinical and research aspects. *J Dent*. 2010;38(SUPPL. 2):2–16.
27. Escala de de color CIE Lab. Imagen tomada de www.grimaldos.es.
28. Farbkommunikation V. VITA Easyshade Advance ®. Control.
29. Joiner A. The bleaching of teeth: A review of the literature. *J Dent*. 2006;34(7):412–9.
30. Pulido K, Torres C, Delgado E. Sustancias blanqueadoras alternativas: Una revisión bibliográfica. Universidad Nacional de Colombia; 2013.

31. Azrak B, Callaway A, Kurth P, Willershausen B. Influence of bleaching agents on surface roughness of sound or eroded dental enamel specimens. *J Esthet Restor Dent*. 2010;22(6):391–9.
32. Berger SB, Eduardo L, Soares S, Martin AA, Maria G, Ambrosano B, et al. Effects of various hydrogen peroxide bleaching concentrations and number of applications on enamel. 2014;13(1).
33. Elfallah H, Bertassoni L, Charadram N, Rathsam C SM. Effect of tooth bleaching agents on protein content and mechanical properties of dental enamel. *Acta Biomater*. 2015;20:120–8.
34. He LH, Swain M V. Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2008;1(1):18–29.
35. Alqahtani MQ. Tooth-bleaching procedures and their controversial effects: A literature review. *Saudi Dent J [Internet]*. King Saud University; 2014;26(2):33–46. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1013905214000182>
36. Basting R, Rodrigues A, Serra M. The effect of 10% carbamide peroxide, carbopol and/or glycerin on enamel and dentin microhardness. *Oper Dent*. 2005;30(5):608–16.
37. De Abreu DR, Sasaki RT, Amaral FLB, 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. *J Esthet Restor Dent [Internet]*. 2011;23(3):158–68. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1708-8240.2010.00394.x>
38. Giniger M, Macdonald J, Ziembra S, Felix H. The clinical performance of professionally dispensed bleaching gel with added amorphous calcium phosphate. *J Am Dent Assoc*. 2005;136(3):383–92.

39. Costa JB, Mazur RF. Effects of New Formulas of Bleaching Gel and Fluoride Application on Enamel Microhardness: An *In Vitro* Study. *Oper Dent* [Internet]. 2007;32(6):589–94. Available from: <http://www.jopdentonline.org/doi/abs/10.2341/06-166>
40. Chen H-P, Chang C-H, Liu J-K, Chuang S-F, Yang J-Y. Effect of fluoride containing bleaching agents on enamel surface properties. *J Dent* [Internet]. 2008;36(9):718–25. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300571208001577>
41. Wang Y, Gao J, Jiang T, Liang S, Zhou Y, Matis B a. Evaluation of the efficacy of potassium nitrate and sodium fluoride as desensitizing agents during tooth bleaching treatment—A systematic review and meta-analysis. *J Dent* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;43(8):913–23. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300571215000834>
42. He L-B, Shao M-Y, Tan K, Xu X, Li J-Y. The effects of light on bleaching and tooth sensitivity during in-office vital bleaching: A systematic review and meta-analysis. *J Dent* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;40(8):644–53. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300571212001030>
43. Ontiveros JC. In-office Vital Bleaching with Adjunct Light. *Dent Clin North Am* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;55(2):241–53. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011853211000036>
44. Zhao, Jie, Yu Liu W-BS. Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry. *Chem Cent J*. 2011;5(40).
45. Cunha A, De Vasconcelos A, Borges B, Vitoriano J, Alves-Junior C, Dos Santos A et al. Efficacy of in-office bleaching techniques combined with the application of a casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate paste at different moments and its influence on enamel surface properties. *Surf Prop Microsc Res Tech*. 2012;75(8):1019–25.

46. Castellanos JE, Alejandra G, Rubio C, Bosque E, Bosque E. La remineralización del esmalte bajo el entendimiento actual de la caries dental Enamel Remineralization under the Current Caries Understanding. 2013;32(69):49–59.
47. Niwa M, Sato T, Li W, Aoki H, Aoki H DT. Polishing and whitening properties of toothpaste containing hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*. 2001;12(3):277–81.
48. Lippert F, Parker DM, Jandt KD. In vitro demineralization/remineralization cycles at human tooth enamel surfaces investigated by AFM and nanoindentation. *J Colloid Interface Sci*. 2004;280(2):442–8.
49. Axelsson P. Diagnosis and risk prediction of dental caries. Quintessence books; 2000.
50. Schenkels LC, Veerman EC NAA. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. 1995;6(2):161–75.
51. De Almeida PD V, Grégio a. MT, Machado MÂN, De Lima a. a S, Azevedo LR. Saliva composition and functions: A comprehensive review. *J Contemp Dent Pract*. 2008;9(3):072–80.
52. Walsh LJ. The current status of tooth cremes for enamel remineralization. *Dent Inc*. 2009;2(6):38–42.
53. Oppenheim FG, Hay DI FC. Proline-rich proteins from human parotidsaliva. I. Isolation and partial characterization. *Biochemistry*. 1971;10:4233–8.
54. Hay DI Moreno EC. Statherin and the acidic proline-rich proteins. In: *Human saliva: clinical chemistry and microbiology*. 1989.
55. El-yazeed AM, Taha S, El shehaby F, Salem G. Relationship between salivary composition and dental caries among a group of egyptian down syndrome children. *Aust J Basic Appl Sci*. 2009;3(2):720–30.

56. Cury JA, Tenuta LMA. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res.* 2009;23 Suppl 1:23–30.
57. Buzalaf M, Pessan J, Honório H ten CJ. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:97–114.
58. Silverstone LM. The significance of remineralization in caries prevention. *J Can Dent Assoc.* 1984;50(2):157–67.
59. Amaechi BT, Higham SM. Eroded enamel lesion remineralization by saliva as a possible factor in the site-specificity of human dental erosion. *Arch Oral Biol.* 2001;46(8):697–703.
60. Hellwig EL. Systemy versus topical fluoride. *Caries Res.* 2004;38:258–62.
61. Giordano S. Revisión Bibliográfica: Usos y Efectos del Fosfato de Calcio Amorfo (Fca) En La Odontología Restauradora Y Preventiva. 2010;48(10):1–12.
62. <http://crcoralhealthscience.org.au/images/pdf/reynolds%20-%20cpp-acp%20evidence.pdf>.
63. <http://www.medmayor.cl/odontologia/tercero/cariologia>.
64. Li J, Xie X, Wang Y, Yin W, Antoun JS, Farella M, et al. Long-term remineralizing effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on early caries lesions in vivo: A systematic review. *J Dent [Internet]. Elsevier Ltd;* 2014;42(7):769–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2014.03.015>
65. Azarpazhooh A, Limeback H. Clinical efficacy of casein derivatives: a systematic review of the literature. *J Am Dent Assoc [Internet]. American Dental Association;* 2008;139(7):915–24; quiz 994–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.2008.0278>
66. Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker G MM. Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res.* 2008;87:344–8.

67. Cochrane N, Saranathan S, Cai F, Cross K RE. Enamel Subsurface Lesion Remineralisation with Casein Phosphopeptide Stabilised Solutions of Calcium, Phosphate and Fluoride. *Caries Res.* 2008;42(2):88–97.
68. Cross KJ, Huq NL, O'Brien-Simpson NM, Perich JW, Attard TJ RE. The role of multiphosphorylated peptides in mineralized tissue regeneration. *Int J Pept Res Ther.* 2007;13:479–95.
69. Deng M, Wen H-L, Dong X-L, Li F, Xu X, Li H, et al. Effects of 45S5 bioglass on surface properties of dental enamel subjected to 35% hydrogen peroxide. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2013;5(2):103–10. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3707074&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
70. Ramos L., Herrera M., Delgado E. Comparación de la superficie del esmalte postdescementación de brackets metálicos después del acondicionamiento con una Sustancia remineralizante. Universidad Nacional de Colombia; 2010.
71. www.identi.li.
72. <http://www.ugr.es>.
73. Soares C. Efecto del peróxido de hidrógeno y carbamida sobre la capacidad descalcificante del ácido fosfórico sobre el esmalte. Universidad de Granada; 2008.
74. Iijima M, Moradian-Oldak J. Control of apatite crystal growth in a fluoride containing amelogenin-rich matrix. *Biomaterials.* 2005;26(13):1595–603.
75. Servicio de Instrumentación Tecnológica. Espectrofotometría Infrarroja. <http://upct.es/~salt/sit/html/recursos/espectrofotometria.htm> .
76. Servicios Técnicos de Investigación. Espectrometría de Infrarrojo. http://www.ua.es/es/investigacion/sti/servicios/analisis_instrumental/rayosX_monocristales/infrarroja.html.

77. Severcan F, Gokduman K, Dogan A, Bolay S GS. Effects of in-office and at-home bleaching on human enamel and dentin: an in vitro application of Fourier transform infrared study. *Appl Spectrosc*. 2008;62(11):1274–9.
78. Sun L, Liang S, Sa Y, Wang Z, Ma X, Jiang T, et al. Surface alteration of human tooth enamel subjected to acidic and neutral 30% hydrogen peroxide. *J Dent* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;39(10):686–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2011.07.011>
79. Constanza L, Pita G, Sebastián J, Ramírez R, Viviana M, Vacca Ú, et al. Protocolos diseñados para el biobanco de dientes de la Universidad Nacional de Colombia. 2014;4(2):79–93.
80. Macdonald M, Szpuszta M. CommissioDe L'Eclairage International Commssion on Illumination Internationale Beleuchtungskommission. CIE Technical Report. 2004.
81. Alghazali N, Burnside G, Moallem M, Smith P, Preston A, Jarad FD. Assessment of perceptibility and acceptability of color difference of denture teeth. *J Dent* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;40 Suppl 1:e10–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561647>
82. Eimar H, Siciliano R, Abdallah M-N, Nader SA, Amin WM, Martinez P-P, et al. Hydrogen peroxide whitens teeth by oxidizing the organic structure. *J Dent* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;40 Suppl 2:e25–33. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571212002266>
83. Sampaio D, Correia RP. Análise espectrofotométrica do clareamento dental interno. 2010;363–8.
84. Ma X, Li R, Sa Y, Liang S, Sun L, Jiang T, et al. Separate contribution of enamel and dentine to overall tooth colour change in tooth bleaching. *J Dent* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;39(11):739–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2011.08.005>

85. Bistey T, Nagy IP, Simó A, Hegedus C. In vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel. *J Dent*. 2007;35(4):325–30.
86. Severcan F, Gokduman K, Dogan A, Bolay S, Gokalp S. Effects of in-office and at-home bleaching on human enamel and dentin: An in vitro application of fourier transform infrared study. *Appl Spectrosc* [Internet]. 2008;62(11):1274–9. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-57049117308&partnerID=tZOtx3y1>
87. Ubaldini a. LM, Baesso ML, Medina Neto a., Sato F, Bento a. C, Pascotto RC. Hydrogen Peroxide Diffusion Dynamics in Dental Tissues. *J Dent Res* [Internet]. 2013;92(7):661–5. Available from: <http://jdr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0022034513488893>
88. Izquierdo-Barba I, Torres-Rodríguez C, Matesanz E, Vallet-Regí M. New approach to determine the morphological and structural changes in the enamel as consequence of dental bleaching. *Mater Lett* [Internet]. Elsevier; 2015;141:302–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167577X14021235>
89. Torres-Rodríguez C, Portolés MT, Matesanz MC, Linares J, Feito MJ, Izquierdo-Barba I, et al. Effects of bleaching on osteoclast activity and their modulation by osteostatin and fibroblast growth factor 2. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2016;461:285–91. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002197971530206X>